01423
A 95701JBB

**INTERAÇÃO RADIAÇÃO GAMA x REGULADORES DE
CRESCIMENTO NO DESENVOLVIMENTO DE CÉLULAS E
TECIDOS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp) "IN VITRO"**

JORGE HAMILTON FERREIRA

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto - 1983

Ao meu pai

Chiadi Ferreira

("in memorian")

À minha mãe

Olga Aiub Ferreira,

*ao tomar as minhas mãos nas suas mãos
conduziu-me*

com amor e carinho

à plenitude deste momento

o meu reconhecimento e a minha gratidão

Aos meus irmãos,

*Maria Mirtes, Said, Fádua, Assad e
Maria Claudete*

*dos quais sempre recebi apoio,
carinho e dedicação e que me
ensinaram a enfrentar todos os
obstáculos da vida com firmeza
e compreensão.*

*Caminhei ao lado de um grande
cientista: meu mestre e amigo*

OTTO JESU CROCOMO

Existem pessoas que dedicam toda sua existência a uma ciência e ao seu desenvolvimento. Pessoas despreendidas que procuram estimular os jovens para seguirem a trajetória da ciência e da verdade.

Estou falando daquele que me orientou, a ele que me ensinou o sentido de humanidade, de nobreza de caráter e retidão de personalidade. A você meu mestre e amigo que tive o privilégio de ser seu orientado.

Espero poder seguir seus ensinamentos no decorrer de minha existência.

A você, sua esposa Diva, e a seus filhos meus agradecimentos mais sinceros.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Gerhard Bandel pela orientação na parte de Citologia

Ao Prof. Vivaldo Francisco da Cruz e Walter João Diehl, pela orientação na parte de Análise Estatística.

Às colegas Maria Aparecida Schiavuzzo e Cristina H.R.P. Gonçalves, e aos técnicos do CENA, Enio T. Oliveira, Carlos Alberto Dorelli e Claudio Sergio Dorelli, pela colaboração nos trabalhos desenvolvidos em laboratório.

Ao CENA - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo, pela possibilidade oferecida.

À todos que direta ou indiretamente participaram e colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Importância da razão citocinina/auxina nos processos de diferenciação e desenvolvi- mento celular	4
2.2. Radiações ionizantes: natureza e modo de ação sobre o sistema biológico	8
2.3. Diferenças na radiosensibilidade entre plan- tas intactas e de seus tecidos cultivados "in vitro"	18
3. MATERIAL E MÉTODO	21
4. RESULTADOS	
4.1. Análises histológicas	28
4.2. Análises fisiológicas e bioquímicas	33
4.2.1. Desenvolvimento dos calos (produzidos pelos explantes irradiados)	33
4.2.2. Desenvolvimento dos calos (a partir de calos irradiados)	40
4.2.3. Crescimentos dos calos (produzidos nos explantes)	43
4.2.4. Compostos nitrogenados	45
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	54

7. LITERATURA CITADA	55
APÊNDICES	
APÊNDICE I	64
APÊNDICE II	67

INTERAÇÃO RADIAÇÃO GAMA x REGULADORES DE CRESCIMENTO
NO DESENVOLVIMENTO DE CÉLULAS E TECIDOS
DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp) "IN VITRO"

Autor: Jorge Hamilton Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo

RESUMO

O presente trabalho consta de uma série de experimentos desenvolvidos no Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, visando a reversão do processo deletério causado pela radiação gama sobre tecidos foliares e células de cana-de-açúcar, cultivados in vitro, pela ação dos reguladores de crescimento vegetal, cinetina e ácido indolilacético (AIA).

Para tanto, tecido foliar internodal de cana-de-açúcar e calos de cana-de-açúcar, foram submetidos aos seguintes tratamentos de radiação gama: 0, 5 e 15 Kr, seguindo-se imediatamente cultura in vitro. Nos meios de cultura estavam presentes cinetina e AIA formando os seguintes tratamentos (radiação : cinetina : AIA): 0:0:0; 0:0:1; 0:0:5; 0:1:0; 0:1:1; 0:1:5; 0:5:0; 0:5:1; 0:5:5; 5:0:0; 5:0:1; 5:0:5; 5:1:0; 5:1:1; 5:1:5; 5:5:0; 5:5:1; 5:5:5; 15:0:0; 15:0:1; 15:0:5; 15:1:0; 15:1:1; 15:1:5; 15:5:0; 15:5:1; 15:5:5.

Os resultados obtidos indicaram que a radiação gama provocou variações citológicas e bioquímicas, as quais, nas condições do experimento, foram revertidas pela presença de cinetina e AIA principalmente na razão de 1 mg/l: 1 mg/l, permitindo o desenvolvimento de calos, e portanto a recuperação de possíveis mutações.

INTERACTION GAMMA-RADIATION vs GROWTH REGULATORS
ON 'IN VITRO' DEVELOPMENT OF SUGARCANE (*Saccharum* spp)
CELLS AND TISSUE

Author: Jorge Hamilton Ferreira

Adviser: Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo

SUMMARY

The objective of the present research was to revert the deleterious effects of gamma radiation on 'in vitro' development of sugarcane cells and tissue by kinetin and indol acetic acid (IAA).

Sugarcane internodal tissue as well as callus were irradiated at 0, 5 and 15 Kr gamma radiation, followed by 'in vitro' culture in media containing kinetin and IAA. The following treatments were used (gamma-radiation : kinetin : IAA): 0:0:0, 0:0:1, 0:0:5, 0:1:0, 0:1:1, 0:1:5, 0:5:0, 0:5:1, 0:5:5, 5:0:0, 5:0:1, 5:0:5, 5:1:0, 5:1:1, 5:1:5, 5:5:0, 5:5:1, 5:5:5, 15:0:0, 15:0:1, 15:0:5, 15:1:0, 15:1:1, 15:1:5, 15:5:0, 15:5:1, 15:5:5.

The results obtained showed that, under the experimental conditions, cytological and biochemical variations

resulting from gamma radiation were reverted by the presence of kinetin and IAA, mainly with the ratio 1 mg/l:1 mg/l with development of callus and therefore the recovery of possible mutants.

1. INTRODUÇÃO

A técnica da cultura de tecidos "in vitro" constitui-se em importante ferramenta de trabalho para a abordagem dos mais variados tipos de problemas básicos, de Bioquímica e Fisiologia Vegetais, Biologia Celular, Genética, com aplicações em Horticultura, Agricultura e Indústria. Especialmente na área de Fisiologia, esta técnica tem se mostrado vantajosa para o estudo de muitos problemas, os quais são mais facilmente estudados em fragmentos de tecidos isolados do que na planta intacta (BAJAJ, 1971). Isso se deve basicamente ao fato de que o cultivo "in vitro", seja de fragmentos de tecidos ou de células isoladas, permite vantajosamente um controle mais rigoroso das condições ambientais, nutricionais e hormonais (SIEVERT e HILDEBRANT, 1965; HANDRO, 1974), facilitando, desta forma, o estudo de certos problemas básicos do desenvolvimento vegetal, como citodiferenciação, organogênese e propagação vegetativa (HALPERIN, 1973).

SKOOG e MILLER (1957), demonstraram que o padrão de vários processos de crescimento e desenvolvimento, podia ser regulado basicamente através de suplementações proporcionais de auxina e citocinina. Níveis relativamente baixos de uma destas substâncias, quando combinados com altos níveis da outra e vice-versa, levavam a resultados finais opostos. Assim, por exemplo, concentrações relativamente altas de auxina favoreciam o desenvolvimento de raízes de fumo, enquanto níveis elevados de citocinina induziam a regeneração de gemas; teores baixos de citocinina provocavam uma intensa proliferação celular. Estes resultados tendem a mostrar que as interações quantitativas entre os fatores de crescimento, especialmente entre as auxinas e citocininas, e entre estas e outras substâncias do crescimento, fornecem um mecanismo comum para a regulação de todos os tipos de crescimento investigados, desde a expansão celular até a organogênese. Nas plantas intactas, a exemplo do que ocorre nos tecidos vegetais isolados, as citocininas e auxinas devem intervir também em processos básicos, tais como a atividade meristemática, diferenciação e organogênese.

Esses estudos iniciais e importantes têm sido seguidos por vários outros, desenvolvidos com os mais variados tipos de tecidos, confirmando a necessidade de um balanço sinérgico entre citocinina e auxina para a indução de certos processos morfogênicos.

O uso de radiação ionizante tem levado a obten

ção de mutantes úteis para o homem e a sua combinação com a técnica de cultura de tecidos em várias culturas (KERBAUY, 1977) tem se mostrado vantajosa. Entretanto, aspectos básicos da interação de ambas as técnicas devem ser explorados para uma melhor compreensão dos fenômenos bioquímicos e fisiológicos que ocorrem nas células vegetais submetidas a esse tipo de tratamento. A interação se daria entre a ação da radiação ionizante (raios gama, por ex.) e a ação de reguladores de crescimento (ácido indolilacético e cinetina, por ex.).

Como se sabe, a radiação ionizante pode provocar, e dependendo da sua dose, de fato provoca, danos à célula vegetal, tanto ao nível bioquímico quanto ao nível citológico. As auxinas e citocininas, presentes no meio, atuariam como antagonistas dessa ação, se não impedindo totalmente, pelo menos, funcionando como "amortizadoras" do efeito deletério das radiações ionizantes. Na presença de determinados teores desses reguladores de crescimento, e da razão entre eles, a célula irradiada se recuperaria e os possíveis mutantes poderiam ser recuperados.

Tomando como hipótese de trabalho as considerações acima expostas, é que os experimentos aqui descritos foram realizados. O objetivo foi o de se acompanhar os níveis bioquímicos e citológicos as consequências da ação da radiação gama sobre células de cana-de-açúcar, e a possível "reversão" da ação deletéria pelos reguladores de crescimento, ácido indolilacético e cinetina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Importância da razão citocinina/auxina nos processos de diferenciação e desenvolvimento celular

Já no início do desenvolvimento da técnica de cultura de tecidos vegetais "in vitro", os pesquisadores verificaram a necessidade de se adicionar ao meio de cultura, certas substâncias naturais, para que houvesse um crescimento contínuo dos explantes inoculados (WHITE, 1943). As primeiras suplementações com ácido indolilacético (AIA), teriam sido efetuadas por volta de 1936 e em 1940, aproximadamente, já eram conhecidos os efeitos estimulatórios de algumas substâncias naturais, como do extrato de levedura e do água de coco (WHITE, 1943).

