

INDUÇÃO E USO DE MUTAÇÕES "in vivo" E "in vitro" NO
MELHORAMENTO DO *Chrysanthemum morifolium* Ram.

RODRIGO ROCHA LATADO

Engenheiro Agrônomo

Orientador : Prof. Dr. AUGUSTO TULMANN NETO

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 : Genética e Melhoria-mento de Plantas.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Outubro - 1993 -

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

Latado, Rodrigo Rocha
L351i Indução e uso de mutações "in vivo" e "in vitro" no
melhoramento do *Chrysanthemum morifolium* Ram.
Piracicaba, 1993.
103p. ilus.,

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Crisântemo - Melhoramento 2. Crisântemo - Muta
ção induzida I. Escola Superior de Agricultura Luiz
de Queiroz, Piracicaba

CDD 635.93355


INDUÇÃO E USO DE MUTAÇÕES "in vivo" E "in vitro" NO
MELHORAMENTO DO *Chrysanthemum morifolium* Ram.

RODRIGO ROCHA LATADO

Aprovada em: 08 / 11 / 19 93

Comissão organizadora:

Prof. Dr. Paulo Roberto de Camargo e Castro	ESALQ/USP
Prof. Dr. Akihiko Ando	ESALQ/USP
Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto	CENA/U SP

Prof. Dr. 
AUGUSTO TULMANN NETO

Orientador

Ofereço esta dissertação a

Cristiane e ao

Alain Greco

e dedico aos meus pais

José Romulo e Deily.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Augusto Tulmann Neto, pela orientação segura, amizade, estímulo e incentivo a minha carreira científica.

Ao Prof. Dr. Akihiko Ando pelo estímulo, amizade e conhecimentos transmitidos durante o curso.

A Dr. Beatriz M. J. Mendes pela colaboração e auxílio nos trabalhos de laboratório.

Ao Departamento de Genética da ESALQ, que me proporcionou a execução do curso e aos seus professores que através de seus amplos conhecimentos e incentivo, deram-me uma base sólida para ser utilizada na pesquisa em agricultura.

A Seção de Radiogenética do CENA, que me acolheu e permitiu a execução deste trabalho.

Aos funcionários da Seção de Radiogenética do CENA, em especial a Benedita Ines F. P. Rodrigues e Wlamir de Aguiar Godoy, pela amizade e grande auxílio nos trabalhos de laboratório.

Ao Sr. Pedro Van Schaik e família pela colaboração nos experimentos de campo, sem o que seria impossível a condução deste trabalho.

A todos os funcionários do CENA, mas em especial atenção a Paulo Cassieri e José Benedito Alves, pela colaboração, nos experimentos de campo e na manutenção das plantas nas estufas.

Aos companheiros de curso, Julio Silvio S. Bueno Filho, Cristina Falco, Edson Tobias Domingues, Mariangela Cristofani, Roberto Oliveira, Francisco Terasawa Jr., entre outros, pelo apoio nos momentos difíceis, pela amizade e companheirismo durante a elaboração do trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste trabalho, agradeço.

SUMARIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Caracterização da espécie	5
2.2 Quimerismo	7
2.3 Produção de mutantes sólidos	9
2.4 Seleção diplôntica	10
2.5 Origem de novas variedades	11
2.6 Escolha das variedades iniciais	13
2.7 Tipo de mutagênico e doses usadas	17
2.8 Métodos de melhoramento de crisântemo usando a técnica de indução de mutações	20
2.8.1 Método " in vivo"	21
2.8.2 Método " in vitro"	25
2.9 Mutantes sólidos X Mutantes quiméricos	27
3. MATERIAL E METODOS	29
3.1 Indução de mutações " in vivo"	29
3.1.1 Experimento preliminar para determinação da radiosensitividade	29

3.1.2	Irradiação com dose escolhida e uso da técnica de podas repetidas	31
3.1.3	Ensaio de estabilidade da coloração das flores e produtividade	34
3.2	Indução de mutações "in vitro"	37
3.2.1	Metodologia de produção de gemas adventícias	37
3.2.1.1	Experimento de regeneração de pedicelos	37
3.2.1.2	Experimento de enraizamento e desenvolvimento das plantas "in vitro"	39
3.2.1.3	Experimento de readaptação das plantas, às condições ambientais externas	40
3.2.2	Teste de radiosensitividade de pedicelos	41
3.2.3	Irradiação de pedicelos visando a seleção de mutantes	43
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	Indução de mutações " in vivo"	47
4.1.1	Experimento preliminar para determinação da radiosensitividade	47
4.1.2	Irradiação com dose escolhida e uso da técnica de podas repetidas	55
4.1.3	Ensaio de estabilidade da coloração das flores e produtividade	71
4.2	Indução de mutações "in vitro"	77
4.2.1	Metodologia de produção de gemas adventícias	77
4.2.1.1	Experimento de regeneração de pedicelos	77
4.2.1.2	Experimento de enraizamento e	

desenvolvimento das plantas	81
4.2.1.3 Experimento de readaptação das plantas "in vitro", às condições ambientais externas	83
4.2.2 Teste de radiosensitividade de pedicelos	85
4.2.3 Irradiação de pedicelos visando a seleção de mutantes	87
5. CONCLUSOES	95
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	98

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº	Página
1. Representação diagramática das células epidérmicas das pétalas de <i>Chrysanthemum</i> , mostrando a pigmentação do vacúolo central e citoplasma. Adaptado de STEWART & DERMEN (1970).....	15
2. Método de seleção de mutantes no florescimento, sem podas, em <i>Chrysanthemum</i>	22
3. Método das podas repetidas para seleção de mutantes em <i>Chrysanthemum</i>	33
4. Foto ilustrativa da flor do mutante branco, contendo setores nas pétalas, da cor original rosa. Em comparação com a flor da variedade inicial 'Repin rosa'.....	68
5. Foto ilustrativa de planta da variedade 'Repin rosa', contendo flores rosa e flores com setores grandes de cor bronze.....	69
6. Foto ilustrativa das flores dos três mutantes de cor em comparação com a cor da variedade inicial, 'Repin rosa'. Na sequência, mutantes de cor rosa escuro, creme, branco e embaixo, a variedade inicial rosa.....	72

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº	Página
1. Altura das plantas das variedades 'Tinsel branco' e 'Repin rosa', avaliada 30 dias após a irradiação de plantas com raios gama.....	49
2. Número de ramificações e % de sobrevivência nas variedades 'Tinsel branco' e 'Repin rosa', avaliadas 30 dias após a irradiação das plantas com raios gama.....	52
3. Número e frequência de mutantes de cor e forma das inflorescências, da variedade 'Tinsel branco', avaliados no florescimento das diversas gerações obtidas pelo método de podas repetidas após a irradiação das plantas com 22,5 Gy de raios gama.....	60
4. Número e frequência de mutantes de cor e forma das inflorescências, da variedade 'Repin rosa', avaliados no florescimento das diversas gerações obtidas pelo método de podas repetidas, após a irradiação de plantas com 20 Gy de raios gama.....	63
5. Espectro de mutações na coloração da inflorescência da variedade 'Repin rosa'. Avaliações efetuadas no florescimento das diversas gerações, obtidas pelo método de podas repetidas, após a irradiação com 20 Gy de raios gama	66
6. Frequência de mutações, de uma ou de mais de uma coloração nas inflorescências da variedade 'Repin rosa'. Avaliações efetuadas no florescimento das diversas gerações, obtidas pelo método de podas repetidas, após a irradiação com 20 Gy de raios gama.....	70
7. Avaliação do número de dias de ciclo, número de flores abertas por planta, altura média de plantas e peso fresco de 10 plantas, da variedade 'Repin rosa' e de 2 mutantes obtidos pelo método de podas repetidas.....	74

8. Avaliação da conservação pós-colheita, dos mutantes 'Ingrid' e 'Cristiane', em relação a variedade original 'Repin rosa'.....	76
9. Efeitos de diferentes níveis de BAP e IAA, na regeneração de plantas (mudas maiores que 0,4 cm) da variedade 'Repin rosa', a partir do cultivo "in vitro" de pedicelos florais em meio básico MS, com caseína hidrolisada (1 g.L ⁻¹). Avaliação efetuada aos 30 dias após a inoculação.....	80
10. Efeito de diferentes níveis de IAA, na altura e peso fresco de plantas "in vitro", da variedade 'Repin rosa', a partir do subcultivo de mudas de 0,4 cm de altura, usando o meio básico MS, com caseína hidrolisada (1 g.L ⁻¹). Avaliação efetuada aos 30 dias após a inoculação.....	83
11. Efeito da radiação gama na regeneração "in vitro", de plantas da variedade 'Repin rosa', obtidas através do cultivo de pedicelos florais. Avaliação efetuada 30 dias após a inoculação.....	87
12. Regeneração "in vitro", de plantas da variedade 'Repin rosa', obtidas através irradição de pedicelos florais, com 8 Gy de raios gama. Avaliação efetuada 30 dias após a inoculação, médias de 4 repetições.....	89
13. Número e frequência de mutantes em plantas da variedade 'Repin rosa', provenientes da regeneração "in vitro" de pedicelos irradiados, com 8 Gy de raios gama. Avaliação efetuada no florescimento.....	94
14. Espectro de mutação e frequência de mutantes na coloração das plantas da variedade 'Repin rosa', provenientes da regeneração "in vitro" de pedicelos irradiados, com 8 Gy de raios gama. Avaliação efetuada no florescimento.....	94

INDUÇÃO E USO DE MUTAÇÕES "in vivo" E "in vitro" NO
MELHORAMENTO DO *Chrysanthemum morifolium* Ram.

Autor: RODRIGO ROCHA LATADO

Orientador : Prof. Dr. AUGUSTO TULMANN NETO

RESUMO

Visando a avaliação do uso da indução de mutações, "in vivo" e "in vitro", em duas variedades de crisântemo, realizou-se este trabalho objetivando: a) A obtenção de mutantes de crisântemo, variedades 'Repin rosa' e 'Tinsel branco', quanto a cor e forma das flores, usando-se a indução de mutações "in vivo" com raios gama, associada à técnica de podas repetidas; b) Determinar uma metodologia de obtenção de gemas adventícias "in vitro", através de pedicelos de botões florais, para a variedade 'Repin rosa' e a sua utilização em indução de mutações; c) Comparar os métodos de melhoramento por indução de mutações "in vivo" e "in vitro", para uma série de fatores, tais como: facilidade de condução e eficiência do método, em termos de número total de mutantes, número de mutantes desejáveis e espectro de mutação.

Para atender ao primeiro objetivo foi realizado um teste de radiosensitividade a raios gama, com a intenção de escolher, para o trabalho, as doses deste mutagênico. O parâmetro escolhido para avaliar a sensibilidade e também a dose a ser utilizada no trabalho, foi a redução na altura das plantas.

Através da irradiação de mudas enraizadas, foram selecionados, dentre outros, apenas três mutantes de cor de flor, da variedade 'Repin rosa', que apresentavam características desejáveis e foram então levadas ao teste de estabilidade e produtividade. Apenas os mutantes de cor, branco e rosa escuro foram aprovadas neste teste e já estão sendo comercializadas com os nomes de 'Cristiane' e 'Ingrid', respectivamente. A variedade 'Tinsel branco' não apresentou mutantes de valor comercial.

Para atender ao segundo objetivo, foram realizados três experimentos, nos laboratórios do CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura). O meio em que se obteve melhores níveis de regeneração de gemas adventícias "in vitro", da variedade 'Repin rosa', partindo-se de pedicelos, foi o meio composto de sais e vitaminas do meio MS, adicionado de 1 g.L⁻¹ de caseína hidrolizada e 30 g.L⁻¹ de sacarose, suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de ácido indolilacético (IAA) e 2,0 mg.L⁻¹ de 6-benzil aminopurina (BAP). O meio escolhido para ser utilizado no desenvolvimento e enraizamento das mudas "in vitro" desta variedade, foi basicamente o mesmo, apenas sem a presença de reguladores de crescimento. O terceiro experimento avaliou alguns métodos de readaptação das plantas ao meio ambiente, através do método escolhido obteve-se uma média de 80 % de mudas adaptadas.