JABLONSKI e SKOOG, em 1954, demonstraram a necessidade da presença simultânea no meio de cultura de AIA e de uma outra substância desconhecida encontrada no leite de

coco, no malte ou ainda em extratos aquosos de tecidos vasculares, para o cultivo de medula caulinar de *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38.

Quando apenas AIA era adicionada ao meio de cultura era observada somente a ocorrência de um alongamento celular, chegando as células a atingir um tamanho dez vezes superior ao tamanho inicial. Para se obter divisões celulares "in vitro", havia a necessidade de suplementações conjuntas de AIA com extratos acima citados.

MILLER et al. (1955, 1956), conseguiram isolar a partir do ácido desoxirribonucleico (DNA) de esperma de aren que envelhecido e autoclavado, a 6-furfurilaminopurina, uma substância altamente ativa no processo de divisão celular, especialmente na citocinese, à qual denominaram cinetina. Esta substância, quando adicionada ao meio de cultura, mesmo em concentrações tão baixas como 0,01 ppm, induzia uma intensa proliferação celular no tecido medular do fumo. Verificou-se ainda que em presença de auxina isoladamente, as células apresentavam somente um alongamento celular, sendo incapazes de se dividir ou de se manter em cultura durante prolongados períodos de tempo, confirmando assim, os resultados obtidos por JABLONSKI e SKOOG (1954).

Contudo, DAS et al. (1956) ao pesquisarem o efeito da cinetina sobre os processos de mitose e citocinese em medula de tabaco, verificaram que o fator essencial para a ocorrência de mitose era a presença de AIA ao meio de cultu-

ra, independentemente da presença ou da ausência de cinetina nos meios. Segundo os autores, na ausência de citocinina, a auxina induz apenas algumas mitoses e citocineses, devido a pequenas quantidades de citocinina endógena natural existente no tecido inoculado. Quando a cinetina era suplementada juntamente com AIA, um aumento considerável na frequência de mitoses e citocineses era observado.

O ciclo completo da multiplicação celular em medula de tabaco, que compreende a síntese de DNA, mitose e citocinese, requer a presença contínua tanto de auxina quanto de citocinina (DAS et al., 1956). Foi demonstrado também por NITSCH e BUI DANG HA (1967) que, em medula de tabaco, respostas de crescimento podiam ser igualmente obtidas, pela aplicação de cinetina e AIA isoladamente, desde que o material fosse previamente tratado com a citocinina e posteriormente com auxina. Todavia, nenhum crescimento era observado se a sequência inversa fosse adotada.

Por outro lado, PATAU et al. (1957) relataram que para ocorrer mitoses, citocineses e possivelmente também para a duplicação da molécula de DNA, seria necessário a presença de citocinina, enquanto a auxina atuaria principalmente nos processos de mitose e duplicação de DNA. Segundo estes mesmos autores, a presença simultânea de citocinina e auxina no meio de cultura, seria indispensável a duplicação de DNA, devendo, portanto, os resultados obtidos com cada uma destas

substâncias isoladamente, ser atribuídos à presença de traços endógenos do fator não adicionado ao meio.

SKOOG e MILLER, em 1957, estudando tecido medular de tabaco cultivado "in vitro" demonstraram que o padrão dos inúmeros processos de crescimento e desenvolvimento podia ser regulado, basicamente através de suplementações proporcionais de auxina e citocinina. Segundo estes autores, a combinação de níveis relativamente baixos de uma destas substâncias com altos níveis da outra e vice-versa, acarretariam em resultados finais opostos. Por exemplo, altas concentrações de auxina favorecem o desenvolvimento de raízes, enquanto altos níveis de citocinina induzem a regeneração de gemas e baixos níveis de citocinina provocam uma intensa proliferação celular. De acordo com os autores, estes resultados demonstraram a existência de interações quantitativas entre os fatores de crescimento, especialmente entre auxinas e citocininas e entre estas e outras substâncias de crescimento, fornecendo assim, um mecanismo comum para a regulação de todos os tipos de crescimento pesquisados, desde a expansão celular até a organogênese.

Segundo SKOOG e MILLER (1957), as citocininas e auxinas devem intervir em processos básicos, tais como a atividade meristemática, diferenciação e organogênese tanto em plantas intactas como em tecidos vegetais isolados. Devido aos diferentes resultados obtidos com a aplicação de apenas uma citocinina e uma auxina, os autores possuem certa reser-

va quanto ao conceito da existência de substâncias específicas para a regulação das distintas fases de desenvolvimento.

Desde que SKOOG e MILLER (1957) estabeleceram as condições hormonais necessárias para o crescimento e desenvolvimento do tabaco "in vitro", inúmeros trabalhos desenvolvidos com os mais variados tipos de tecidos, pertencentes aos mais diversos taxons, tem confirmado e progressivamente generalizado, sobre a necessidade de um balanço sinérgico entre a citocinina e auxina para a indução de certos processos morfogênicos (HALPERIN, 1973).

2.2. Radiações ionizantes: natureza e modo de ação sobre o sistema biológico

a) Considerações gerais

Com o advento da radiação ionizante, inúmeros trabalhos tem sido realizados demonstrando seus efeitos sobre os mais diversos aspectos do material vegetal (SPARROW, 1957, in Romani, 1966). SKOOG em 1935, afirmou que, embora relevantes observações tenham sido feitas sobre o efeito da radiação nos processos de crescimento e desenvolvimento, o modo de ação das radiações sobre a célula vegetal, ainda permanece praticamente obscura.

A radiação ionizante, segundo KLEIN e KLEIN (1971), é qualquer tipo de radiação eletromagnética, com com-

primentos de onda inferiores a 10 nm, capazes de provocar a ionização da água.

A ação das radiações ionizantes sobre os organismos tem sido classificadas como direta e indireta (EBERT, 1960 in KLEIN e KLEIN, 1971). Segundo KLEIN e KLEIN (1971), a ação direta no choque de um foton sobre macromoléculas e estruturas celulares vitais, enquanto a ação indireta far-se-ia através da ionização das moléculas de água quando da passagem do foton através da célula, originando, em consequência, entidades ionizadas que reagiriam fortemente com alvos moleculares.

As radiações ionizantes, independentemente de sua ação direta ou indireta, provocam alterações no metabolismo celular através de uma extensa gama de modificações, como desequilíbrio óxido-redutor, desaminação oxidativa dos aminoácidos, descarboxilação dos ácidos nucleicos, competição entre as substâncias pelos radicais livres (KLEIN e KLEIN, 1971).

O estudo da ação química das radiações ionizantes, tem sido recentemente realizado, com base no pressuposto de que espécimes químicos ativos são átomos e radicais livres produzido pela radiação ou excitação das moléculas (WEISS, 1960). De uma revisão bibliográfica efetuada por KLEIN e KLEIN (1971), podemos depreender que entidades como radicais livres, são altamente reativas, principalmente oxidantes, cujos efeitos sobre o sistema erradicado são proporcionais às suas concentrações.

Devido ao fato de que os mesmos conceitos e resultados referentes ao emprego das radiações ionizantes nos sistemas vegetais e animais serem praticamente os mesmos, estes últimos tem sido, todavia, preferencialmente estudados (KLEIN e KLEIN, 1971). Segundo BAJAJ (1971), os estudos radiológicos nos vegetais tem se desenvolvido, basicamente, a partir de plantas intactas, sendo relativamente pequeno o número de trabalhos realizados com cultura de tecido vegetal, apesar desta técnica ter se mostrado, nesta área de pesquisa, um instrumento apropriado para a investigação dos efeitos das radiações ionizantes (OPATRY, 1974), uma vez que estes efeitos podem ser alterados diferentemente por variações nas condições experimentais (QUASTLER, 1950).

b) Ação nos sistemas "in vitro"

A irradiação de sistemas vivos, como tecidos vegetais cultivados "in vitro", e sistemas não vivos, como soluções hormonais ou meios de cultura irradiados isoladamente, tem fornecido inúmeros exemplos de degradação e formação de substâncias.

SKOOG em 1935, observou que a irradiação de soluções de AIA com doses moderadas de radiação X, inativava a auxina. A partir desta observação, sugeriu que tal degradação deveria também ocorrer quando tecidos vegetais fossem submetidos a idênticos tratamentos.

BELLI-DONINI e CERVIGNY (1967), ao submeter so

luções aquosas de cinetina a irradiação, como fez SKOOG (1935) com AIA, verificaram que concomitantemente a radiólise da cinetina, ocorria também a formação de outros compostos, como adenina e uma outra substância com $R_f = 0,28$, detectadas através de processos cromatográficos.

Vários pesquisadores (KING, 1949; ROMANI, 1966) tem demonstrado a formação de substâncias fisiologicamente ativas no processo de desenvolvimento nos tecidos irradiados. Segundo KING (1949), quando tecidos de tabaco cultivados "in vitro" eram irradiados e colocados nas proximidades de fragmentos não irradiados, estes apresentavam um crescimento menor, equivalente quantitativamente, aos tecidos irradiados diretamente. Conforme relata a autora, esta inibição de crescimento talvez fosse devido a alguma substância inibidora, formada e liberada pelo tecido irradiado e difundida para o meio de cultura.