Com relação ao terceiro objetivo, concluiu-se que o método "in vivo", produziu um maior espectro de mutantes de cor de flor, do que o método "in vitro", com a obtenção de 11 variações de cores. A frequência de aparecimento de mutantes foi semelhante nos dois métodos, ao redor de 6,0% . No presente trabalho observou-se que os dois métodos apresentaram dificuldades e facilidades de condução, mas o método "in vivo" apresentou uma maior eficiência em produzir mutantes de cor de flor, com valor comercial.

INDUCTION AND USE OF MUTATIONS "in vivo" AND "in vitro" IN
BREEDING OF *Chrysanthemum morifolium* Ram.

Author: RODRIGO ROCHA LATADO

Adviser: Prof. Dr. AUGUSTO TULMANN NETO

SUMMARY

To evaluate the use of mutation breeding in two varieties of *Chrysanthemum*, the present work was carried out with the following objectives: a) to obtain mutants in colour and shape of flowers of the varieties 'Repin' (Pink colour) and 'Tinsel' (white colour), through "in vivo" gamma-ray irradiation, associated with the cutting back method; b) to establish for the variety 'Repin' a methodology "in vitro" to obtain adventitious buds through bud flower pedicels and to use this technique for mutation breeding; c) to compare facility of handling and efficiency of "in vivo" and "in vitro" mutation breeding methods, concerning total number of mutants, number of desirable mutants and mutation spectrum.

With regard to the first objective, the first step was to evaluate gamma-ray sensitivity in order to determine the dose to be used. The evaluation was made by analysing plant

growth reduction after irradiation with several doses of gamma-rays.

After the irradiation of rooted plantlets, several flower colour mutants were selected. Among them, three from 'Repin' variety showed commercial interest. After the trial to assess stability of flower colour and yield, two were approved and were released to the farmers and are now under commercial production. One mutant has white flowers and is denominated 'Cristiane' and the other has dark pink colour and is named 'Ingrid'. The variety 'Tinsel' (white colour) did not present any mutants with commercial value.

In relation to the second objective, three experiments were carried out at the Laboratory of Radiation Genetics of Nuclear Energy Center for Agriculture (CENA). The best culture medium to obtain "in vitro" adventitious buds through pedicels of the variety 'Repin' was composed by the MS salts and vitamins, with the addition of 1 g.L^{-1} of hydrolyzed casein and 30 g.L^{-1} of saccharose, supplemented with 0.5 mg.L^{-1} of IAA and 2.0 mg.L^{-1} of BAP. To get rooting the similar culture medium was used, with the exception of growth regulators that were not added. In the third experiment, the best method for plant adaptation utilized resulted in 80 % of survived adapted plants.

Concerning the third objective, it was concluded that the "in vivo" method produced a higher mutation spectrum (11 different types) for flower colour as compared with the "in vitro" method. The frequency of mutation for flower colour was

similar in the both methods (around 6 %). Based on the results obtained, it can be said that both methods showed facilities and difficulties in handling, but the "in vivo" was more efficient in producing flower colour mutants of commercial value.

1. INTRODUÇÃO

O mercado mundial de flores e plantas ornamentais teve pequena importância até meados do século XVIII, entretanto um acelerado processo de urbanização dos centros populacionais aliado a um aumento da qualidade de vida, levaram a um rápido desenvolvimento da floricultura como atividade comercial rentável (CACEX, 1987).

A produção mundial de flores e plantas ornamentais em 1987 situava-se em torno de US\$ 50 bilhões/ano. Para o Brasil a produção estimada no mesmo ano girou em torno de US\$ 100 milhões, com o consumo interno absorvendo mais de 90% desta quantia (CACEX, 1987).

No Brasil, a atividade se restringia quase que totalmente ao mercado interno até o início da década de 70, entretanto uma expansão do setor estimulou a sua abertura às exportações (MINAMI & CASTRO, 1988).

Segundo o Trade Statistics Yearbook da ONU, citado por KAMPF et alii(1990), o mercado exportador mundial para flores e plantas ornamentais beirava aos 1,4 bilhões de dólares em 1985.

As exportações brasileiras destes produtos no mesmo ano, somaram a quantia de US\$ 6 milhões (em torno de 0,4% do total mundial). Entretanto, o volume de exportações brasileiras estacionou neste patamar por 3 anos consecutivos,

interrompendo um processo de expansão (CACEX, 1987). Assim faz-se necessário um melhor equacionamento dos problemas do setor para a retomada do processo de expansão e melhor aproveitamento dos espaços hoje existentes no mercado internacional.

As variedades de crisântemo se apresentam com uma porcentagem expressiva na demanda mundial de flores de corte e envasadas, cerca de 12% do mercado Holandês de flores cortadas e 34% do mesmo mercado para flores envasadas (KAMPF et alii, 1990). Segundo CACEX (1987), esta planta ornamental se encontra atualmente entre as flores com maior volume de exportações brasileiras, principalmente para o mercado europeu.

No Brasil, técnicos da cooperativa Holambra, estimaram que, em 1991, cêrca de 10.000 pessoas sobreviveram, direta ou indiretamente do cultivo do crisântemo.

O grande interesse na espécie parece estar ligado ao seu valor comercial mas em parte também ligado a facilidade de obtenção de novas variedades, usando-se de mutações somáticas ou por cruzamentos, dando aos consumidores uma ampla possibilidade de escolha.

Segundo YAMAGUCHI(1987); com dados compilados de 1972 a 1985, num total de 272 novas variedades de ornamentais resultantes de melhoramento por indução de mutação, 106 (39.1% do total) eram de crisântemo; a espécie que apresentou o maior número de variedades desenvolvidas a partir de trabalhos de mutação induzida.

De acordo com uma revisão mais atual, até o final de 1989, este número se elevou para 169, de um total de 409 novas

variedades de plantas ornamentais, demonstrando assim a importância da mutação induzida no melhoramento do crisântemo (MICKE et alii, 1990).

As mutações somáticas, associadas ou não, a rearranjos de camadas celulares no meristema apical podem dar origem a plantas quimeras que, propagadas vegetativamente e mantendo-se estáveis, seriam consideradas então como novas variedades.

O melhoramento de crisântemo, através do uso de indução de mutações, tem se tornado uma prática comum de muitos melhoristas. De acordo com BROERTJES & VAN HARTEN (1988), a melhor estratégia parece ser a de utilizar as variedades obtidas de cruzamentos e produzir, a partir destas, uma família de mutantes o mais rápido possível. O interessante é que pode-se melhorar um ou poucos caracteres importantes sem alterar substancialmente um genótipo considerado superior.

Uma facilidade adicional em trabalhos de indução de mutações em plantas ornamentais, reside no fato da detecção da mutação ser direta, geralmente os caracteres avaliados são de fácil visualização, tais como: cor, forma e tamanho da inflorescência, formato da folha ou hábito de crescimento, não havendo necessidade de testes laboratoriais ou avaliações mais complexas, basta apenas observar a estabilidade do material por uma ou mais gerações.

O objetivo da presente pesquisa foi, (1) A obtenção de mutantes de *Chrysanthemum morifolium* Ram., variedades 'Repin rosa' e 'Tinsel branco', quanto a cor e forma das flores,

usando-se a indução de mutações "in vivo" com raios gama, associado a técnica de podas repetidas; (2) Determinar uma metodologia de obtenção de gemas adventícias "in vitro", para a variedade 'Repin rosa'; (3) Comparar, para a variedade 'Repin rosa', os métodos de melhoramento por indução de mutações "in vivo" e "in vitro", para uma série de fatores, tais como: facilidade de condução e eficiência do método, em termos de número total de mutantes, número de mutantes desejáveis, espectro de mutação e período de duração do programa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização da espécie

O *Chrysanthemum morifolium* é uma planta alógama poliplóide originária de espécies ancestrais presentes na China e Japão (DOWRICK, 1953). A sua origem é sugerida pelo mesmo autor, como provavelmente a partir de um complexo de espécies hexaplóides, todas com o número de cromossomos somáticos $2n=6x=54$.

Estudos revelaram a presença de uma grande diversidade no número somático em vários grupos de variedades, variando de $2n=47-67$, sendo que o número básico de cromossomos normalmente era igual a $x=9$ e a maioria das variedades apresentava $2n=54$ (DOWRICK, 1953; DOWRICK & EL-BAYOUMI, 1966a).

Segundo DOWRICK (1953), a diversidade foi observada entre variedades, entre plantas de uma mesma variedade e mesmo dentro de uma só planta. Neste último caso foi observado a existência de diferentes números cromossômicos em células oriundas das diferentes camadas celulares LI, LII e LIII.

O processo de domesticação e cultivo da espécie ao longo dos anos levou ao aparecimento de plantas com atrofia dos órgãos sexuais masculinos. Há variedades que possuem a antera reduzida, algumas apresentam somente o filete e outras não apresentam vestígios do órgão reprodutivo masculino (DOWRICK, 1953). Devido a isto, o método mais usual de propagação é o

vegetativo, através do uso de mudas obtidas por enraizamento de gemas ativas.

O crisântemo é uma planta de dias curtos para o florescimento, o que significa que a iniciação e desenvolvimento do botão floral pode ser controlado em função do comprimento do dia, em horas de luz (FIDES, 1990).

As duas fases distintas do ciclo da cultura são comumente chamadas de ciclo vegetativo e ciclo generativo.

O ciclo vegetativo inicia-se com o plantio das mudas e pode ser caracterizado pelo crescimento vegetativo do meristema apical e pela dominância apical. O requerimento de luz, das plantas, neste ciclo é de, no mínimo, 16 horas por dia. A suplementação com luz artificial, pode ser a solução para as regiões e períodos do ano em que o comprimento do dia natural, não chega ao valor mínimo necessário. Sob período de, no máximo, 11 horas de luz por dia, a planta passa do ciclo vegetativo para o ciclo generativo. A característica principal deste ciclo é a indução e desenvolvimento do botão floral (FIDES, 1990).

Em regiões e épocas do ano, em que o comprimento do dia excede o período máximo (11 horas luz/dia), pode-se utilizar a técnica de escurecimento artificial, adequando o fotoperíodo, às necessidades da cultura.

O requerimento de períodos mínimos de escuro para a manutenção do ciclo generativo pode ser alterado em função de alguns fatores, principalmente a intensidade luminosa e temperatura. Em regiões tropicais e sub-tropicais, a presença de alta intensidade luminosa ou temperatura elevada, diminui o

requerimento de 13 para 12 horas de escuro ininterrupto por dia (FIDES, 1990).

2.2 Quimerismo

As mutações ocorrem em todos os tipos de tecidos, mas o evento no seu nível mais simples é restrito a apenas uma célula. Quando expostas a radiação, nem todas as células de um meristema apresentam a mesma atividade fisiológica ou estão no mesmo estágio do ciclo mitótico, assim devem existir reações diferentes a uma mesma dosagem de radiação (BROERTJES & VAN HARTEN, 1988).

Planta quimera foi definida por BAUR (1909), citado por BROERTJES & VAN HARTEN (1978) como sendo uma planta formada por dois ou mais tecidos somáticos geneticamente diferentes. Esta definição veio a completar uma anterior, a de WINKLER (1907), citado por BROERTJES & VAN HARTEN (1978), que caracterizou híbridos enxertados, como organismos que possuem heterogeneidade genética no tecido somático.

A exposição de um ápice multicelular a agentes mutagênicos pode levar algumas células a sofrerem mutação. Desde que a mutação não tenha causado nenhum dano fisiológico ou genético que diminua a taxa de crescimento e multiplicação, as células mutadas têm a capacidade de formar uma linhagem de células iguais (mutantes) (BROERTJES & VAN HARTEN, 1978).

A dimensão da linhagem mutante depende da sua posição no ápice, do número total de divisões e da aptidão das células mutadas (BROERTJES & VAN HARTEN, 1988).

De acordo com JORGENSEN & CRANE (1927), citado por BROERTJES & VAN HARTEN (1978), o termo "Setor", em trabalhos de mutagênese, pode ser definido como um grupo de células mutadas unidas que inclui todas as camadas histogênicas (Quimera setorial).

Se apenas parte de uma camada for mutada, considera-se como quimera mericlinal. As quimeras mericlinais não são estáveis e com um ou poucos ciclos de propagação vegetativa, podem passar a quimera periclinal (uma camada histogênica completamente mutada) (DERMEN, 1947, citado por BROERTJES & VAN HARTEN, 1988).

A última classe de mutantes são os mutantes sólidos ou totais, que apresentam como característica principal, serem formados por todas camadas celulares completamente homogêneas, do ponto de vista genético.

Muitas plantas de propagação vegetativa que supõe-se serem mutantes sólidos, são na verdade mutantes periclinais desenvolvidos após um ou mais ciclos de propagação vegetativa, de plantas que carregavam setores mutados (mericlinais) (BROERTJES & VAN HARTEN, 1988).

2.3 Produção de mutantes sólidos

Os mutantes sólidos em muitas espécies podem ser obtidos, utilizando-se da técnica de indução de gemas adventícias "in vivo", associado ou não a técnica de indução de mutações, como no caso de *Achimenes* (BROERTJES, 1972), *Begonia* (DOORENBOS & KARPER, 1975) e *Streptocarpus* (BROERTJES, 1969).

Para crisântemos entretanto, BROERTJES et alii (1976) e BROERTJES & VAN HARTEN (1988) concluem que a técnica de indução de gemas adventícias "in vivo", não é um método recomendado para trabalhos de melhoramento por indução de mutação, devido ao processo de obtenção de mudas ser muito lento e com a produção de uma pequena quantidade de mutantes sólidos.

Gemas adventícias produzidas a partir de plantas jovens mutantes periclinais, originaram plantas que também eram mutantes periclinais. A partir deste fato, os autores concluíram que, em crisântemo, o processo de obtenção de gemas adventícias "in vivo", se dá a partir de duas ou mais células de diferentes camadas celulares (STEWART & DERMEN, 1970).

BROERTJES et alii (1976) descreveram a obtenção de um grande número de mutantes sólidos de crisântemo, usando-se a técnica de indução de gemas adventícias "in vitro". O explante usado foi o pedicelo floral. O estudo da origem das gemas adventícias neste caso demonstrou o seu surgimento a partir do tecido epidérmico, através de regeneração direta, isto é, sem passar pela fase de calos.

Muitos autores investigaram a origem das gemas adventícias quanto ao número de células iniciais. BROERTJES & KEEN (1980) formularam um modelo matemático em que foram analisados os resultados da produção de mutantes sólidos obtidos por vários autores, em várias espécies. A conclusão foi de que a origem do ápice das gemas adventícias se dá a partir de uma única célula epidérmica da camada mais externa do meristema ou da massa do calo. Uma segunda hipótese aceita é a de que a formação do ápice seria a partir de poucas células, mas provavelmente células irmãs, geneticamente idênticas.

As técnicas de cultura de células em suspensão e protoplastos celulares, também podem ser utilizadas na produção de mutantes sólidos em crisântemo (BROERTJES, 1982; BROERTJES & VAN HARTEN, 1988).

2.4 Seleção diplôntica

O fenômeno da seleção diplôntica, seleção intrasomática ou eliminação somática foi descrito por BROERTJES et alii (1968) e BROERTJES & VAN HARTEN (1988) como um tipo de competição entre células mutadas e não mutadas, vizinhas, que eventualmente, pode levar a eliminação das células mutadas.

Parece lógico supor que células que tenham sofrido um forte dano fisiológico ou cromossômico, apresentem uma menor taxa de divisão e portanto uma menor capacidade mitótica em relação a células não mutadas. Por outro lado, mutações gênicas simples ou até deleções cromossômicas menores não alteram

necessariamente a capacidade competitiva da célula (BROERTJES & VAN HARTEN, 1988).

O resultado final da seleção diplôntica, segundo BROERTJES et alii (1968), pode ser tanto uma redução no número de mutantes quanto no espectro de mutação, devido a menor capacidade de competição das células mutadas.

BALKEMA (1972) obteve resultados diferentes de outros autores e concluiu que a perda de setores mutados (setores mericlinais), geralmente descrita como devido a seleção diplôntica, na verdade seria mais provavelmente causada por outros fatores, relacionados ao desenvolvimento do ápice ou da planta toda. O autor também concluiu que as células mutadas sofrem desvantagem em relação as não mutadas, somente nos casos de desenvolvimento lento da planta, como ocorre com as gemas laterais, axilares e adventícias.

2.5 Origem de novas variedades

Há uma certa confusão a respeito da origem de novas variedades de crisântemo, em alguns casos somente o rearranjo das camadas celulares poderia ser o responsável, em outros ficou provado a existência de mutação verdadeira e ainda há casos da associação dos dois fenômenos.

WEAVER (1963) usando indução de mutação por mutagênicos físicos em diversas variedades de crisântemo, da família Indianópolis, concluiu, baseando-se no modelo "túnica-corporus" de organização do ápice, que a radiação poderia destruir

camadas externas do ápice meristemático ou causar o aparecimento de pequenas aberturas que possibilitariam a substituição das camadas mais externas pelas internas. Neste caso então, o resultado pode ser o aparecimento de setores internos, numa planta que já era quimérica.

ICHIKAWA et alii (1970) trabalharam com as variedades 'Delaware amarelo' e 'Delaware' (vermelho) observando a existência de altas frequências de modificação de cor recíproca, ou seja de amarelo para vermelho e de vermelho para amarelo. Os testes de prôgenie revelaram haver modificações na carga genética das camadas internas. A conclusão dos autores foi a de que a variedade 'Delaware amarelo' surgiu da 'Delaware' através da exposição ou rearranjo das camadas celulares. A ocorrência deste fenômeno foi relacionada a modificações internas causadas pela morte do meristema, seguido de reorganização a partir de células que expressavam genótipos diferentes.

Outra possibilidade é o surgimento de novas variedades devido a mutações (mutações gênicas, pequenas aberrações cromossômicas, aberrações em um cromossomo inteiro ou perda de cromossomos) ocasionadas nos tecidos internos ou externos da planta, podendo ou não estarem associadas a rearranjos de camadas celulares (BOWEN, 1965; DOWRICK, 1953; DOWRICK & EL-BAYOUMI, 1966a,b; ICHIKAWA et alii, 1970).

LANGTON (1980) trabalhou com hibridação de variedades brancas e amarelas de crisântemo. Uma conclusão obtida a partir da análise das progênies foi a de que muitas variedades

amarelas foram obtidas a partir de mutações na camada LI de variedades brancas.

BOWEN (1965) considerou que a causa mais provável da mutação seria devido a fragmentação cromossômica, ocasionando o aparecimento de aneuplóides. Nos casos em que não havia modificações no número de cromossomos, as aberrações estruturais dos tipos: translocações e deleções, foram mais frequentes do que mutações gênicas de ponto.

O trabalho de STEWART & DERMEN (1970) descreveu o papel das mutações na modificação de cor de inflorescência, para estes, a ausência ou presença de cromoplastos amarelos pode ser devido a perda de parte do cromossomo que carrega o gene supressor dominante para a formação do pigmento amarelo.

Os estudos da constituição de camadas celulares, em algumas variedades geraram dúvidas. Na família Indianápolis por exemplo, STEWART & DERMEN (1970) consideram que a variedade de cor rosa, seria formada por um material geneticamente homogêneo (as três camadas idênticas), entretanto WEAVER (1963) considera este material como tri-quimérico.

2.6 Escolha das variedades iniciais

O sucesso do programa de melhoramento, tanto pelo espectro de mutação como pela frequência com que ocorrerá, depende basicamente da constituição genética do material a ser tratado. A mutação geralmente modifica o gene, de dominante para recessivo (BROERTJES & VAN HARTEN, 1988). Obviamente, a

irradiação de materiais com o maior número possível de genes dominantes acarretará um aumento na probabilidade de obtenção de mutantes e conseqüentemente à uma maior diversidade.

De acordo com DOWRICK (1953), a cor da flor em crisântemo, é determinado pela presença ou ausência de três pigmentos, a antocianina solúvel, a flavona solúvel e o pigmento do plastídeo insolúvel (carotenóide). Estes pigmentos são encontrados na parte superior e inferior das pétalas. Diferenças nas proporções relativas de cada um destes pigmentos podem alterar a cor da flor (BOWEN et alii, 1962).

Um caráter que parece ter herança qualitativa em crisântemo é a pigmentação por carotenóides nas células da corola das inflorescências (LANGTON, 1980). De acordo com KAWASE & TSUKAMOTO (1974), citado por LANGTON (1980), os carotenóides possuem uma coloração amarela na ausência de antocianinas e uma coloração vermelho-bronze na presença.

Um controle genético simples parece ser a hipótese mais aceita para a regulação deste caráter, devido a frequentes mutações de cor de flor, de branco para amarelo e de rosa para bronze (MIYAKE & IMAI, 1935, citado por LANGTON, 1980).

Apenas um gene controla a pigmentação por carotenóides na epiderme das pétalas, o gene (I) que atua como dominante supressor para a formação de carotenóides (STEWART & DERMEN, 1970). Assim o alelo dominante dará origem às variedades de cor rosa e branco, enquanto o alelo recessivo, às variedades de cor bronze e amarelo (LANGTON, 1980). Na figura 1, pode se

visualizar o modelo proposto para a segregação de cor de flor em crisântemo.

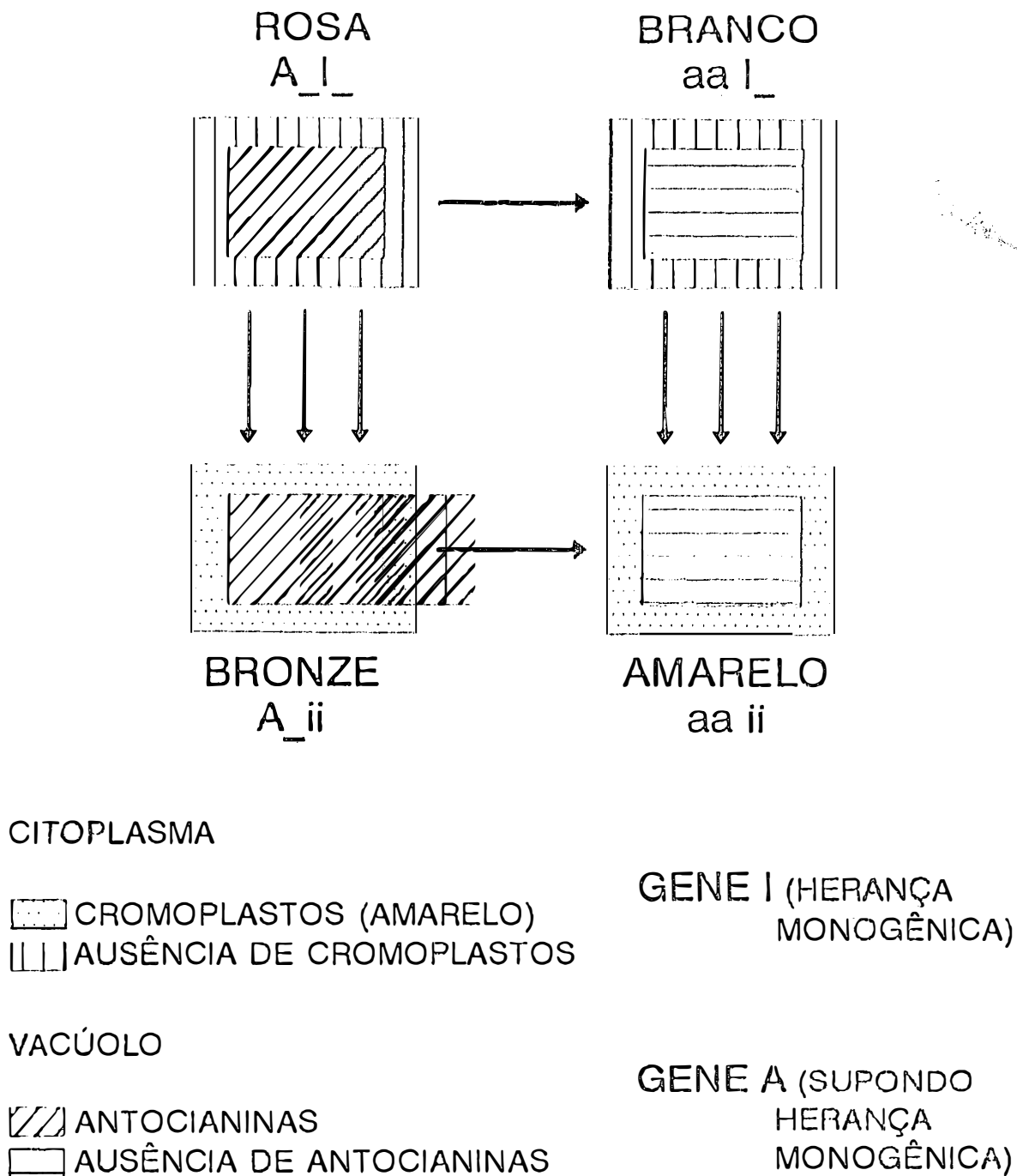


Figura 1. Representação diagramática das células epidérmicas das pétalas de *Chrysanthemum*, mostrando a pigmentação do vacúolo central e citoplasma. Adaptado de STEWART & DERMEN (1970).