DEGANI e PICKHOLZ (1973) ao utilizarem irradiação sobre calos de tabaco, observaram que estes tecidos adquiriam a capacidade de produzir gemas, mesmo no escuro, fato este que não se verifica no material controle não irradiado. Estes mesmos autores relataram ainda a possibilidade de ocorrência de uma estimulação qualitativa da diferenciação, ou seja, a organogênese radioinduzida. Já, SPIEGEL-ROY e KOCHBA (1973) demonstraram a estimulação quantitativa da diferenciação de embriões em calos de *Citrus sinensis*. Quando este tecido era inoculado em meios de cultura previamente irradiados

dos, contendo extrato de malte, havia uma maior formação de embriões em relação aos tecidos incubados em meios de cultura não irradiados. Este efeito estimulador foi atribuído, pelos autores, à presença de determinadas substâncias estimuladoras da embriogênese somática, provenientes da radiólise do malte. Por outro lado, se adenina fosse adicionada ao meio, resultados negativos de diferenciação eram observados.

c) Interação com os reguladores de crescimento

A partir do trabalho de SKOOG em 1935, no qual ele correlacionou a inibição da expansão celular de plântulas de *Pisum sativum* tratados com Raio X, com a destruição da auxina endógena e sua possível recuperação por meio de aplicações exógenas deste fitormônio, inúmeros trabalhos surgiram, nos quais os autores apontam como causa principal dos efeitos inibitórios, a degradação da auxina. Confirmando a afirmação de SKOOG (1935), diversos autores verificaram a possibilidade de recuperação dos efeitos, através de suplementações exógenas de auxina.

MIKA (1952), pesquisando raízes de ervilhas irradiadas e suplementadas com AIA, verificou uma restauração parcial do crescimento, inibido pela radiação, restauração esta, dependente da concentração de auxina adicionada e da dose de radiação empregada.

Na mesma época, WAGGONER e DIMOND (1952), trabalhando com tumores "crown-gall" de plântulas de tomate, ta-

baco e Kalanchoe, verificaram que a irradiação inibia o crescimento tumoral, atribuindo este efeito inibitório a supressão da síntese auxínica. De acordo com os autores, a intensidade da inibição do crescimento, estaria diretamente correlacionada com o grau de inibição da síntese deste hormônio. KLEIN e VOGEL (1956), observaram estes mesmos efeitos inibitórios de crescimento em tumores "crown-gall", quando irradiados com radiação X, gama e neutrons rápidos, podendo, estes efeitos, ser total ou parcialmente revertidos, com concentrações apropriadas de AIA.

Frutos de tomate e tubérculos de batata submetidos à irradiação gama, de acordo com MATHUR (1963), sofreriam alterações em seus sistemas sintetizadores de auxina, sendo que estas injúrias poderiam ser contrabalançada com aplicações exógenas de AIA.

KING e GALSTON (1960), trabalhando com secções de caules estiolados de ervilhas, verificaram que a inibição provocada pela radiação X, poderia ser evitada, desde que os tecidos fossem tratados com 10^{-6} M de AIA.

HOLMSEN et al. (1964) demonstraram a possibilidade de recuperação dos movimentos geotrópicos em plântulas de *Pisum sativum*, tratadas com doses de 80 e 120 Kr de radiação gama e suplementadas com AIA, ANA e indolacetonitrilo. Este mesmo sucesso não foi obtido com relação à restauração dos movimentos geotrópicos de coleoptiles irradiados de *Zea mays*, através de suplementações exógenas com as mesmas substâncias

promotoras de crescimento. LOCKHART (1961) não observou qual quer reversão de crescimento em caules de *Phaseolus vulgaris* tratados com irradiação X e ultravioleta e suplementados com ácido giberélico. Segundo o autor, estas radiações estariam afetando um sistema hormonal não giberélico.

Por outro lado, HABER e LUIPOLD (1960) observaram um alongamento nas células, quando plantas de trigo eram irradiadas e suplementadas com giberelinas.

USSUF e NAIR (1974) também comprovaram a interferência da radiação ionizante (neste caso, radiação gama) sobre a degradação do AIA endógeno, assim como sobre o sistema sintetizador desta auxina, em tubérculos de batata irradiados com 10 Krad. Provavelmente, segundo os autores, ao nível do sistema biossintético do AIA, a radiação estaria afetando o sistema enzimático de formação desta auxina, sendo esta interferência reversível, desde que 20 ppm de AIA sejam adicionados, em um período de tempo nunca superior a 6 horas após a irradiação. A degradação direta do AIA endógeno far-se-ia através da radioativação da enzima AIA oxidase.

GORDON (1957) pesquisando sobre a correlação existente entre a radiação ionizante e o decréscimo do teor endógeno de auxina nos tecidos vegetais, sugeriu que as radiações atuariam em um estágio inicial da biossíntese deste fitormônio, talvez ao nível de transcrição dos ácidos nucleicos.

Trabalhos de POLLARD (1964) e HAYASHI et al. (1974), serviram para confirmar a hipótese de GORDON (1957).

Nestes, os autores evidenciaram, em *Escherichia coli* e em timo de bezerro, respectivamente, que a fase radiosensível é a da transcrição.

Por outro lado, TANO (1971) ao pesquisar a síntese de DNA e RNA em sementes de cevada irradiadas com 20 Kr de radiação gama, encontrou resultados que contradizem os resultados obtidos pelos dois autores anteriormente citados, pois a não ser um pequeno atraso verificado na síntese de DNA, a síntese destes dois ácidos nucleicos era quase normal, pelo menos no primeiro ciclo mitótico após a irradiação. Outra observação feita por TANO (1971) foi não constatar diferenças significativas entre o RNAm extraído de sementes irradiadas e não irradiadas.

Os efeitos inibitórios das irradiações ionizantes, são, segundo inúmeros radiobiologistas vegetais, consequentes a um decréscimo no nível endógeno de fitormônios, principalmente auxinas. Por outro lado, existem pesquisadores que atribuem estes efeitos inibitórios a fatores não hormonais. Entre estes, GARAY e SÁGI (1962) que detectaram a inibição de crescimento de plântulas irradiadas (*Lupinus albus*), submetidas a radiação ultravioleta, não verificando qualquer alteração nos teores endógenos de auxina ou de inibidores de crescimento que justificasse a inibição de crescimento observado. Tendo em vista os resultados obtidos, sugeriram que os efeitos primários das radiações ionizantes não eram devidos à alterações do catabolismo da auxina ou à síntese de

inibidores de crescimento, mas devido a um possível decréscimo da sensibilidade dos tecidos irradiados à ação das substâncias promotoras de crescimento. Relataram ainda que esta diminuição da sensibilidade celular seria provocada por lesões nos pontos receptores da auxina ou por outras modificações quaisquer, que de uma ou outra forma, impossibilitariam a ação hormonal.

Outras pesquisas, recentemente, vieram reforçar a hipótese sugerida por GARAY e SAGI (1962), por exemplo: MIURA et al. (1974) verificaram em coleoptilo de *Avena* irradiados com fortes doses de radiação gama, que, apesar de não terem apresentado alterações significativas no nível endógeno de auxina ou na conversão de triptofano em AIA, com doses de 500 Kr ou mesmo no transporte do hormônio com 680 Kr, as respostas de crescimento ao AIA suplementado, eram consideravelmente reduzidas quando comparadas às daquelas dos respectivos controles não irradiados. Assim sendo, os autores concluíram que a inibição do alongamento celular seria devido a uma diminuição na reatividade dos tecidos com AIA.

JORDAN e HABER (1974) estudando plântulas -gama* de *Triticum vulgare* irradiadas com 500 Krads, verificaram que o teor de citocininas era apenas levemente inferior ao do respectivo controle não irradiado; assim sendo, concluí

* Plântulas-gama: são pequenas plantas originadas de sementes de cereais, como trigo, aveia, cevada, submetidas a altos doses de irradiação, as quais podem crescer, caracteristicamente, na ausência completa de síntese de DNA, mitose e divisão celular (HABER et al., 1961).

ram que a ausência de divisões celulares nestas plantas, não seria devido a uma deficiência muito acentuada destes fitormônios. Suplementações exógenas de cinetina e de outros promotores de crescimento combinados (não especificados pelos autores), não foram suficientes para promover qualquer divisão celular neste material.

BANKES e SPARROW (1969) verificaram a formação de maior quantidade de raízes adventícias e tumores aclorofilados na região basal das folhas de plantas irradiadas de *Lactuca sativa*, quando submetidas a doses de 7,0 e 8,0 Kr, respectivamente, tendo sugerido como possível causa destes efeitos, uma elevação no nível endógeno de auxina. Provavelmente, segundo os autores, este aumento seria tribuído a fatores como: destruição de enzimas inibidoras da auxina, difusão de auxina das células eliminadas pela radiação gama ou ainda a um acúmulo do hormônio em determinados pontos, devido ao bloqueio provocado pelas células mortas. De qualquer forma, o aumento da concentração de auxina no micro ambiente celular em consequência aos fatores citados, criaria localmente, um balanço hormonal favorável a proliferação celular.

GREBINSKI et al. (1962) citado por ROMANI (1966) correlacionaram também, o crescimento anormal de plântulas de ervilhas originárias de sementes previamente irradiadas com 10.000 rads com o aumento na concentração de auxina endógena.

Vários autores atribuem ao AIA, um efeito pro-

tetor contra radiações ionizantes, tendo como base o fato de que, sendo a auxina uma substância quimicamente ativa, ela reagiria com os radicais oxidantes e com peróxidos de hidrogênio formados durante a irradiação (THERMAN e SEPPALA, 1959).

2.3. Diferenças na radiosensibilidade entre plantas intactas e de seus tecidos cultivados "in vitro"

Uma variedade de fatores, geralmente, condiciona o grau de radiosensibilidade de uma planta (SPARROW e CHRISTENSEN, 1953). como por exemplo, o tipo de célula, a fase do ciclo nuclear ou o nível de ploidia conforme observaram SAX e SWANSON (1941), em micrôsporos de *Tradescantia*. Com relação à ploidia, especificamente, os autores observaram que os micrôsporos haplóides irradiados eram praticamente duas vezes mais susceptíveis à formação de aberrações cromossômicas em relação aos micrôsporos diplóides.