Através das técnicas de contagem de número de cromossomos das camadas, análise das frequências de mutação de cor, testes de progênie e determinação de presença de pigmentos com espectrofotômetros, é possível de se determinar a constituição quimérica das diferentes variedades e predizer a probabilidade do aparecimento de mutantes. Deste modo têm-se condições de determinar o melhor material inicial para um futuro programa de melhoramento.

O trabalho de JANK (1957), citado por BROERTJES & VAN HARTEN (1988), demonstrou por análises estatísticas que a variedade de cor rosa é melhor para a obtenção de novas cores em trabalhos de mutação induzida, seguido das cores, branco, bronze, vermelho, roxo, amarelo, salmão, laranja, amarelo-bronze, amarelo com vermelho, e marrom. BROERTJES (1966) confirmou, em parte, estes resultados, pois, usando materiais de diversas colorações, obteve o maior número de mutantes de cor a partir de variedades de cor rosa.

Associado a estes, a escolha do material inicial para um programa de melhoramento, deve levar em conta outras características agronômicas, tais como: vigor, resistência a doenças e a déficit hídrico, valor comercial e outros.

Algumas variedades possuem características agronômicas que lhes conferem uma maior aceitação comercial, por isso são cultivadas em maior escala. Entre estas pode-se citar, no Brasil, as variedades: 'Polaris branco', 'Polaris amarelo', 'Pon-pon', 'Dark flamengo', 'Repin', 'Tinsel' e 'Reagan' .

A variedade 'Repin rosa' possui ótimas qualidades agronômicas. Entre estas estão: grande durabilidade pós-colheita; alta produtividade em peso/m²; apresenta resistência a *Rhizoctonia sp.*, *Pithyom sp.* e Bicho-mineiro, além de possuir grande aceitação comercial.

No entanto, o espectro de cor encontrado é muito pequeno, somente nas cores rosa, bronze e champagne. A obtenção de plantas desta variedade com as cores branco ou amarelo, seria de grande interesse, desde que se mantivesse as outras características agronômicas.

A variedade 'Tinsel branco' é também uma variedade de excelentes características, semelhante às da variedade 'Repin'. Uma vantagem adicional é ter um ciclo médio de 80 dias, sendo classificada então como uma variedade precoce.

Com relação ao espectro de cores, a variedade 'Tinsel', no Brasil, só é encontrada nas cores branco e amarelo. Devido a este fato, a variedade tem começado a apresentar problemas de comercialização. Uma boa opção seria a obtenção da variedade com novas cores, sem modificação das outras características principais.

2.7 Tipo de mutagênico e doses usadas

Os melhores mutagênicos em trabalhos com crisântemo, parecem ser os físicos. Os mutagênicos químicos têm sido usados mas sem o sucesso esperado. BOWEN (1965) usou EMS (Etil metanossulfonato) e EI (Etilenimina) tendo obtido um baixo

número de mutantes. As conclusões relatadas pelo autor foram as de que os mutagênicos químicos produzem um baixo número de aberrações cromossômicas, além de uma baixa capacidade de penetração nos tecidos da planta.

Com relação aos mutagênicos físicos, muitos trabalhos têm sido realizados, comparando a eficiência dos diversos tipos de mutagênicos e as doses ideais. A dose ótima relatada para trabalhos de irradiação de mudas enraizadas com raios X e gama, está na faixa de 10 a 20 Gy (BOWEN, 1965; BROERTJES, 1966; BROERTJES et alii, 1980; DATTA 1987; DOWRICK & EL-BAYOUMI, 1966b; GUPTA & JUGRAN, 1978). Entretanto alguns autores relataram ter usado doses maiores, por volta de 250 Gy de raios gama (CAWSE, 1966, citado por BROERTJES & VAN HARTEN, 1988), mas com baixas taxas de dose (dose por unidade de tempo).

Todas as espécies possuem uma certa taxa de dose crítica na qual há um equilíbrio entre ocorrência de mutações e a capacidade dos tecidos de reparar os danos fisiológicos causados pela radiação (BROERTJES, 1972, citado por BROERTJES & VAN HARTEN, 1988), de forma que pode-se aplicar doses altas sem que a acumulação de danos leve o tecido à morte.

BROERTJES (1966) concluiu que a dose letal para mudas de crisântemo está em torno de 80 Gy (com 1,25-1,5 Gy/h), enquanto YAMAKAWA (1968), citado por BROERTJES & VAN HARTEN (1988), sugere que a dose letal está entre 100-200 Gy (com 10 Gy/dia); de qualquer forma, BROERTJES & VAN HARTEN (1988) sugerem que se deve usar preferencialmente, altas taxas de dose (em irradiações por curto período).

A experiência com neutrôns é bem menor, segundo BOWEN (1965) e BROERTJES (1966) a dose ótima para neutrôns térmicos gira em torno de $6-12 \times 10^{12}$ Nth/cm² e para neutrôns rápidos, de 3 a 5 Gy.

Espera-se que os neutrôns, produzindo uma densa ionização no material, causem conseqüentemente um maior número de aberrações cromossômicas. A partir da comprovação de que as aberrações cromossômicas possam ter um papel maior do que as mutações gênicas de ponto, poderia se concluir que a radiação de neutrôns seria melhor mutagênico do que os raios X e gama, apesar de haver pequenas evidências positivas, esta teoria ainda não foi comprovada (BROERTJES, 1966).

A radiosensitividade varia para as diferentes variedades, dentro de certos limites, o recomendado então seria determinar a dose ótima para cada variedade.

A determinação da dose ideal varia de acordo com os objetivos do programa. Há uma certa correlação entre a dose e o tipo de mutação que pode ser obtido, citando um exemplo: altas doses devem ser preferidas para a obtenção de aberrações cromossômicas, com perda ou ganho de cromossomos (modificações no tamanho da inflorescência), por exemplo. Baixas doses devem ser escolhidas para mutações gênicas, como as que modificam a cor das pétalas (ICHIKAWA et alii, 1970).

2.8 Métodos de melhoramento de crisântemo usando a técnica de indução de mutações

A indução de mutações no melhoramento do crisântemo pode ser feita através dos métodos "in vivo" e "in vitro". O método "in vivo" consiste na irradiação de mudas enraizadas ou não, com posterior propagação deste material, no campo, até o florescimento (época de seleção).

Este método explora a possibilidade de irradiação de meristemas multicelulares apicais e axilares causando o aparecimento de setores mutados. Há necessidade de técnicas posteriores de resgate e ampliação destes setores até a obtenção de mutantes estáveis.

O outro método é baseado na irradiação, seguido de cultivo "in vitro", de diversos tipos de explantes (pedicelos florais, folhas, pecíolos e botões jovens), através de cultura de tecidos de plantas. Após a readaptação da planta ao solo, deve se conduzi-la até o florescimento, quando será feita a avaliação dos mutantes obtidos.

A característica principal deste método consiste na irradiação de tecidos que darão origem a gemas adventícias. O processo de obtenção de gemas adventícias "in vitro" de crisântemo, demonstrou ter a sua origem a partir de uma única célula. Neste caso então, existe a possibilidade de formação de plantas mutantes sólidas, os quais não necessitarão de técnicas de ampliação de setores mutados (BROERTJES & VAN HARTEN, 1978).

2.8.1 Método "in vivo"

O método "in vivo" consiste na irradiação de mudas obtidas de plantas que ainda apresentam um ou mais meristemas apicais com crescimento vegetativo. As mudas podem ou não estar enraizadas. Nos dois casos, a base da muda deve ser protegida da ação nociva da radiação com placas de chumbo, pois a capacidade de enraizamento pode ser facilmente suprimida.

BROERTJES & VAN HARTEN (1988) descrevem um cuidado especial nos casos de proteção da base das mudas. Neste caso deve-se eliminar as gemas basilares que porventura não tenham sido expostas a radiação.

Após a irradiação vem a questão sobre a condução das plantas. Uma opção é conduzi-las em condições de fotoperíodo longo, favorecendo o crescimento vegetativo. Após, as plantas são colocadas sob condições de dias curtos para a indução de florescimento (época da avaliação), como nos trabalhos de WEAVER (1963), BOWEN (1965), DOWRICK & EL-BAYOUMI (1966b), GUPTA & JUGRAN (1978) e ICHIKAWA et alii (1970) (Figura 2).

Seguindo este procedimento, BROERTJES & VAN HARTEN (1988) observaram que pode-se obter plantas que apresentam um maior número de pequenos setores mutados (plantas da cor original com pequenas mutações) utilizando uma área de cultivo relativamente menor. Posteriormente estes pequenos setores obtidos podem ser ampliados, dividindo-se a planta em internódios ou retirando as gemas que contenham o setor mutado, para posterior propagação.

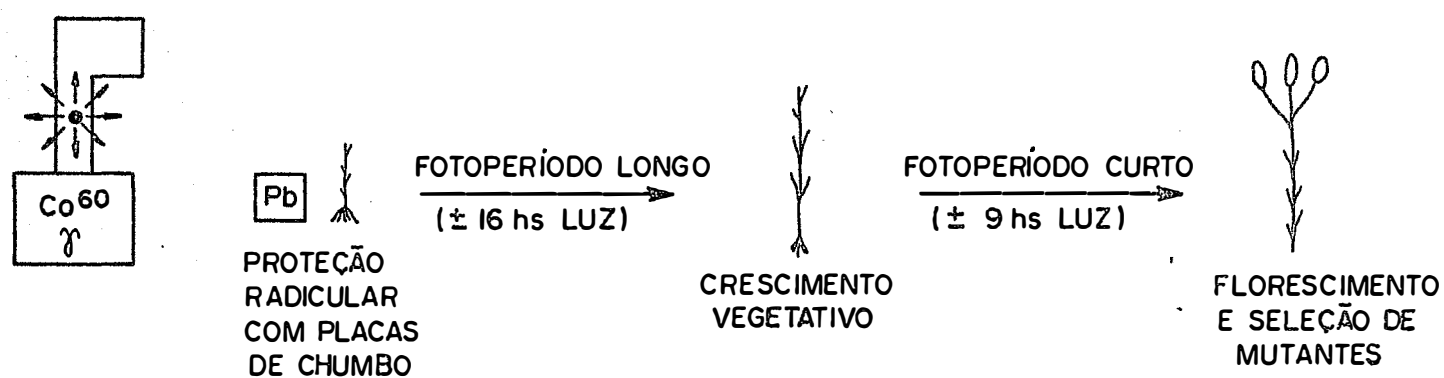


FIGURA 2 - MÉTODO DE SELEÇÃO DE MUTANTES NÓ FLORESCIMENTO, SEM PODAS EM Chrysanthemum.

A desvantagem deste método é que somente setores bastante visíveis são recuperáveis, muitos setores menores são facilmente omitidos ou passam despercebidos no momento da seleção.

O outro método e mais usado no momento é o das podas repetidas da planta que sofreu o tratamento mutagênico (BROERTJES & VAN HARTEN, 1988). O procedimento usado é o de se colocar as plantas irradiadas em condições de fotoperíodo longo, sendo estas plantas então chamadas de matrizes.

Após um certo período de crescimento, estas matrizes serão podadas, quebrando a dominância apical do ramo principal, possibilitando as gemas axilares restantes se desenvolverem.

O desenvolvimento das gemas axilares contidas nas partes restantes do ramo principal, originarão ramos novos (M1V1 ou vM1). Quando estes ramos apresentarem um tamanho adequado, serão novamente podados. As gemas axilares restantes, presentes nos ramos podados M1V1, se desenvolverão formando ramos M1V2 (ou vM2), e assim sucessivamente.

As partes apicais obtidas através das podas repetidas durante o avanço das gerações M1V1, M1V2, M1V3, M1V4 e etc..., serão enraizadas e posteriormente plantadas em solo, a avaliação destas plantas e os possíveis mutantes é feita no florescimento. Vários autores descrevem o uso desta técnica em trabalhos de melhoramento de crisântemo (BROERTJES, 1966; BROERTJES et alii, 1980, 1983 e DATTA, 1987).

A grande vantagem deste método de condução das plantas pós-irradiação segundo BROERTJES & VAN HARTEN (1988), é que muitos setores mutados, inclusive aqueles contidos em gemas axilares dormentes, tem a oportunidade de se desenvolver formando quimeras periclinais. O resultado pode ser um número muito maior de mutações setoriais grandes, no momento da seleção (inflorescências com metade de uma cor e metade de outra ou totalmente mutada, por exemplo).

Como a poda se dá ao acaso, antes da observação da existência ou não de mutação, alguns setores menores certamente serão perdidos, mas há a compensação de se avaliar plantas que no florescimento apresentam setores visivelmente maiores, assim a seleção será mais crítica e a propagação do setor, mais segura e rápida.

Segundo BROERTJES & VAN HARTEN (1988) o número exato de podas é difícil de se afirmar, pois não há trabalhos onde se compare diferentes tratamentos. Os autores consideram que 2 a 3 vezes são mais que suficiente, sendo preferível um número maior de plantas irradiadas, a um aumento no número de podas.

Um refinamento foi sugerido por BOWEN (1965), que recomenda que deve se aproveitar as mudas retiradas das partes basais, descartando as mudas da parte superior da planta, o autor justifica este procedimento devido a ocorrência preferencial de mutações periclinais em mudas obtidas da parte basal. As mudas da parte superior, segundo o autor, geralmente dão origem a mutantes setoriais ou mericlinais.

2.8.2 Método "in vitro"

A metodologia de obtenção de plantas de crisântemo, através do uso da cultura de tecidos, já foi bem definida. Um grande número de trabalhos científicos descreveram o sucesso obtido com o cultivo de vários tipos de explantes, tais como: folhas jovens, pecíolos, pedicelos e botões florais jovens.

HILL (1968) testou 4 meios para regeneração de plantas, a partir de pecíolos, pedaços de receptáculo floral e folhas, sempre passando pela fase de calos. O autor observou a regeneração de algumas plantas anãs, mas não caracterizou se esta variação foi devido a causas genéticas (variação somaclonal) ou devido a efeitos fisiológicos.

Um extenso estudo foi realizado por ROEST & BOKELMANN (1975), com o objetivo de avaliar os fatores que afetam a regeneração "in vitro" de crisântemo. O meio usado foi o MS (MURASHIGUE & SKOOG, 1962) e os fatores estudados foram: tamanho de explante, ação de diferentes reguladores de crescimento em diversas concentrações e combinações (auxinas X citocininas), concentração de sacarose, influência das vitaminas e sais minerais do meio MS e capacidade de regeneração de 11 variedades.

As principais conclusões foram as de que o pedicelo floral foi o explante em que se obteve melhor capacidade de regeneração. Esta se deu por forma direta, sem passar pela fase de calos. O estudo do tamanho ideal do explante não demonstrou padrões regulares de resposta. Para cada variedade houve uma combinação ótima de níveis de reguladores de

crescimento e sacarose que causou melhores níveis de regeneração. A capacidade de regeneração dos 11 genótipos variou bastante, com médias de 15 a 50 mudas formadas por explante.

DE JONG & CUSTERS (1986), usaram a metodologia de indução de mutações "in vitro" em crisântemo. Os autores observaram modificações no florescimento e na produtividade da variedade 'Spider branco', comparando dois tipos de explantes (pedicelos florais e pétalas), em duas formas de regeneração, a direta e através da passagem pela forma de calos.

Os autores observaram que as modificações estavam ligadas ao tempo da passagem pela fase de calos e que não havia evidências de mutantes setoriais, todos os mutantes eram aparentemente sólidos. Com relação ao espectro de mutação, houve diferenças nos tipos de mutantes encontrados, nas plantas originadas de pedicelos e pétalas, a conclusão foi a de que estas diferenças eram devido ao desenvolvimento e função diferenciada dos tecidos epidérmicos, nos dois explantes.

BROERTJES et alii (1976) realizaram um trabalho de melhoramento por mutagênese induzida, usando-se de dois métodos de obtenção de gemas adventícias. Com relação ao método "in vitro", as conclusões foram as de que a dose ótima, em função da regeneração de mudas, número de mutantes e frequência de mutação, foi em torno de 8-10 Gy de raios-X. O explante em que se obteve melhor regeneração foi o pedicelo floral. A exceção de um, todos os mutantes obtidos eram sólidos.

ROEST & BOKELMANN (1975) relatam que a capacidade de regeneração "in vitro" é dependente do genótipo, ou seja, um

genótipo pode ter boa regeneração enquanto outros não apresentam resposta. A irradiação deve ser feita antes do início da regeneração para que seja maior, a probabilidade de se atingir uma célula isolada e assim dar origem a um mutante sólido (BROERTJES & VAN HARTEN, 1978) .

2.9 Mutantes sólidos X Mutantes quiméricos

Alguns trabalhos discutem a importância da produção de mutantes sólidos, para caracteres diretamente visíveis, tais como: cor e forma da inflorescência (BROERTJES, 1982) e para caracteres quantitativos, como produtividade e precocidade (DE JONG & CUSTERS, 1986), seus prós e contras em comparação a métodos de indução de mutações "in vivo".

A desvantagem na obtenção de mutantes sólidos, segundo BROERTJES & VAN HARTEN (1988), pode estar quando se inicia um programa de melhoramento, com matrizes superiores, formadas por diferentes grupos de camadas celulares.

Neste caso, o resultado final será formado por uma combinação das mutações ocorridas e as alterações causadas pela produção de uma planta com as três camadas celulares iguais. As mutações ocorridas estarão presentes nas três camadas celulares (LI, LII e LIII) e terão a capacidade de se expressar, causando certamente a modificação de outras características que não, cor da inflorescência. Haverá então a descaracterização da variedade inicial (BROERTJES & VAN HARTEN, 1988).

As técnicas de irradiação de meristemas multicelulares têm a vantagem da ocorrência preferencial de mutações na camada LI (mais externa). Neste caso as mutações indesejáveis terão pouca expressão na variedade obtida, devido ao fato de que genes importantes que controlam caracteres agrônomicos, tais como: tamanho de inflorescência, altura, produção e etc... geralmente não se encontram na camada LI.

3. MATERIAL E METODOS

Os experimentos foram realizados em parte na Seção de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). A coleta das mudas e os experimentos de campo foram realizados na Fazenda Irmãos Van Schaik, no município de Cosmópolis, São Paulo.

3.1 Indução de mutações "in vivo"

3.1.1 Experimento preliminar para determinação da radiosensitividade

Inicialmente foi realizado um ensaio para testar a sensibilidade das duas variedades a radiação gama e escolher a melhor dose para a pesquisa.

O experimento foi instalado, uma variedade de cada vez, com delineamento de blocos ao acaso, 4 repetições, 7 tratamentos para a variedade 'Tinsel' e 5 tratamentos para 'Repin', com cada parcela composta por 25 plantas.

Foram irradiadas mudas enraizadas, com aproximadamente 10 cm de altura. As bases das mudas foram protegidas da radiação com cilindros de ferro. As doses escolhidas para este teste foram de 0 ; 7,5 ; 12,5 ; 17,5 ; 22,5

; 27,5 e 32,5 Gy de raios gama para a variedade 'Tinsel' e 0 ; 12,5 ; 17,5 ; 22,5 e 27,5 Gy, para a variedade 'Repin', com taxas de dose entre 200 e 225 Gy/h. As irradiações foram realizadas na fonte de Cobalto (^{60}Co) do CENA.

O plantio foi feito em estufas, com canteiros de 1,20 m de largura e espaçamento de 10 cm entre plantas. As plantas foram colocadas sob condições de fotoperíodo longo (16 horas de luz natural e artificial / 8 horas de escuro), para evitar a indução do ciclo generativo. A avaliação foi feita 30 dias após o plantio, através da contagem do número de sobreviventes, número de ramificações e altura de plantas.

Para efeito de análise estatística, os dados da variável, número de ramificações, foram transformados pela equação raiz quadrada de $(X + 0,5)$. Para a variável, porcentagem de sobrevivência, a equação utilizada foi arco seno da raiz quadrada de $(X/100)$. Os dados da variável, altura de planta, não sofreram transformação.

3.1.2 Irradiação com a dose escolhida e uso da técnica de podas repetidas

O experimento consistiu, para cada variedade, na irradiação de 500 mudas enraizadas com aproximadamente 10 cm de altura, além de 100 mudas não irradiadas, usadas como controle. As bases das mudas foram protegidas da radiação, com cilindros de ferro.

A dose escolhida foi a que mais se aproximou do GR 50, isto é, dose que causou redução média de 50% na altura das plantas, em relação a testemunha, determinado de acordo com o experimento anterior.

A irradiação foi feita na fonte de Cobalto (^{60}Co) do CENA, com a dose de 20 Gy de raios gama, para a variedade 'Repin' e 22,5 Gy para a variedade 'Tinsel', com taxa de dose entre 200 e 225 Gy/h.

As 1200 mudas foram plantadas em solo, sob condições de fotoperíodo longo (16 horas de luz natural e artificial / 8 horas de escuro), para a indução de crescimento vegetativo. Como estas plantas foram usadas somente para a obtenção de mudas denominou-se de plantas matrizes.

Quando as plantas matrizes apresentavam a altura média de 30 cm foi feita a primeira poda, retirando a parte apical para enraizamento. A muda originada foi denominada de M1V1(1), pois foi obtida a partir do desenvolvimento do meristema apical presente no evento mutagênico.

A primeira poda ocasionou a quebra de dominância apical na planta matriz. As gemas axilares, até então dormentes, se desenvolveram formando novos ramos, chamados M1V1.

As matrizes, após a primeira poda, foram conduzidas com apenas 3 hastes, com preferência para as de posição mais inferior na planta, a fim de facilitar os trabalhos posteriores de retirada de mudas e padronização do estágio de crescimento das plantas.

Quando os 3 novos ramos (M1V1) tinham • comprimento mínimo de 15 cm, foi realizado a segunda poda. De cada ramo, permitiu-se o desenvolvimento de apenas um ramo, eliminando os demais. Nesta poda, foram obtidas 3 mudas de cada planta matriz, denominadas M1V1(2), pois foram originadas a partir do desenvolvimento das gemas axilares presentes no evento mutagênico.

Com a nova quebra da dominância apical nas plantas matrizes, as gemas axilares contidas nos ramos M1V1, se desenvolveram formando ramos M1V2. De cada haste deixou-se desenvolver somente 1 gema axilar para a continuação do número de hastes (3 hastes). O processo se repetiu com a retirada das mudas M1V2, M1V3, M1V4, M1V5 e M1V6, sempre conduzindo a muda com 3 hastes, de acordo com a figura 3.

Foi feita a retirada das gemas ladrão, isto é, gemas originadas em ramos indesejáveis.