Quanto as diferenças de radiosensibilidade propriamente ditas, entre plantas intactas e seus respectivos tecidos cultivados "in vitro", VENKETESWARAN e PARTANEN (1966), foram talvez os primeiros a se preocuparem com o problema. As diferenças na radiosensibilidade das plântulas e dos tecidos de *Nicotiana tabacum* cultivados "in vitro", deveriam, segundo estes autores, ser pesquisados ao nível da organização celular destes dois sistemas. O meristema das plantas intactas

representaria o "sistema fechado", sendo constituído por um pequeno número de células meristemáticas, todas diplóides, com elevada atividade mitótica e capacidade morfogenética e dependentes do resto do organismo, tanto nutricional quanto funcionalmente. Pelo fato das plantas representarem um sistema funcionalmente integrados, estes seriam consequentemente, mais sensíveis à radiação do que os tecidos cultivados "in vitro". Estes, contrariamente, representariam um "sistema aberto", cujas células apresentariam uma pequena interdependência entre si, atuando cada uma delas como agente livre, dependendo para a sua proliferação apenas a quantidade de meio, somando-se a estes fatos, seus níveis variáveis de ploidia, chegar-se-ia a um sistema precariamente integrado e consequentemente, mais radiorresistente.

Este mesmo comportamento foi observado por BAJAJ (1971) entre plantas intactas de *Phaseolus vulgaris*, *Linum usitatissimum* e *Anagallis arvensis* e seus respectivos tecidos mantidos "in vitro". As diferenças da radiosensibilidade foram devidas, possivelmente, ao estado indiferenciado dos calos, aos seus diferentes níveis de ploidia, às diferenças no tamanho e maturidade das células, ao volume nuclear, ao tamanho dos cromossomos e a menor interdependência celular.

Todavia, nem sempre as alterações na radiosensibilidade dos tecidos estabelecem-se necessariamente como nos casos anteriormente citados. Modificações de radiosensibilidade tem sido observadas entre tecidos de origem comum quan

do mantidos "in vitro" por diferentes períodos de tempo. OPA-
TRNY (1974) verificou que explantes medulares de *Nicotiana ta*
bacum, cv. Wisconsin 38, eram várias vezes mais sensíveis à
doses de radiação gama de 1 a 150 Krad, do que os calos oriun
dos do mesmo tecido (porém do cv. Virginia Bright Italia), man
tidos em cultura por um período de 3 anos. Apesar do autor
não desprezar a possibilidade de ocorrência de uma possível
interferência da especificidade taxonômica sobre os resulta
dos obtidos, atribuiu entretanto, a maior radiorresistência
dos calos à sua maior mixoploidia, bem como ao seu estado fi
siológico particular.

3. MATERIAL E MÉTODO

A - Cultivo de Plantas

Os toletes com gemas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) cultivar NA5679 com onze meses de cultivo foram obtidos na Estação Experimental do Planalsucar, Município de Araras, S.P. Os toletes foram lavados com detergente, e os nós cortados, eliminando-se os internós. Em seguida, os mesmos foram lavados com solução de hipoclorito de sódio 20% em água, e deixados durante 20 minutos em banho maria a 50°C. A seguir foram lavados em água corrente, tomando-se o cuidado para não danificar as gemas.

Os nós com gemas foram então colocados em bandejas contendo vermiculita esterilizada, regando-se diariamente com água destilada, mantidas dentro de câmara de germinação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12/12 hs (luz/escuro).

Após 25 dias de cultivo, a parte aérea das

plântulas de cana-de-açúcar, com aproximadamente 20 cm de altura foram colhidas, delas obtendo-se secções de aproximadamente 8 cm de comprimento, recebendo-os em um frasco contendo água.

As frações seccionadas foram tratadas com hipoclorito de sódio 20% durante 20 minutos, com agitação contínua, sendo em seguida colocadas em placas de Petri com água esterilizada em número aproximado de sete frações por placa.

As frações foram subseccionadas em tamanho aproximado de 1 cm cada, tamanho considerado ideal de um explante para irradiação e posterior cultivo em meio de cultura adequado.

No presente trabalho foram utilizadas 30 placas de Petri, contendo água destilada esterilizada e cerca de 35 explantes por placa.

B. Irradiação

B.3. Irradiação de explantes

A fonte de radiação gama utilizada foi a fonte de ^{60}Co (GAMMA CELL) pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), em Piracicaba, S.P. O material foi irradiado com uma taxa de dose = 146 Kv/hora; d = 44 cm; f = 6 fontes; T = 8' e as doses empregadas foram: 0 Kr, 5 Kr, 15Kr (baseando-se em Kerbauy, 1977).

Procedeu-se à irradiação da seguinte maneira:

Placas de Petri	Radiação	Tempo
10	0 Kr	0'
10	5 Kr	2'
10	15 Kr	6'

Imediatamente após a irradiação as placas foram levadas para a capela de Fluxo Laminar da Secção de Bioquímica de Plantas do CENA, onde se procedeu a transferencia dos explantes para os meios de cultura.

B.2. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para obtenção dos calos estão descritos em CROCOMO et al., 1979 (tanto para obtenção dos calos como para indução de formação da parte aérea ou de raiz nos calos já formados). Entretanto, como a finalidade do presente trabalho é a de estudar a modulação dos efeitos de doses de radiação através da adição de fatores de crescimento, estes foram acrescentados no meio de calos (M.C.). Os reguladores de crescimento utilizados foram cinetina e ácido indolilacético (AIA). Nesse sentido foram utilizadas as seguintes combinações de cinetina e AIA, sendo que os explantes foram distribuídos aos meios de cultura da seguinte maneira:

Dose de radiação (Kr)	Número de explantes	mg/l de ci- netina	mg/l de ácido in- dolilacético
0	22	0	0
0	22	0	1
0	22	0	5
0	22	1	0
0	22	1	1
0	22	1	5
0	22	5	0
0	22	5	1
0	22	5	5
5	22	0	0
5	22	0	1
5	22	0	5
5	22	1	0
5	22	1	1
5	22	1	5
5	22	5	0
5	22	5	1
5	22	5	5
15	22	0	0
15	22	0	1
15	22	0	5
15	22	1	0
15	22	1	1
15	22	1	5
15	22	5	0
15	22	5	1
15	22	5	5

Foram realizados 27 tratamentos, utilizando-se 22 frascos de cultura para cada tratamento para permitir um melhor acompanhamento do desenvolvimento dos calos em condições assépticas.

O meio de cultura utilizado foi o desenvolvido por CROCOMO et al., 1979, para crescimento de calos. Esse meio tinha a seguinte constituição:

a) Solução salina de MURASHIGE e SKOOG (1962)	
b) Sacarose	20,0 g/l
c) Tiamina	0,001 g/l
d) Inositol	0,1 g/l
e) 2,4-D	0,003 g/l
f) Água de coco	100 ml/l
g) Arginina	0,060 g/l
h) Ágar	8,0 g/l
i) pH	5,8

B.3 - Transferência dos Explantes

Os meios de cultura foram distribuídos em frascos de cultura, num volume de aproximadamente 10 ml. Os frascos contendo os meios, foram autoclavados a 120°C sob pressão de uma atmosfera, durante 20 minutos.

A transferência dos explantes foi efetuada no dia imediato ao da preparação dos meios, na câmara de fluxo laminar.

As culturas foram mantidas em fotoperíodo de 12 em 12 horas (luz e escuro), 26/22°C, durante quatro meses, realizando-se observações semanais sobre o desenvolvimento dos calos.

Nessas observações foram dadas notas qualitativas baseadas em padrões selecionados entre os frascos de cultura.

No final do experimento foram medidos:

a) massa de matéria fresca; b) massa de matéria seca (após a secagem do material em estufa a 30°C, com circulação de ar; c) proteína e d) aminoácidos. A proteína foi determinada pelo método de LOWRY et al. (1951); os aminoácidos foram determinados após hidrólise ácida (HCl 6N) em analisador automático de aminoácidos de Beckman, modelo 120C.

B.4. Irradiação de calos

Explantes de cana-de-açúcar não irradiados foram transferidos para meio de desenvolvimento de calos (M.C.). Os calos formados foram divididos em várias porções aproximadamente iguais, as quais então foram submetidas às doses de radiação gama 0,5 e 15 Kr. Para serem irradiados, os calos foram transferidos para Placas de Petri e levados para a sala de irradiação do CENA/USP, Piracicaba.

Imediatamente após a irradiação, os calos foram inoculados em meio M.C., contendo os reguladores de cres-

cimento cinetina e AIA, seguindo-se os mesmos tratamentos utilizados para o desenvolvimento "in vitro" dos explantes irradiados como descrito anteriormente.

C. Cortes histológicos

Os calos advindos dos explantes submetidos aos vários tratamentos foram examinados histologicamente, utilizando-se o fixador de Carnoy.

As lâminas foram examinadas ao microscópio óptico, colorindo-se o material com hematoxilina férrica de Heidenhain.

Foram fotografadas no Setor de Citogenética do Departamento de Genética da ESALQ/USP lâminas preparadas pelo método do micrótomo, utilizando como material calos obtidos a partir de explantes irradiados de cana-de-açúcar. Utilizou-se um fotomicroscópio Zeiss e empregando-se objetivas de 45 X e 100 X para as fotografias.

4. RESULTADOS

4.1. Análises histológicas

As análises histológicas foram realizadas nos calos produzidos nos explantes de cana-de-açúcar submetidos a várias doses de radiação gama. Para apresentação dos resultados dessas análises foram selecionados alguns tratamentos que consideramos típicos dentro do contexto do presente trabalho. Ou seja, acompanhar, neste estágio do desenvolvimento do mesmo, as possíveis alterações citológicas que ocorrem quando tecido de cana-de-açúcar é exposto à agentes mutagênicos físicos e em seguida cultivado em presença de quantidades crescentes de reguladores de crescimento, no caso, cinetina e ácido indolilacético (AIA).

Quando tecido de cana-de-açúcar é exposto à 15 Kr e em seguida cultivado em 5 mg/l de AIA e ausência de cinetina, as células apresentam-se citologicamente diferentes

(Foto nº 1), evidenciando diferenças genéticas notórias. A Foto nº 1 mostra 3 células citologicamente diferentes: a maior apresenta um núcleo e um nucleólo; a de tamanho intermediário apresenta 2 núcleos, cada um com um nucleólo e a terceira célula (a menor) apresenta um núcleo binucleolado.