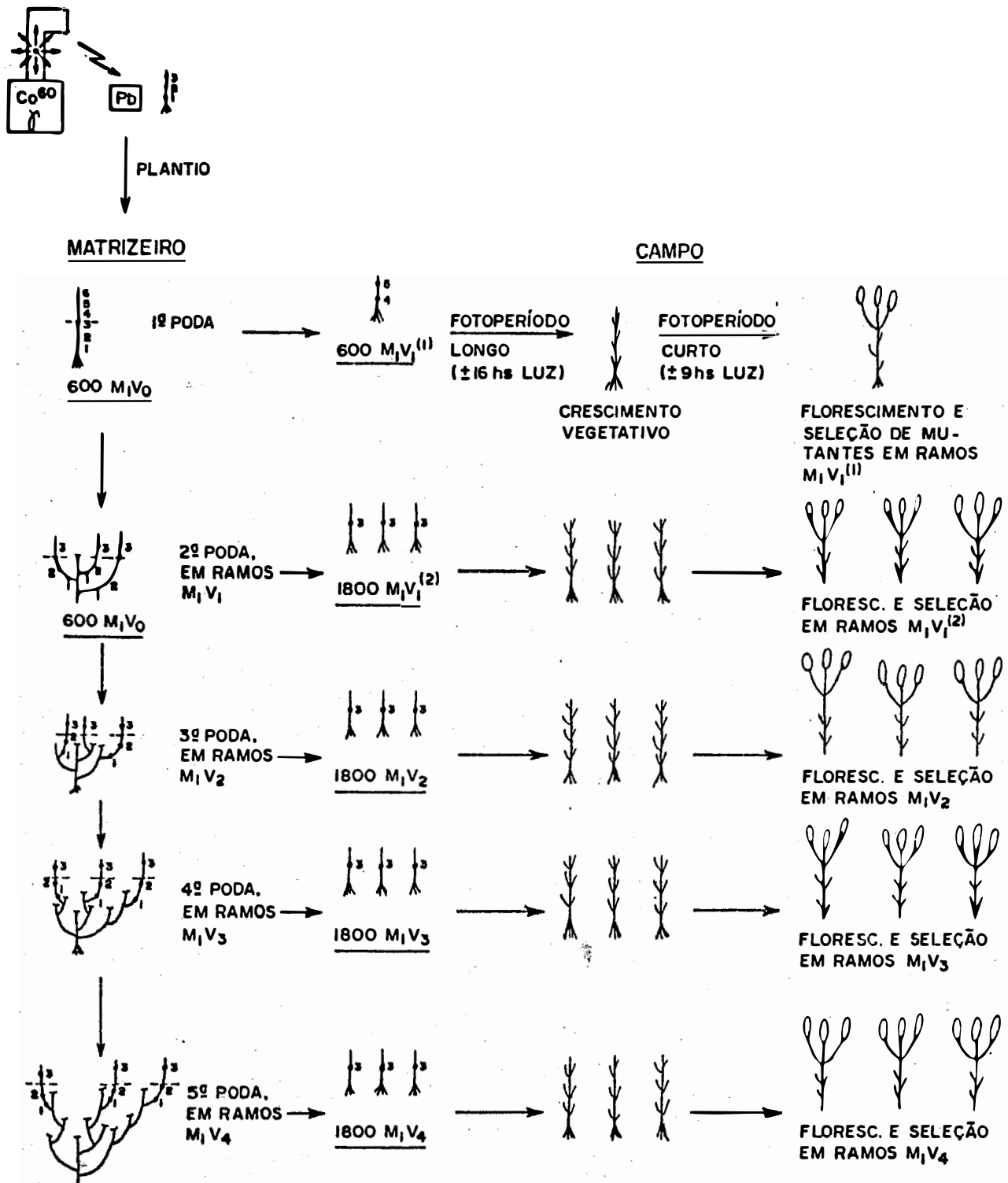


FIGURA 3 - MÉTODO DAS PODAS REPETIDAS PARA SELEÇÃO DE MUTANTES EM *Chrysanthemum*.

As mudas M1V1(1), M1V1(2), M1V2, M1V3, M1V4, M1V5 e M1V6 retiradas das plantas matrizes, foram enraizadas em substrato especial (casca de arroz carbonizado e esterilizado), por aproximadamente 15 dias.

As mudas foram plantadas em estufas, com canteiros de 1,20 m de largura e espaçamento de 10 cm entre plantas, sob condições de fotoperíodo longo (16 horas de luz natural e artificial / 8 horas de escuro), até o tamanho de aproximadamente 30 cm de altura.

Após, o fotoperíodo da estufa foi modificado para 9 horas de luz / 15 horas de escuro, o objetivo era a indução do florescimento, utilizando-se para isto, cobertura plástica na estufa.

A avaliação foi feita no florescimento com a contagem do número de mutantes para cor, periclinais (1 cor) ou mericlinais (2 ou mais cores) e também para forma da inflorescência.

3.1.3 Ensaio de estabilidade da coloração das flores e produtividade

Após a seleção de alguns mutantes que poderiam ter interesse comercial, foi necessário testar a estabilidade e algumas outras características importantes, tais como: a produtividade, o ciclo do cultivo e a conservação pós-colheita.

O experimento consistiu em subdividir as plantas mutadas selecionadas, em internódios contendo uma ou mais gemas

axilares. Estes internódios foram colocados em substrato de enraizamento por 15 dias e após plantados sob condições de fotoperíodo longo (16 horas de luz natural e artificial / 8 horas de escuro) para retornar ao crescimento vegetativo e assim, produzir mudas.

No campo, o experimento foi instalado em blocos ao acaso, com 4 repetições e 4 tratamentos (´Repin rosa´ e mutantes, branco, rosa escuro e creme), cada parcela constituída por 50 plantas.

As mudas, após o período de enraizamento, foram plantadas em estufas, com canteiros de 1,20 m de largura e espaçamento de 10 cm entre plantas, sob condições de fotoperíodo longo, até o tamanho de aproximadamente 30 cm de altura.

O fotoperíodo da estufa foi modificado para 9 horas de luz / 15 horas de escuro, o objetivo era a indução do florescimento, utilizando-se para isto, cobertura plástica na estufa.

As medidas tomadas no florescimento foram: a altura média das plantas, número de dias do ciclo, a produtividade expressa em peso fresco de 10 plantas e número de flores abertas por planta.

Para efeito de análise estatística, os dados das variáveis, número de flores abertas por planta, altura média das plantas, número de dias do ciclo e peso fresco de 10 plantas, não sofreram transformação.

Para se avaliar se os mutantes obtidos mantiveram ou não as características da variedade original no que se refere

a manutenção após a colheita, resolveu-se utilizar o sistema empregado pelo próprio agricultor, aonde foi realizado esta pesquisa.

Em fevereiro de 1993, ramalhetes de 20 hastes com 80 cm, do cultivar Repin original e dos mutantes `Cristiane` e `Ingrid`, respectivamente mutantes de cor branco e rosa escuro, foram cortados de canteiros, retirando-se as folhas dos primeiros 10 cm da parte basal e colocados em recipiente com água. A cada 3 dias foi feita a troca da água de todos os materiais e o teste prosseguiu até o início da senescência das folhas e flores.

3.2 Indução de mutações "in vitro"

3.2.1 Metodologia de produção de gemas adventícias

3.2.1.1 Experimento de regeneração de pedicelos

Inicialmente testou-se uma metodologia para a organogênese somática direta do crisântemo, determinando o melhor meio de cultura, o tempo de repicagem (ou troca de meio), readaptação ao solo e outros fatores que poderiam afetar a repetibilidade do processo.

O tipo de explante usado foi o pedicelo floral que tem sido relatado como o de maior facilidade de regeneração "in vitro".

Os pedicelos de flores jovens (botão cheio mas sem formação de cor) foram retirados de plantas cultivadas sob condições de fotoperíodo curto.

A assepsia foi realizada, com a imersão dos pedicelos ainda com o botão, em solução de álcool etílico (75%) por 1 min., em seguida, imersão em solução composta por água destilada 3:1 água sanitária comercial (hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo) por 10 minutos.

Em câmara asséptica, os pedicelos foram lavados 3 vezes em água destilada autoclavada. A porção do pedicelo mais próxima do botão floral, foi retirada com o auxílio de uma pinça e bisturi, com o tamanho aproximado de 0,5 cm de comprimento. Estas porções dos pedicelos foram então cortadas

longitudinalmente ao meio e colocadas em contato com o meio de cultura (parte cortada para baixo).

A princípio foi testado o meio apresentado no trabalho de ROEST & BOKELMANN (1975) modificado. Os meios de cultivo foram formados por sais minerais e vitaminas do meio MS, adicionado de 1 g.L^{-1} de caseína hidrolisada e 30 g.L^{-1} de sacarose, suplementado com reguladores de crescimento em diferentes concentrações.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 10 tratamentos e 20 repetições. Os tratamentos foram compostos por todas as combinações de concentrações de 0,1; 0,5 e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido indolilacético (IAA) e 1,0; 2,0 e $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-benzil aminopurina (BAP), totalizando 9 meios de cultura diferentes, além do meio sem reguladores de crescimento.

Os meios foram solidificados com 7 g.L^{-1} de ágar lavado e o pH, ajustado para $5,7 \pm 0,1$. A esterilização foi realizada em autoclave a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

O tempo de subcultivo para crisântemo não foi relatado em nenhum trabalho publicado, então foi utilizado o tempo médio de duas semanas.

As plantas foram mantidas em fotoperíodo de 16 horas de luz / 8 horas de escuro, sob intensidade luminosa de 16 W/m^2 e a uma temperatura média de $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

A avaliação do melhor meio de cultivo foi feita aos 30 dias da inoculação, em função do parâmetro: número médio

de plantas regeneradas transferíveis (com tamanho mínimo de 0,4 cm) no total de pedicelos não contaminados.

Para a análise estatística, os dados da variável, número médio de plantas regeneradas transferíveis no total de pedicelos não contaminados, foram transformados pela equação raiz quadrada de $(X + 0,5)$.

A avaliação do número médio de plantas regeneradas transferíveis no total de pedicelos regenerados e do número médio de plantas regeneradas transferíveis no total de pedicelos inoculados, completam a análise da ação do meio de cultivo na capacidade de regeneração dos pedicelos.

3.2.1.2 Experimento de enraizamento e desenvolvimento das plantas "in vitro"

As mudas que apresentaram o tamanho mínimo foram individualizadas e colocadas em meio de enraizamento e desenvolvimento.

O meio utilizado para este teste foi composto por sais minerais e vitaminas do meio MS, adicionado de 1 g.L^{-1} de caseína hidrolisada e 30 g.L^{-1} de sacarose, suplementado com o ácido indolilacético (IAA), nos níveis de 0; 0,1; 0,5; 1,0 e $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$.

Os meios foram solidificados com 7 g.L^{-1} de ágar lavado e o pH, ajustado para $5,7 \pm 0,1$. A esterilização foi realizada em autoclave a $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.

As plantas foram mantidas em fotoperíodo de 16 horas de luz / 8 horas de escuro, sob intensidade luminosa de 27 W/m² e a uma temperatura média de 27 + 1 °C.

A avaliação foi feita aos 30 dias após a repicagem, medindo-se a altura da planta, peso fresco e % de sobrevivência das plantas, associado a algumas observações sobre o enraizamento e modificações morfológicas.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, cada repetição era constituída por uma planta por tubo de ensaio, perfazendo o total de 15 repetições por tratamento. Para a análise estatística, os dados da variável, porcentagem de sobrevivência foram transformados pela equação arco seno da raiz quadrada de (X/100). Os dados da variáveis altura de planta e peso fresco não sofreram transformação.

3.2.1.3. Experimento de readaptação das plantas, às condições ambientais externas

A etapa final da metodologia consistiu na readaptação ao solo das mudas advindas da cultura de tecidos. Para se testar os diferentes métodos de adaptação de grande quantidade de mudas, foram usados três sistemas.

O primeiro tratamento consistiu na retirada das mudas e plantio em bandejas contendo solo autoclavado. Este material foi mantido numa câmara, na presença de um umidificador de ambientes, ou seja, em condições de alta umidade relativa do ar, por uma semana. Posteriormente as plantas foram colocadas num

local sombreado, em condições normais de ambiente, até completar 40 dias. As mudas foram então levadas ao solo.

No segundo tratamento, a tampa de plástico do tubo em que a muda foi obtida, foi levantada progressivamente, por um período de aproximadamente 30 dias, até a evaporação de parte dos componentes aquosos do meio. Houve então uma maior troca gasosa do tubo com o meio ambiente, a readaptação das mudas ao meio externo se iniciou no tubo, antes do transplântio.

O terceiro tratamento foi feito com a retirada das mudas e plantio em solo autoclavado nas condições ambientais.

O experimento foi composto por 60 plantas por tratamento, com o delineamento inteiramente casualizado.

A avaliação foi realizada, 30 dias após a data do transplântio, através da porcentagem do número de sobreviventes.

3.2.2 Teste de radiosensitividade de pedicelos

Primeiramente foi feito um teste para determinar a sensibilidade "in vitro", de pedicelos da variedade `Repin`, a radiação gama e escolher a melhor dose para o experimento.

O experimento foi instalado com delineamento inteiramente casualizado, 6 tratamentos e cada parcela composta por 30 tubos de vidro, contendo um pedicelo de aproximadamente 0,5 cm, dividido longitudinalmente em duas partes iguais.

As doses escolhidas para este teste foram de 0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0 Gy de raios gama, com taxas de dose entre 170 e 210 Gy/h, realizado na fonte de Cobalto (^{60}Co) do CENA.

Os pedicelos sofreram o processo de assepsia semelhante ao descrito no experimento de regeneração de pedicelos.

O meio utilizado foi o que obteve melhores resultados, com relação a produção de mudas. Sendo composto de sais e vitaminas do meio MS, adicionado de 1 g.L^{-1} de caseína hidrolisada e 30 g.L^{-1} de sacarose, suplementado com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido indolilacético (IAA) e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-benzil aminopurina (BAP).

O meio foi solidificado com 7 g.L^{-1} de ágar lavado e o pH, ajustado para $5,7 \pm 0,1$. A esterilização foi realizada em autoclave a $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.

Os tubos foram então colocados sob as mesmas condições do experimento de regeneração de pedicelos, com relação a temperatura e fotoperíodo. A intensidade luminosa utilizada foi de 16 W/m^2 .

Após 15 dias da inoculação dos pedicelos, foi realizado a troca do meio de cultura, utilizando o mesmo meio descrito anteriormente.

A avaliação da dose de mutagênico a ser empregada no experimento, foi feita aos 30 dias da inoculação, em função dos mesmos parâmetros usados no experimento de regeneração de pedicelos.

Os parâmetros avaliados foram o número médio de plantas regeneradas transferíveis (com tamanho mínimo de 0,4 cm) no total de pedicelos não contaminados, o número médio de plantas regeneradas transferíveis no total de pedicelos regenerados e o

número médio de plantas regeneradas transferíveis no total de pedicelos inoculados.

Para a análise estatística, os dados da variável, número médio de plantas regeneradas transferíveis no total de pedicelos não contaminados, foram transformados pela equação raiz quadrada de $(X + 0,5)$. A dose escolhida foi em função deste parâmetro, pois foi o que melhor representou a ação da radiação na regeneração das plantas, procurando escolher doses ao redor de 50% de redução.

3.2.3 Irradiação de pedicelos visando a seleção de mutantes

Pedicelos florais da variedade 'Repin rosa' foram irradiados com dose de 8 Gy de raios gama e taxas de dose entre 170 e 210 Gy/h, na fonte de Cobalto (^{60}Co) do CENA.

O experimento foi composto por 200 pedicelos irradiados, além de 20 pedicelos não irradiados, na forma de 4 repetições, perfazendo no total, 800 pedicelos irradiados e 80 não irradiados (testemunha).

A razão principal para a divisão do experimento em 4 repetições, está no fato da necessidade de se inocular os pedicelos irradiados num período de tempo, o mais breve possível a partir da irradiação, evitando assim o aumento das perdas devido a desidratação.

O manuseio de grandes quantidades de explantes vindos do campo, requer um período maior de tempo para a execução

da desinfecção, para se evitar o aumento de perdas por contaminação e uma conseqüente diminuição na quantidade de mudas regeneradas.

Os pedicelos de flores jovens (botão cheio mas sem formação de cor) foram retirados de plantas cultivadas sob condições de fotoperíodo curto.

A assepsia foi realizada com a imersão dos pedicelos, ainda com o botão, em solução de álcool etílico (75%) por 1 min., em seguida, imersão em solução composta por água destilada 3:1 água sanitária comercial (hipoclorito de sódio a 2% de cloro ativo) por 10 minutos.

Em câmara asséptica, os pedicelos foram lavados 3 vezes em água destilada autoclavada. A porção do pedicelo, mais próxima do botão floral, foi retirada com o auxílio de uma pinça e bisturi, com o tamanho aproximado de 0,5 cm de comprimento. Os pedicelos foram então cortados longitudinalmente ao meio e colocados em contato com o meio de cultura (parte cortada para baixo).

O meio usado para a regeneração foi composto de sais e vitaminas do meio MS, adicionado de 1 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada e 30 g.L⁻¹ de sacarose, suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de ácido indolilacético (IAA) e 2,0 mg.L⁻¹ de 6-benzil aminopurina (BAP). Após 2 semanas da inoculação foi feita a troca do meio (repicagem) usando meio fresco.

As plantas foram mantidas em fotoperíodo de 16 horas de luz/ 8 horas de escuro, sob intensidade luminosa de 16 W/m² e a uma temperatura média de 27 + 1 °C.

Após 30 dias, as plantas regeneradas transferíveis, foram individualizadas e colocadas em meio de enraizamento e desenvolvimento.

O meio utilizado foi o que apresentou melhores resultados no teste de enraizamento e desenvolvimento, sendo composto por sais minerais e vitaminas do meio MS, adicionado de 1 g.L⁻¹ de caseína hidrolisada, 30 g.L⁻¹ de sacarose e sem a presença de reguladores de crescimento.

As plantas foram mantidas em fotoperíodo de 16 horas de luz/ 8 horas de escuro, sob intensidade luminosa de 27 W/m² e a uma temperatura média de 27 + 1 °C.

Durante 30 dias, as plantas se desenvolveram o suficiente para passar a fase de readaptação ao ambiente externo e ao solo (tamanho mínimo de 4 cm).

A adaptação ao solo foi realizada com a utilização de bandejas de isopor e solo autoclavado. As plantas foram retiradas dos tubos de ensaio e suas raízes lavadas, para se retirar o excesso de meio de cultura.

As plantas foram plantadas com o colo na mesma altura do solo e a bandeja colocada por uma semana em presença de um umidificador de ambientes. Nos 30 dias seguintes, as plantas ficaram em local sombreado para completar a fase de adaptação.

As plantas então foram plantadas no solo, em estufas, sob condições de fotoperíodo longo (16 horas de luz natural e artificial / 8 horas de escuro) para proceder ao crescimento vegetativo. Quando as plantas apresentavam um tamanho médio de 30 cm de altura, o fotoperíodo da estufa foi modificado

para 9 horas de luz / 15 horas de escuro, com o objetivo de se induzir o florescimento.

A avaliação dos mutantes foi feita no florescimento com a contagem do número de mutantes de uma única cor, mutantes com mais de uma cor e mutantes de forma de inflorescência.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Indução de mutações "in vivo"

4.1.1 Experimento preliminar para determinação da radiosensitividade

Os resultados obtidos com a exposição das mudas enraizadas de crisântemo, variedades 'Tinsel branco' e 'Repin rosa', a diversas doses de raios gama, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Na Tabela 1 encontram-se os dados da variável altura média de plantas, com as médias observadas e as médias obtidas por regressão linear. Observou-se que para as duas variedades, houve uma decréscimo linear proporcional ao aumento da dose. O teste F para doses mostrou-se sempre altamente significativo, demonstrando a existência de doses que reduziram a altura das plantas.

A variedade 'Repin' apresentou sempre, uma redução mais acentuada da altura das plantas em função ao aumento das doses de radiação, em comparação com a variedade 'Tinsel', demonstrando assim uma maior sensibilidade ao mutagênico utilizado. Esta diferença entre variedades, reforça a necessidade

da realização de testes de sensibilidade ao se iniciar um trabalho de mutagênese.

A dose foi escolhida em função da redução média de 50% na altura das plantas (GR 50), aos 30 dias de plantio, o parâmetro que melhor representou a sensibilidade ao mutagênico usado. Para a variedade `Repin` a dose escolhida foi de 20 Gy de raios gama, que representou uma redução média de 53,0% em relação ao controle. A dose escolhida para a variedade `Tinsel`, foi de 22,5 Gy de raios gama, que reduziu, em média, a altura das plantas em 48,5% , em relação ao controle.

Tabela 1. Altura das plantas das variedades 'Tinsel branco' e 'Repin rosa', avaliada 30 dias após a irradiação de plantas com raios gama.

Doses (Gy)	Tinsel		Repin	
	Altura média de plantas		Altura média de plantas	
	Observada (cm) ⁽¹⁾	Regressão Linear ⁽²⁾ (cm) (%)	Observada (cm) ⁽¹⁾	Regressão Linear ⁽²⁾ (cm) (%)
0	27,2 a	32,6 (100)	86,5 a	101,3 (100)
7,5	28,9 a	27,3 (83,7)	-	-
12,5	26,2 a	23,8 (73,0)	83,8 a	67,3 (66,4)
17,5	24,8 ab	20,3 (62,3)	70,1 b	53,7 (53,0)
22,5	20,6 abc	16,8 (51,5)	39,8 c	40,1 (39,6)
27,5	10,2 bc	13,3 (40,8)	8,9 d	26,5 (26,2)
32,5	6,1 c	9,8 (30,1)	-	-
F	12,2 **	58,9 **	455,3 **	1374,3 **
CV(%)	17,55		5,35	

(1) Médias seguidas de letras iguais não diferem significamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5%.

(2) Altura das plantas em cm e em porcentagem, em relação ao controle considerado como 100%. Dados obtidos através de regressão linear $Y = (32,613 - 0,702 X)$ para variedade 'Tinsel' e $Y = (101,365 - 2,721 X)$ para variedade 'Repin'.

** Valor de F significativo, ao nível de 1%.

As variáveis, número de ramificações e porcentagem de sobrevivência, estão apresentadas na Tabela 2. Com relação ao número de ramificações, a análise apresentou um alto coeficiente de variação experimental para as duas variedades, o que talvez explique a não observância de diferenças significativas entre tratamentos da variedade 'Tinsel'.

Para a variedade 'Repin rosa', o teste F demonstra haver diferenças significativas entre tratamentos. Os tratamentos de 22,5 e 27,5 Gy foram os que produziram o maior número de ramificações laterais, isto pode ser explicado pelo efeito da radiação causando danos no meristema apical da planta, que é composto por células de grande atividade mitótica. Nestas doses haveria uma restrição da dominância apical devido a redução do crescimento do meristema apical, isto ocasionaria a brotação das gemas axilares até então dormentes, gerando assim um número maior de ramificações.

No caso das doses maiores do que 32,5 Gy, experimentos preliminares demonstraram que a radiação causou danos profundos, tanto nas células do meristema apical, como também nas dos meristemas axilares das duas variedades, impedindo o surgimento de ramificações laterais e ocasionando a paralisação total do crescimento das plantas, observado após o encerramento da avaliação, aos 30 dias.

A avaliação da porcentagem de sobrevivência demonstrou não haver diferenças significativas entre doses, isto

pode ter acontecido devido ao curto espaço de tempo, do plantio à avaliação (30 dias). Como algumas plantas não apresentavam crescimento do meristema apical nem de gemas axilares na época da avaliação, é possível que no futuro as mesmas não sobrevivessem.

Tabela 2. Número de ramificações e % de sobrevivência nas variedades 'Tinsel branco' e 'Repin rosa', avaliadas 30 dias após a irradiação das plantas com raios gama.

Doses (Gy)	Número de ramificações ⁽¹⁾		% de sobrevivência ⁽²⁾	
	Tinsel	Repin ⁽³⁾	Tinsel	Repin
0	1,20	0,73 b	77,58	87,11
7,5	1,25	-	90,00	-
12,5	1,48	0,77 b	86,29	84,23
17,5	1,62	0,79 b	81,50	85,89
22,5	1,74	1,27 a	90,00	87,11
27,5	1,57	1,12 a	90,00	90,00
32,5	0,84	-	85,76	-
F	3,25 ns	23,07 **	4,19 ns	0,52 ns
CV(%)	17,45	10,83	3,87	6,73

(1) Dados transformados pela equação de raiz quadrada de $(X + 0,5)$.