Certamente há variação cromossômica (número e estrutura) que acarreta diferentes padrões de diferenciação histológica, o que por sua vez acarreta diferentes padrões de desenvolvimento e crescimento de calos.

Em tecido não irradiado (0 Kr) e crescendo em presença de 5 mg/l de cinetina e 1 mg/l de AIA observa-se (Foto nº 2) uma organização lamelar com células com diferentes padrões de diferenciação, sugerindo tratar-se de início de desenvolvimento de tecido foliar. Em contrapartida, em presença de 5 Kr, 5 mg/l cinetina e 1 mg/l de AIA a diferenciação histológica mostra diferentes tipos de tecidos formados, onde se notam agrupamentos relativamente uniformes de células formando um embrióide (estrutura semelhante a um embrião) células que mostram um aspecto típico correspondente ao início de diferenciação de tecidos da folha (Foto nº 3).

Um número relativamente grande de células não diferenciadas é observado, as quais apresentam tamanho, estrutura e forma variáveis. Entretanto, quando nessa mesma dose de radiação (5 Kr) e de cinetina (5 mg/l), a quantidade de AIA é aumentada para 5 ml/l, observam-se embrióides que podem provavelmente originar raízes ou caules (Foto nº 4).

Foto 1. Três células apresentando aspectos diferentes relacionados com núcleos e nucléolos.
15 Kr; 0 mg/l cinetina; 5 mg/l AIA.

Foto 2. Conjunto de células apresentando um conglomerado, que mostra as mesmas diferenciações citológicas.
0 Kr; 5 mg/l cinetina; 5 mg/l AIA.

Foto 3. Conglomerado de células mostrando 2 embriões, um possível tecido de folhas e um número relativamente grande de células não diferenciadas.
5 Kr; 5 mg/l cinetina; 1 mg/l AIA.

Foto 4. Tecido apresentando organização lamelar com células mostrando diferentes padrões de diferenciação.
0 Kr; 5 mg/l cinetina; 1 mg/l AIA.

Foto 5. Dois embriões nos calos de cana-de-açúcar.
5 Kr; 5 mg/l cinetina; 5 mg/l AIA.

Foto 6. Dois tipos de aspectos de células diferenciadas nos calos de cana-de-açúcar.
5 Kr; 1 mg/l cinetina; 5 mg/l AIA.

Na mesma dose de radiação (5 Kr) e em presença de 1 mg/l de cinetina e 5 mg/l de AIA, notam-se dois tipos de células diferenciadas nos calos de cana-de-açúcar (Foto nº 5) não se podendo afirmar categoricamente a que tipo de tecido poderiam pertencer.

Quando explantes de cana-de-açúcar foram irradiados com a dose de 15 Kr, e então cultivados em presença de 1 mg/l de cinetina e 1 mg/l de AIA, os cortes histológicos mostraram células com núcleos e nucleólos apresentando variação morfológica e numérica, indicando a ocorrência de variações citológicas e genéticas nos calos (Foto nº 6).

4.2. Análises fisiológicas e bioquímicas ,

4.2.1. Desenvolvimento dos calos (produzidos pelos explantes irradiados)

Os explantes, irradiados ou não, foram cultivados in vitro em presença de quantidades crescentes dos reguladores de crescimento cinetina e ácido indolilacético (AIA). Nesses meios de cultura passaram a desenvolver-se, desdiferenciando-se em calos, os quais formaram-se inicialmente as extremidades dos explantes. Os calos foram então transferidos para meio condicionador de calos (MC), em presença das mesmas quantidades de cinetina e AIA, conforme o tratamento respectivo.

O desenvolvimento dos calos foi acompanhado se manalmente, dando-se nota de 0 a 3, zero significando não desenvolvimento, e 3 bom desenvolvimento, em comparação com padrões escolhidos entre todos os tratamentos.

Os dados (notas) obtidos foram analisados estatisticamente, o delineamento, completamente casuali zado, com desdobramento de graus de liberdade a fim de se verificar os efeitos de doses de radiação, cinetina e AIA, conforme o esquema abaixo:

Fonte de variação	G.L.
Entre doses de radiação (ajustado)	2
Cinetina (ajustado)	2
AIA (ajustado)	2
Demais contrastes	I - 7
Tratamentos	I - 1
Resíduo	N - I
Total	N - 1

onde,

I = o número de tratamentos remanescentes.

Obs.: A análise estatística foi feita sobre da dos obtidos somente de alguns tratamentos, os quais passaram a ser chamados de "remanescentes".

As Figuras 1, 2 e 3 mostram o comportamento fi

Figura 1. Desenvolvimento de calos de cana-de-açúcar produzidos a partir de explantes irradiados, em diferentes épocas de amostragem.

Figura 2. Desenvolvimento de calos de cana-de-açúcar produzidos à partir de explantes irradiados, em diferentes épocas de amostragem. Efeito da dose de cinetina.

Figura 3. Desenvolvimento de calos de cana-de-açúcar produzidos à partir de explantes irradiados, em diferentes épocas de amostragem. Efeito da dose de AIA.

siológico, em termos de desenvolvimento dos calos em várias épocas de amostragem (notas). É notório o efeito deletério da radiação gama sobre o desenvolvimento dos calos (Figura 1). Contudo, esse efeito negativo foi contrabalançado pelo efeito de cinetina (Figura 2) e de AIA (Figura 3). A concentração de 1 mg/l de cada um desses reguladores de crescimento, teve um efeito positivo sobre o desenvolvimento das células. Pode-se considerar que a presença de ambos teve um efeito sinérgico positivo, "revertendo" uma possível ação deletéria da radiação gama sobre o tecido de cana-de-açúcar.

Os resultados das análises estatísticas sobre os dados (notas) observados em diversas épocas, foram os seguintes:

1ª Época: Não se observaram diferenças significativas entre as médias de doses de radiação, cinetina e AIA.

2ª Época: São significativas as diferenças entre as médias de doses de radiação, sendo a nota média decrescente com o aumento da dose. Não são significativas as diferenças entre as doses de cinetina e AIA.

3ª Época: São significativas as diferenças entre as médias de doses de radiação, sendo a nota média decrescente com o aumento da dose.

Verificaram-se, também, diferenças entre as médias de doses de cinetina, onde a dose intermediária apresentou nota média maior que as doses extremas, não havendo diferenças entre estas.

Quanto ao AIA, verificaram-se diferenças entre as doses zero e um (nota média maior para a dose um), zero e cinco (nota média maior para a dose cinco). Não é significativa a diferença entre as doses um e cinco.

4ª Época: São significativas as diferenças entre as doses de radiação, onde as notas médias decrescem com o aumento da dose.

Também, são significativas as diferenças entre as doses de cinetina, com a dose intermediária (dose um) apresentando nota média maior que as doses extremas (zero e cinco).

Para AIA, verificaram-se também significativas as diferenças entre doses zero e um e zero e cinco, não havendo diferença entre doses um e cinco.

5ª Época: Observam-se diferenças significativas entre as doses de radiação zero e cinco e entre zero e quinze, não havendo diferença significativa entre as doses cinco e quinze.

Contrariamente aos resultados das análises anteriores, nesta época, a dose intermediária foi menor que a dose extrema (quinze) embora a diferença entre as médias de ambas não seja significativa.

São significativas, também, as diferenças entre as médias de doses de cinetina. Como nas análises anteriores, a dose intermediária (dose um) apresenta nota média maior que as doses extremas, e entre estas, a dose extre-

ma zero apresenta nota média maior que a dose extrema quinze.

Para o AIA, verificam-se diferenças significativas entre as doses, sendo que a dose intermediária (dose um) apresenta nota média maior que as doses zero e cinco, não sendo significativa entre estas doses extremas.

As análises de variância feita para as várias épocas de amostragem (notas) estão no Apêndice I.

4.2.2. Desenvolvimento dos calos (a partir de calos irradiados)

A Figura 4 mostra que a radiação gama determina decréscimo no desenvolvimento dos calos de cana-de-açúcar "in vitro", com a mesma tendência observada na Figura 1 (calos vindos de explantes irradiados).

Não foram observadas diferenças significativas (ao nível de 5%) entre as médias dos três tratamentos (combinações de doses: 0:0:0; 0:1:1; 0:1:5). De modo geral, houve uma tendência a não recuperação do desenvolvimento dos calos pela presença de cinetina no meio de cultura. Entretanto, a presença de AIA pareceu determinar uma recuperação no desenvolvimento dos calos irradiados.

As análises das variâncias deste ensaio estão no Apêndice 2.

Figura 4. Desenvolvimento de calos de cana-de-açúcar após serem submetidos a radiação gama, em diferentes épocas de amostragem.

Figura 5. Massa de matéria fresca e massa de matéria seca de ca-
los produzidos por explantes de cana-de-açúcar subme-
tidos a radiação gama.

4.2.3. Crescimento dos calos (produzidos nos explantes)

A Figura 5 mostra as variações na matéria fresca e matéria seca dos calos produzidos nos explantes de cana-de-açúcar submetidos a várias doses de radiação gama. Observa-se um declínio na matéria seca dos calos de explantes expostos a 5 Kr e 15 Kr. O valor da matéria seca, entretanto, permaneceu praticamente constante em todos os tratamentos.

As Fotos nº 7 e 8 mostram o crescimento e desenvolvimento dos calos nos vários tratamentos. Observe-se a necessidade da presença de cinetina para "reversão" do processo de deterioração causado pela dose de 15 Kr (tratamentos 15:0:1; 15:1:0; 15:1:1). Nos tratamentos com 5 Kr, as presenças de cinetina e AIA nos meios de cultura são necessárias para o processo de "reversão". Note-se a formação de algumas raízes nos tratamentos 0 Kr. Nestes tratamentos os calos apresentaram-se mais bem desenvolvidos do que nos demais tratamentos.

Entre todos os tratamentos, a presença de cinetina e AIA na razão 1 mg/l : 1 mg/l foi a que melhor resultados proporcionou em termos de "reversão" do processo de deterioração causado pela radiação gama, corroborando os dados acima discutidos referentes à análise estatística das "notas" conferidas às culturas.

Foto 7. Desenvolvimento de calos, produzidos a partir de explantes foliares de cana-de-açúcar, submetidos a diferentes doses de irradiação gama e crescendo em diferentes concentrações de cinetina e AIA.
1º dígito, irradiação; 2º dígito, cinetina; 3º dígito, ácido indolilacético.

Foto 8. Desenvolvimento de calos, produzidos a partir de explantes foliares de cana-de-açúcar, submetidos a diferentes doses de irradiação gama e crescendo em diferentes concentrações de cinetina e AIA.
1º dígito, irradiação; 2º dígito, cinetina; 3º dígito ácido indolilacético.

4.2.4. Compostos nitrogenados

As análises de proteína e de aminoácidos foram realizadas tanto nos calos produzidos pelos explantes de cana-de-açúcar irradiados (C.E.I.) quanto nos calos diretamente irradiados (C.I.).

A Tabela 1 mostra os níveis de aminoácidos nos materiais analisados pertinentes aos vários tratamentos, bem como o teor de proteína nos mesmos.

Pode-se observar que arginina foi o aminoácido que mais sofreu variações, inclusive aumentando drásticamente em alguns tratamentos, como no caso da presença de cinetina e AIA na razão 1:1 (quantidades absolutas de 1 mg/l de cada um deles), em relação ao tratamento 0:0:0 (C.E.I. ou C.I.).

Os outros aminoácidos básicos lisina e histidina não mostraram grandes diferenças em todos os tratamentos.

Por sua vez, os níveis dos aminoácidos ácido glutâmico e ácido aspártico permaneceram elevados em todos os tratamentos, seguidos de glicina e alanina.

Prolina, aminoácido relacionado metabolicamente com o ácido glutâmico, também apresentou variações, tendo o seu teor aumentado principalmente quando se consideram nos tratamentos C.E.I., as presenças de cinetina e AIA. O mesmo é observado em relação aos aminoácidos isoleucina, leucina, tirosina e fenilalanina.

O nível de proteína foi maior nos calos produzidos pelos explantes irradiados (C.E.I.), em praticamente todas as razões radiação:cinetina:AIA, do que nos calos diretamente irradiados (C.I.).

Tabela 1. Níveis de aminoácido e de proteína solúvel nos calos provindos de explantes de cana-de-açúcar submetidos à radiação gama, e calos diretamente irradiados.

Tratamentos	C.E.I.	C.I.	C.E.I.	C.I.	C.E.I.	C.E.I.	C.E.I.	C.I.	C.E.I.	C.E.I.	C.E.I.	C.I.	C.I.	C.I.	C.I.	C.I.	C.I.	C.I.	C.I.	C.I.	C.I.
Aminoácidos	0:0:0	0:0:0	0:1:1	0:1:1	0:5:0	0:5:5	0:5:1	5:0:1	5:0:1	5:0:5	5:5:0	15:1:5	0:0:1	0:1:0	5:0:0	5:1:0	5:1:1	15:0:0	15:0:1	15:1:0	15:1:1
Lisina	0,75	2,54	3,77	2,09	2,75	2,30	3,06	3,21	2,96	3,13	2,17	3,38	2,38	2,00	2,22	2,26	2,17	1,80	1,92	2,13	2,04
Histidina	0,22	0,62	1,16	0,49	0,93	0,66	0,93	0,58	1,02	1,42	0,75	1,11	0,58	0,40	0,71	5,77	0,44	0,49	0,31	0,49	0,11
Arginina	0,54	0,89	3,84	0,85	4,83	2,04	2,35	0,80	2,78	1,69	1,84	3,58	0,75	0,74	0,75	0,80	6,53	0,60	0,75	0,70	7,05
Ácido Aspártico	3,71	6,60	6,33	7,26	8,36	5,51	15,10	5,55	7,78	8,79	5,31	7,71	6,58	6,90	6,28	7,54	4,91	7,24	6,78	7,56	6,72
Treonina	1,12	3,77	2,87	3,23	2,31	2,99	2,59	3,57	3,06	3,37	2,58	3,87	3,43	3,05	3,44	3,41	3,00	2,04	3,10	3,42	2,09
Serina	1,08	5,45	3,01	2,31	2,61	5,85	2,83	2,61	3,30	3,43	2,61	4,20	2,52	2,04	2,49	2,22	2,10	1,71	2,34	2,73	2,34
Ácido Glutâmico	4,43	5,54	9,74	5,08	12,73	7,73	9,99	4,79	11,79	9,59	6,59	11,46	5,00	4,02	4,46	4,84	4,80	4,93	5,47	6,13	5,55
Prolina	1,54	3,77	6,00	3,22	2,37	1,78	2,24	3,58	2,49	2,86	2,79	3,35	3,29	3,05	3,46	3,32	3,29	3,13	3,32	3,42	2,06
Glicina	2,20	7,77	4,41	6,19	4,52	5,15	4,62	7,59	4,99	5,47	4,88	7,39	7,35	6,22	6,76	6,50	6,78	7,02	7,04	7,03	6,43
Alanina	4,23	3,78	6,86	3,51	6,18	3,71	8,58	3,64	7,19	4,05	3,25	5,87	3,94	3,10	3,36	3,57	3,57	3,92	3,59	4,20	4,10
Valina	1,30	2,84	3,86	2,54	3,55	2,58	3,72	2,74	3,71	3,88	2,70	4,58	2,64	2,27	2,38	2,65	2,38	2,71	2,61	2,87	2,94
Isoleucina	0,71	1,79	2,63	1,57	1,87	1,61	2,07	1,65	2,21	2,29	1,64	2,88	1,68	1,46	1,50	1,61	1,43	1,46	1,46	1,76	1,61
Leucina	1,45	3,77	4,69	3,52	3,63	4,72	4,02	3,41	4,34	4,01	3,22	5,16	3,56	2,67	2,66	4,61	3,08	4,29	3,22	3,48	3,18
Tirosina	0,62	1,91	1,66	1,81	1,50	1,81	1,40	2,02	2,01	1,92	1,39	2,79	1,91	1,34	1,66	1,76	1,66	1,55	1,66	2,02	1,97
Fenilalanina	0,89	2,59	2,65	2,36	2,03	1,84	2,03	2,41	2,35	2,41	1,88	3,11	2,50	2,26	2,41	2,36	2,41	2,46	2,17	2,40	2,31
Proteína solúvel (%)	36,60	15,86	36,33	17,07	28,91	28,91	29,30	16,98	19,97	27,73	25,39	21,09	15,76	17,63	18,10	16,88	15,95	16,32	15,39	14,83	15,71

C.E.I. = Calo de explante irradiado; C.I. = Calo irradiado

1º dígito = dose de radiação gama

2º dígito = nível de cinetina (mg/l)

3º dígito = nível de ácido indolilacético (AIA) (mg/l)

5. DISCUSSÃO

Os calos são o produto da desdiferenciação do tecido, no presente caso, folhas internas de cana-de-açúcar, quando o mesmo é inoculado em meio de cultura contendo sais minerais, vitaminas, reguladores de crescimento, fonte de energia, em um dado valor pH, em condições assépticas.

No presente experimento, os explantes de cana-de-açúcar foram irradiados com radiação gama e imediatamente inoculados em meio contendo 2,4-diclorofenolindofenol (2,4-D), o qual promove a proliferação de calos. Além disso, os diversos meios utilizados continham diferentes combinações de cinetina e ácido indolilacético (AIA). A finalidade da utilização de ambos os reguladores foi a de reverter o processo de deterioração do tecido submetido à irradiação gama.

A radiação gama é utilizada como mutagênico físico, para obtenção de mutantes posteriormente selecionados para características desejáveis. Entretanto, a radiação gama

provoca alterações citológicas e metabólicas nos tecidos vegetais, o que pode ocorrer mesmo em baixas doses. O tecido, apresentando essas alterações, pode não se recuperar e se deteriorar. Desse modo, o objetivo do trabalho que seria o de se obter mutantes, não é atingido.

Contudo, como foi apresentado na Revisão Bibliográfica, tem sido observado que se o tecido irradiado for cultivado "in vitro" em presença de determinados reguladores de crescimento como cinetina e AIA, pode sobrepujar essa condição, desdiferenciar-se em calos, os quais, em meios adequados podem regenerar plantas intactas. Estas, então, podem ser submetidas a testes de seleção.

O exame dos cortes histológicos dos calos de cana-de-açúcar, advindos de explantes irradiados, mostrou que o tecido desdiferenciado apresentou mitoses durante um período bem restrito. Como qualquer órgão de crescimento, o tecido em cultura também deve apresentar como característica uma sequência ontogênica da diferenciação celular desse tipo: células iniciais → células em trânsito → células maduras.

Quando se trata de culturas de tecidos, provavelmente as células readquirem condições embrionárias, ou seja, células diferenciadas tornam-se meristemáticas ou "primitivas", desdiferenciando-se. Nessas células desdiferenciadas evidentemente é mantida a potencialidade genética, mas os mecanismos regulatórios modificam-se; além dessa modificação, ocorrem também alterações nas interações núcleo - citoplas-

ma, nas estruturas e funções das organelas citoplasmáticas, no nível intercelular, no transporte hormonal, e no nível extracelular. As células que eram inicialmente circundadas por células semelhantes do tecido e do órgão do qual foi explantada, passam agora a ser envolvidas por um meio totalmente diferente. Deve-se então determinar a constituição desse meio, física e quimicamente, para que sejam imitadas as condições do meio que envolvem o zigoto ou o embrião.

Um dos efeitos mais visíveis da radiação gama foi sobre o desenvolvimento dos calos. Nestas, áreas necróticas começaram a aparecer na dose de 5 Kr, o número das mesmas crescendo grandemente à dose de 15 Kr. Essas áreas necróticas indicam uma intensa degradação dos componentes da parede celular. Observe-se que a matéria fresca dos calos produzidos pelos explantes irradiados cai grandemente. No caso dos calos diretamente irradiados (C.I.), esta queda é da ordem de 40%, em relação aos calos não irradiados.

O metabolismo de compostos nitrogenados é também alterado devido à irradiação gama. Alterações na fração de aminoácidos proteicos foi observada principalmente nos calos provindos de explantes irradiados (C.E.I.).

Nesses calos, a presença de cinetina e/ou de AIA aumentou o nível de quase todos os 15 aminoácidos detectados. O aminoácido que sofreu maiores alterações foi arginina, o que foi devido ao efeito de "reversão" de cinetina e AIA presentes na razão 1 mg/l : 1 mg/l. Essa observação enfatiza o fa-

to de que arginina é intensamente metabolizada nos tecidos de cana-de-açúcar, onde influencia o crescimento, seja "in vivo" ou "in vitro", como no presente experimento.

Os outros dois aminoácidos básicos, histidina e lisina, não sofreram grandes variações devido às doses de radiação + cinetina e/ou AIA. O nível de histidina permaneceu baixo em todos os tratamentos.

Os ácidos glutâmico e aspártico estavam presentes em altos níveis em todos os tratamentos, no que foram seguidos por glicina e alanina.

Apesar do efeito de "reversão" de cinetina e AIA, pode-se especular que o aumento em muitos dos aminoácidos proteicos tenha sido uma consequência da degradação da fração proteica que ocorreu como resultado da ação da radiação gama.

Essas alterações bioquímicas podem ter sido responsáveis pelo decréscimo no crescimento do tecido de cana-de-açúcar irradiado.

O crescimento de tecido internodal de cana-de-açúcar "in vitro" exige citocininas e auxinas, as quais promovem a síntese de DNA, mitose e citocinese. As interações entre esses reguladores de crescimento são sinérgicas.

No presente trabalho, a medida que as doses de radiação aumentaram, a massa celular, em ausência de cinetina e AIA, apresentaram um incremento em células não-diferenciadas, baixa frequência de divisões celulares e tecido morto.

Por outro lado, quando esses reguladores de crescimento foram adicionados aos meios de cultura, foram observadas divisão celular e diferenciação.

Embriões estavam presentes nos vários tratamentos combinando 5 Kr + cinetina e AIA (1:5; 5:1; 5:5), ao mesmo que foi constatada divisão celular.

Entretanto, no tratamento 5 Kr + 5 mg/l AIA, em ausência de cinetina, aparentemente ocorreu divisão celular uniforme, sem diferenciação celular e nenhuma formação de embriões.

Desse modo, a dose de radiação gama 5 Kr pode ser utilizada para induzir mutação nos calos, os quais proliferarão na presença de cinetina e AIA.

Células necróticas e muito baixa frequência de divisões celulares foram observadas à dose de 15 Kr, cujos calos, contudo, continham alguns embriões e células meristemáticas em processo de divisão, na ausência de cinetina e AIA. Nesses calos, grandes áreas eram células mortas.

À dose de 15 Kr, e em presença de cinetina e AIA (1:5), foram observados embriões em vários estádios estruturais, e também um número relativamente grande de células não diferenciadas com diferentes tamanhos, formas e estruturas.

Muito provavelmente mutações, induzidas pela radiação gama, ocorreram nas células dos calos diretamente irradiados, ou produzidos pelos explantes de cana-de-açúcar ir-

radiados. Essas mutações seriam reveladas através das variações citológicas, acompanhadas por variações bioquímicas nas células meristemáticas, indicando diferenças genéticas. Por outro lado, deve-se enfatizar que o meio de cultura heterogêneo favorece diferentes perfis de desenvolvimento citológico e comportamento bioquímico nas células de cana-de-açúcar "in vitro". As variações nos perfis da diferenciação celular observadas nos calos, poderá também ser devida à mixoploidia cromossômica dos vários tipos de tecido da planta de cana-de-açúcar.

6. CONCLUSÕES

A radiação gama determina variações citológicas e bioquímicas nas células de cana-de-açúcar presentes seja em calos obtidos a partir de explantes foliares internodais submetidos às doses de 5 Kr ou de 15 Kr, seja em calos irradiados diretamente com as mesmas doses, indicando a existência de possíveis mutações.

O efeito deletério da radiação gama sobre as células de cana-de-açúcar foi revertido, nas condições do presente experimento, pela ação de reguladores de crescimento, principalmente quando presentes nos meios de cultura na razão de 1 mg/l de cinetina: 1 mg/l de ácido indolilacético.

Desse modo, pode-se recomendar a utilização de radiação gama para induzir mutações em células e tecidos de cana-de-açúcar, desde que os mesmos sejam posteriormente cultivados in vitro em presença de cinetina e ácido indolilacético, o que permitirá o desenvolvimento de calos acompanhado de posterior diferenciação em plantas intactas.

7. LITERATURA CITADA

- BAJAJ, Y.P.S., 1971. Direct and indirect effects of gamma irradiation on plant tissue cultures. In: International Symposium on Use of Isotopes and Radiation in Agriculture and Animal Husbandry Researcha, New Delhi, p.830-839.
- BANKES, D.A. e A.H. SPARROW, 1969. Effect of acute gamma irradiation on the incidence of tumor-like structures and adventitious roots in lettuce plants. Radiation Botany, Oxford, 9: 21-26.
- BELLI-DONINI, M.L. e T. CERVIGNY, 1967. Effects of radiation on kinetin solutions. Nature, London, 214: 468-470.
- CROCOMO, O.J.; W.R. SHARP, M.T.V. CARVALHO, 1979. Controle da morfogênese e desenvolvimento de plantas em cultura de tecido de cana-de-açúcar. In: Anais 1º Congresso Nacional de Técnicos Açucareiros, Maceió, v.1., p. 241-43.
- DAS, N.K.; K. PATAU e F. SKOOG, 1956. Initiation of mitosis and cell division by kinetin and indoleacetic acid in excised tobacco pith tissue. Physiologia Plantarum, København, 9: 640-651.

DEGANI, N. e D. PICKHOLZ, 1973. Direct and indirect effect of gamma irradiation on the differentiation of tobacco tissue culture. Radiation Botany, Oxford, 13: 381-383.

GARAY, A.S. e F. SÁGI, 1962. Effect of U.V. radiation on the auxin-auxinoxidase-phenol complex and on the sensitivity of plant tissues. Physiologia Platarum, Kobenhavn, 15: 194 - 199.

GORDON, S.A., 1957. The effects of ionizing radiation plants: biochemical and physiological aspects. Quarterly Review of Biology, Baltimore, 32: 3-14.

HABER, A.H. e H.J. LUIPOLD, 1960. Effects of gibberellin on gamma-irradiated wheat. American Journal of Botany, Lancaster, 47: 140-144.

HABER, A.A.; W.L. CARRIER e D.E. FOARD, 1961. Metabolic studies of gamma-irradiated wheat growing without cell division. American Journal of Botany, Lancaster, 48: 431-438.

HALPERIN, W., 1973. The use of cultured tissue in studying development problems. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 51: 1801-1806.

HANDRO, W., 1974. Progressos recentes no controle da morfogênese vegetal. Ciência e Cultura, São Paulo, 26: 340 - 346.

- HAYASHI, M.; T. KOBAYASHI e G. YOSHII, 1974. The effect of gamma-irradiation on deoxyribonucleoprotein as a template for RNA synthesis. Biochimica et Biophysica Acta, New York, 366: 288-291.
- HOLMSEN, T.W.; H.J. TEAS e A.L. KOCH, 1964. Inhibition of geotropism by radiation: Reversal of the inhibition by auxins. Radiation Botany, Oxford, 4: 413-416.
- JABLONSKI, J.R. e F. SKOOG, 1954. Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith tissue. Physiologia Plantarum, Kobenhavn, 7: 16-24.
- JORDAN, W.R. e A.H. HABER, 1974. Cytokinins and mitotic inhibition in "gamma-plantlets". Radiation Botany, Oxford, 14: 219-222.
- KERBAUY, G.B., 1977. Efeitos da radiação gama sobre o crescimento "in vitro" de explantes medulares de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. IAC-70), São Paulo, USP, 96 p. (Dissertação de Mestrado).
- KING, G.S., 1949. Direct and transmitted X-ray effects on growth of tobacco callus in vitro. American Journal Botany. Lancaster, 36: 265-270.
- KING, J.W. e A.W. GALSTON, 1960. Some effects of X-irradiation on the endogenous and auxin-induced growth of etiolated pea stem tissue. Radiobiology, Bologna, 1: 238-244.
- KLEIN, R.M. e H.H. VOGEL, 1956. Necessity of indolacetic acid for the duplication of crown-gall tumor cell. Plant Physiology, Lancaster, 31: 17-22.

- KLEIN, R.M. e D.T. KLEIN, 1971. Post-irradiation modulation of ionizing radiation damage to plants. Botanical Review, Lancaster, 37: 397-436.
- LOCKHART, J.A., 1961. Interactions between gibberellin and various environmental factors on stem growth. American Journal of Botany, Lancaster, 48: 516-525.
- LOWRY, O.H.; N.J. ROSENBROUGH; A.L. FARR e R.J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal Biological Chemistry, Baltimore, 193: 265-275.
- MATHUR, P.B., 1963. Reversal of gamma-ray-induced susceptibility to decay of potato tubers and tomato fruit by methyl ester of indolyl -3-acetic acid. Nature, London, 199:1007-1008.
- MIKA, E.K., 1952. Effects of indolacetic acid on root growth of X-irradiated peas. Botanical Gazette, Chicago, 113: 285-293.
- MILLER, C.O.; F. SKOOG; M.H. Von SALTZA e F.M. STRONG, 1955. Kinetin, a cell division factor form deoxyribonucleic acid. Journal of the American Chemical Society, Easton, 77:1392.
- MILLER, C.O.; F. SKOOG; F.S. OKUMURA; M.H. Von SALTZA e F.M. STRONG, 1956. Isolation, Structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. Journal of the American Chemical Society, Easton, 78: 1375-1379.
- MIURA, K.; T. HASHIMOTO e H. YAMAGUCHI, 1974. Effect of gamma-irradiation on cell elongation and auxin level in *Avena* coleoptiles. Radiation Botany, Oxford, 14: 207-215.

- MURASHIGE, T. e F. SKOOG, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Kobenhavn, 15: 473-497.
- NITSCH, J.P. e D. BUI DANG HA, 1967. Effect de l'ordred'application de l'acide indolyl-3-acétique et la kinetine sur la division cellulaire. Compte rendu hebdomadaire des Séances de l'Academie des Sciences, Paris, 264: 281-291.
- OPATRŇ, Z., 1974. Effect of gamma-radiation of the growth of primary and "long-term" tissue cultures (*N. tabacum* L.). Biologia Platarum, Praha, 16: 418-425.
- PATAU, K.; N.K. DAS e F. SKOOG, 1957. Induction of DNA synthesis by kinetin and indoleacetic acid in excised tobacco pith culture. Physiologia Plantarum, Kobenhavn, 10: 949 - 966.
- POLLARD, E.C., 1964. Ionizing radiation: effect on genetic transcription. Science, New York, 146: 927-929.
- QUASTLER, H.; M.D. e M. BAER, 1950. Inhibition of plant growth by irradiation. V. Radiation effects on initiation and completion of growth. Cancer Research, Baltimore, 10: 604-612.
- ROMANI, R.J., 1966. Biochemical responses of plant systems to large doses of ionizing radiation. Radiation Botany, Oxford, 6: 87-104.
- SAX, K. e C.P. SWANSON, 1941. Differential sensitivity of cells to X-rays. American Journal of Botany, Lancaster, 28: 52-59.

- SIEVERT, R.C. e A.C. HILDEBRANDT, 1965. Variations with in single cell clones of tobacco tissue cultures. American Journal of Botany, Lancaster, 52: 742-750.
- SKOOG, F., 1935. The effect of X-irradiation on auxin plant growth. Journal of Cellular and Comparative Physiology, Philadelphia, 7: 227-270.
- SKOOG, F. e C.O. MILLER, 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symposia of the Society for Experimental Biology, Cambridge, 11: 118-130.
- SPARROW, A.H. e E. CHRISTENSEN, 1953. Tolerance of certain higher plants of chronic exposure to gamma radiation from cobalt-60. Science, New York, 118: 697-698.
- SPIEGEL-ROY, P. e J. KOCHBA, 1973. Stimulation of differentiation in orange (*Citrus sinensis*) ovular callus in relation to irradiation of the media. Radiation Botany, Oxford, 13: 94-103.
- TANO, S., 1971. Effects of gamma-irradiation on the biosynthesis of nucleic acids in barley seeds. Radiation Botany, Oxford, 11: 219-224.
- THERMAN, E. e M. SEPPÄLÄ, 1959. Indole-3-acetic acid as protective substance against X-rays. Physiologia Plantarum, Kobenhavn, 12: 716-719.
- USSUF, K.K. e P.M. NAIR, 1974. Effect of gamma irradiation on the indole acetic acid synthesizing system and its significance in sprout inhibition of potatoes. Radiation Botany, Oxford, 14: 251-256.

- SPARROW, A.H. e E. CHRISTENSEN, 1953. Tolerance of certain higher plants of chronic exposure to gamma radiation from cobalt-60. Science, New York, 118: 697-698.
- SPIEGEL-ROY, P. e J. KOCHBA, 1973. Stimulation of differentiation in orange (*Citrus sinensis*) ovular callus in relation to irradiation of the media. Radiation Botany, Oxford, 13: 97-103.
- TANO, S., 1971. Effects of gamma-irradiation on the biosynthesis of nucleic acids in barley seeds. Radiation Botany, Oxford, 11: 219-224.
- THERMAN, E. e M. SEPPALA, 1959. Indole-3-acetic acid as protective substance against X-rays. Physiologia Plantarum, Kobenharn, 12: 716-719.
- USSUF, K.K. e P.M. NAIR, 1974. Effect of gamma irradiation on the indole acetic acid synthesizing system and its significance in sprout inhibition of potatoes. Radiation Botany, Oxford, 14: 251-256.
- VENKETESWARAN, S. e C.R. PARTANEN, 1966. A comparative study of the effects of gamma radiation on organized and disorganized growth of tobacco. Radiation Botany, Oxford, 6: 13-22.
- WAGGONER, P.E. e A.E. DIMOND, 1952. Crown gall supression by ionizing radiation. American Journal of Botany, Lancaster, 39: 679-684.
- WEISS, J., 1960. Primary processes in the action of ionizing radiations on water: formation and reactivity of self-trapped electrons ("polarons"). Nature, London, 186: 751-752.

VENKETESWARAN, S. e C.R. PARTANEN, 1966. A comparative study of the effects of gamma radiation on organized and disorganized growth of tobacco. Radiation Botany, Oxford, 6: 13-22.

WAGGONER, P.E. e A.E. DIMOND, 1952. Crown gall suppression by ionizing radiation. American Journal of Botany, Lancaster, 39: 679-684.

WEISS, J., 1960. Primary processes in the action of ionizing radiations on water: formation and reactivity of self-trapped electrons ("polarons"). Nature, London, 186: 751 - 752.

WHITE, P.R., 1943. A handbook of plant tissue culture. Lancaster, Jaques Cattell. 277 p.

A P E N D I C E S

APÊNDICE I:

Análise da variância dos ensaios
com explantes irradiados.

AVALIAÇÃO DA 1ª ÉPOCA DE AMOSTRAGEM

Análise de variância

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	F
Entre doses de:			
Radiação	2	4,34	ns
Cinetina	2	1,90	ns
AIA	2	0,37	ns
Demais contrastes	17	0,53	
Tratamentos	23		
Resíduo	54	0,97	
Total	77		

Desvio padrão residual = 0,98

Média geral de notas = 1,81

Coeficiente de variação = 54 %

AVALIAÇÃO DA 2ª ÉPOCA DE AMOSTRAGEM

Análise de variância

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	F
Entre doses de:			
Radiação	2	15,12	*
Cinetina	2	2,43	ns
AIA	2	0,19	ns
Demais contrastes	18	0,48	
Tratamentos	24	-	
Resíduo	54	1,03	
Total	78		

Desvio padrão residual = 1,02

Média geral de notas = 1,80

Coeficiente de variação = 57 %

AVALIAÇÃO DA 3ª ÉPOCA DE AMOSTRAGEM

Análise de variância

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	F
Entre doses de:			
Radiação	2	13,52	16,29*
Cinetina	2	5,35	6,45*
AIA	2	1,08	1,30 ns
Demais contrastes	15	0,52	0,63
Tratamentos	21		
Resíduo	117	0,83	
Total	138		

Desvio padrão residual = 0,91

Média geral de notas = 1,96

Coeficiente de Variação = 46 %

AVALIAÇÃO DA 4ª ÉPOCA DE AMOSTRAGEM

Análise de Variância

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	F
Entre doses de:			
Radiação	2	13,83	*
Cinetina	2	10,52	*
AIA	2	1,37	ns
Demais contrastes	14	0,37	
Tratamentos	20		
Resíduo	114	0,73	
Total	134		
Desvio padrão residual = 0,61			
Média geral de notas = 2,14			
Coeficiente de Variação = 29 %			

AVALIAÇÃO DA 5ª ÉPOCA DE AMOSTRAGEM

Análise de Variância

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	F
Entre doses de:			
Radiação	2	7,65	11,6*
Cinetina	2	7,74	11,7*
AIA	2	0,23	0,3ns
Demais contrastes	11	0,60	0,9ns
Tratamentos	17		
Resíduo	79	0,66	
Total	96		
Desvio padrão residual = 0,81			
Média geral de notas = 2,20			
Coeficiente de Variação = 37 %			

(*) Significância a um nível inferior a 5% de probabilidade.

(ns) Não significativa ao nível de 5%.

APÊNDICE II

Análise da Variância dos Ensaios
com calos irradiados.

ANÁLISE DA 1ª ÉPOCA DE AMOSTRAGEM

Análise de variância

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	2	7,87	3,94	1,53ns
Resíduo	113	291,20	2,58	
Total	115	299,07		
Erro residual	1,61			
Média geral	2,79		C.V. = 57%	

Tratamentos	n	Média	$\Delta_{i1} = \Delta(\bar{x}_i - \bar{x}_1)$	$(\bar{x}_i - \bar{x}_1)$
0 : 0 : 0	7	1,86	$\Delta_{12} = 0,63$	0,93ns
0 : 1 : 1	85	2,79	$\Delta_{13} = 0,69$	1,20ns
0 : 1 : 5	24	3,06	$\Delta_{23} = 0,37$	0,27ns

ANÁLISE DA 2ª ÉPOCA DE AMOSTRAGEM

Análise de variância

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	2	2,11	1,06	2,30
Resíduo	25	11,41	0,46	
Total	27	13,52		
Erro residual	0,68			
Média geral	1,60		C.V. = 42%	

Tratamentos	n	Média	
0 : 0 : 0	4	1,00	$\Delta_{13} = 0,76$
0 : 1 : 1	23	1,72	$\Delta_{23} = 0,37$
0 : 1 : 5	23	1,72	$\Delta_{23} = 0,69$

ANÁLISE DA 3ª ÉPOCA DE AMOSTRAGEM

Análise de variância

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	2	1,53	0,76	0,45ns
Resíduo	79	134,64	1,70	
Total	81	136,17		
Erro residual	1,31			
Média geral	3,47		C.V. = 38%	

Tratamentos	n	Média	$\Delta_{i1}(\bar{x}_i - \bar{x}_1)$	$(\bar{x}_i - \bar{x}_1)$
0 : 0 : 0	2	3,75	$\Delta_{12}=0,96$	$0,50ns \bar{x}_1 - \bar{x}_3$
0 : 1 : 1	58	3,54	$\Delta_{13}=0,94$	$0,21ns \bar{x}_1 - \bar{x}_2$
0 : 1 : 5	22	3,25	$\Delta_{23}=0,33$	$0,29ns \bar{x}_2 - \bar{x}_1$