(2) Dados transformados pela equação de arco seno da raiz quadrada de $(X/100)$.

(3) Médias seguidas de letras iguais não diferem significamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5%.

** Valor de F significativo, ao nível de 1%.

ns Valor de F não significativo, ao nível de 5%.

Vários autores descrevem o uso de doses semelhantes, em trabalhos de indução de mutações "in vivo" com crisântemo. GUPTA & JUGRAN (1978) e DATTA (1987) usaram doses entre 15 e 25 Gy, obtendo mutantes de cor de inflorescência. ICHIKAWA et alii (1970) usaram doses bem mais altas, em torno de 50 a 200 Gy de raios gama, mas com baixas taxas de dose, numa irradiação por vários dias.

LATA (1980), trabalhando com rosas, considerou o parâmetro, porcentagem de sobrevivência com avaliação aos 18 meses, como o melhor para a escolha da dose de raios gama a ser utilizado no trabalho, a LD 50 (Dose letal de 50%) ficou entre 30 e 40 Gy para a maioria das variedades.

BOWEN et alii (1962) e DOWRICK & EL-BAYOUMI (1966b) trabalhando com crisântemo, utilizaram a porcentagem de sobrevivência como melhor parâmetro para a escolha das doses, mas com a avaliação realizada no florescimento.

BOWEN (1965) usou doses entre 20 e 40 Gy, com o objetivo de avaliar a frequência e o espectro de mutação nas diversas doses. Este é um recurso utilizado por alguns autores, conduzir um experimento preliminar utilizando diversas doses de mutagênico, com a avaliação no florescimento. Os parâmetros geralmente avaliados são a frequência de mutação, o espectro de mutação e a porcentagem de sobrevivência. Estes parâmetros podem ser classificados como diretos, pois a excessão da porcentagem de sobrevivência, eles representam os objetivos do experimento.

Há algumas desvantagens neste método, com relação:
A) ao prazo de conclusão ser maior; B) no caso de variedades que

apresentam baixas frequências de mutação, o número de plantas a serem avaliadas deve ser bem maior; C) há ainda a dificuldade nos critérios de avaliação devido a presença de inúmeros setores pequenos que diminuem a precisão da avaliação da frequência de mutação.

O método de avaliação da radiosensitividade utilizando parâmetros indiretos, como redução na altura de plantas, tem a vantagem do tempo curto e na precisão da avaliação. Entretanto, neste experimento não existiu uma correlação entre a altura das plantas e a porcentagem de sobrevivência, que não foi alterada aos 30 dias e não se podendo garantir que exista uma alta correlação entre o parâmetro usado e a frequência de mutação, como ocorre em outras culturas, como por exemplo, em cereais (GAUL, 1977).

O recomendado então é fazer testes de radiosensitividade em crisântemo, com a avaliação de parâmetros precisos tais como, porcentagem de sobrevivência e redução na altura das plantas, aos 2 meses, por exemplo, seguido da avaliação da frequência e o espectro de mutação na época do florescimento. Pode se obter então, correlações mais precisas entre estes diversos parâmetros que auxiliam na escolha da dose ideal para o trabalho. Estas correlações, se altas, possibilitam a escolha de qual parâmetro (redução altura de planta ou porcentagem de sobrevivência) e qual o nível de redução que deve ser usado (50 %, 70 %, etc...). Isto não pôde ser realizado no presente experimento devido ao curto espaço de tempo disponível.

Além dos dados apresentados nas Tabelas 1 e 2, foram observados, para as duas variedades, outros efeitos fisiológicos, principalmente nas doses mais altas. Os principais foram o aparecimento de folhas pequenas, cloróticas, quebradiças e deformadas.

4.1.2 Irradiação com dose escolhida e uso da técnica de podas repetidas

Baseando-se no ensaio anterior, usou-se a dose de 22,5 Gy de raios gama, para a variedade 'Tinsel branco' e 20 Gy para a variedade 'Repin rosa', aplicando-se então o método de podas repetidas, de acordo com a Figura 3.

Os números e a frequência de mutantes de cor, nas diversas gerações produzidas a partir da técnica de podas repetidas das plantas matrizes da variedade 'Tinsel branco', estão apresentados na Tabela 3. A avaliação foi realizada no florescimento. O controle não apresentou mutantes espontâneos.

A variedade 'Tinsel branco' apresentou uma baixa frequência de produção de mutantes, um total de 0,58 % de mutantes em relação ao número de plantas avaliadas. Este resultado não deve ser atribuído a uma possível baixa dosagem de mutagênico utilizado, pois BOWEN (1965), utilizou doses de 25 Gy em mudas de crisântemo, variedade 'Target rosa' e obteve frequências de mutação entre 30 e 60 % das plantas avaliadas. DOWRICK & EL-BAYOUMI (1966b), também trabalhando com variedade de cor rosa ('New Princess'), obtiveram frequências de mutação entre 17 e 56 %.

Uma possibilidade mais concreta para o fato está na menor capacidade da variedade 'Tinsel branco' em produzir mutantes. Segundo JANK (1957), citado por BROERTJES & VAN HARTEN (1988), as variedades de crisântemo de cor branca, não são o melhor material inicial para trabalhos que visam a obtenção de mutantes de cor de flor. O autor se baseou em análises estatísticas para comprovar tal fato.

Pelos dados da Tabela 3, aparentemente teria havido uma grande variação na porcentagem de mutantes obtidos, nas diversas gerações do processo de podas repetidas. Entretanto, resolveu-se não se fazer inferências a respeito destes dados, devido a maneira como foram conduzidas as plantas matrizes, selecionando-se ao acaso as gemas que se desenvolveram em cada geração e descartando as demais.

O espectro de mutação, para coloração se restringiu a três tipos: o amarelo pálido, o rosa pálido e o amarelo. As plantas mutantes de cor rosa pálido apresentavam uma cor rosa mais intensa na parte inferior da pétala e a cor branca na parte superior da mesma. Num estágio de desenvolvimento posterior (flor completamente aberta) e em épocas mais quentes do ano, este mutante apresentava-se com uma cor quase completamente branca.

Os mutantes de cor amarelo apresentavam uma cor mais clara do que a da variedade 'Tinsel amarelo', já comercializado. Não houve então o aparecimento de nenhuma planta mutante com valor comercial.

Com relação a forma da inflorescência, foram obtidos diversos mutantes, tais como: inflorescências com pétalas mais abertas, pétalas tubulares, menor número de pétalas, flores com pétalas disformes, todas também sem valor comercial.

Segundo o modelo de STEWART E DERMEN (1970) ilustrado na Figura 1, para a constituição das diferentes camadas celulares de uma família de mutantes de cor de crisântemo, partindo-se de uma planta de cor branca, há uma maior probabilidade de se obter mutantes de cor amarela.

Uma possibilidade é a ocorrência de mutação na camada LI, ocasionando inativação, perda do gene ou parte do cromossomo que contém o gene dominante supressor I para a formação de carotenóide (pigmento amarelo), este pigmento estaria localizado no citoplasma celular. Uma segunda hipótese aceita é a ocorrência de rearranjos de camadas celulares, neste caso, haveria a possibilidade de camadas celulares mais internas que expressam a produção de pétalas de cor amarela, tomar o lugar de camadas mais externas que produzem pétalas de cor branca.

A presença do mutante rosa, a partir de uma variedade branca era inesperado e pode ser explicada, provavelmente pela ocorrência de rearranjos das camadas celulares. As camadas mais externas do ápice sofrem algum dano ou até a morte, possibilitando às camadas mais internas que provavelmente condicionam para produção de pigmentos de cor rosa a sua expressão, resultando no aparecimento de flores rosa.

Uma segunda hipótese é a da ocorrência de mutação gênica, de recessivo para dominante, no gene da camada LI, que

condiciona a produção do pigmento antocianina, se esta variedade pertencer ao grupo de variedades, descritas no trabalho de HATTORI (1992), que apresenta herança monogênica dominante para este caráter.

A confirmação destas hipóteses poderia ser feita através de estudos citogenéticos das camadas celulares desta variedade e seus mutantes, utilizando-se das técnicas descritas por STEWART E DERMEN (1970), que fizeram exames microscópicos de cortes de pétalas frescas e análise do espectro de absorção de pigmentos em microespectrofotômetro.

Uma segunda forma seria através de testes de determinação de presença de antocianina e carotenóide, pela técnica de análise com espectrofotômetro em pétalas frescas e intactas (HATTORY, 1991 e HATTORY, 1992). Esta técnica segundo o autor, possui grandes vantagens pela capacidade de se analisar a presença dos principais pigmentos, em grandes quantidades de amostras, num tempo relativamente curto e com alta precisão no resultado.

Outras formas de se fazer este estudo são através da avaliação no florescimento de plantas obtidas "in vitro", através da técnica de regeneração de plantas a partir de suspensão celular, usando pétalas como explante inicial ou de gemas adventícias, determinando-se assim a constituição da camada LI.

Os testes de progênie podem dar uma idéia da constituição da camada LII pois, segundo LANGTON (1980), esta camada celular é a responsável pela formação dos gametas

masculinos e femininos. A análise dos cruzamentos entre mutantes de uma mesma família (mutantes de cor originados de uma mesma variedade), podem dar informações precisas sobre a constituição quimérica dos mutantes e da variedade inicial, além de determinar a causa da origem do mutante, se através de rearranjo de camadas ou se através de mutação verdadeira.

Tabela 3. Número e frequência de mutantes de cor e forma das inflorescências, da variedade 'Tinsel branco', avaliados no florescimento das diversas gerações obtidas pelo método de podas repetidas, após a irradiação de plantas com 22,5 Gy de raios gama.

Geração	Plantas avaliadas	Mutantes observados na inflorescência				Total de mutantes observados(3)	
		cor	(%)	forma	(%)	Nº	(%)
M1V1(1)	417	3	0,72	0	0	3	0,72
M1V1(2)	1180	4	0,34	0	0	4	0,34
M1V2	1083	6	0,55	0	0	6	0,55
M1V3	1049	1	0,09	3	0,29	4	0,38
M1V4	1074	6	0,56	3	0,28	9	0,84
M1V5	1032	4	0,39	2	0,19	6	0,58
M1V6	1080	1	0,09	7	0,65	8	0,74
TOTAL	6915	25	0,36	15	0,22	40	0,58

(1) M1V1(1) - Geração M1V1 proveniente da 1ª poda da planta matriz, executada no ramo principal. Obteve-se uma muda M1V1(1) de cada planta matriz.

(2) M1V1(2) - Geração M1V1 proveniente da 2ª poda da planta matriz, executada em ramos desenvolvidos de gemas axilares. Obteve-se três mudas M1V1(2) de cada planta matriz.

(3) Nas gerações provenientes do controle, não foram observados mutantes, avaliando-se um total de 1721 plantas; sendo 92 da geração M1V1(1); 300 da geração M1V1(2); 270 da geração M1V2; 272 da geração M1V3; 277 da geração M1V4; 262 da geração M1V5 e 248 da geração M1V6.

A Tabela 4 apresenta os resultados do número de mutantes de cor e forma de inflorescência, nas diversas gerações produzidas a partir da técnica de podas repetidas da planta, variedade 'Repin rosa'. A avaliação foi realizada no florescimento. O controle não apresentou plantas mutantes espontâneos.

A variedade 'Repin rosa' apresentou uma frequência de produção de mutantes bem superior a variedade 'Tinsel branco', um total de 5,98 % de mutantes em relação ao número de plantas avaliadas. Estes resultados comprovam trabalhos anteriores, de outros autores que afirmam que as variedades de cor rosa são mais fáceis de produzir mutantes que as de cor branca (BROERTJES, 1966).

As mutações de cor foram responsáveis por 97 % do total de mutantes obtidos, apenas 3 % dos mutantes possuíam a inflorescência com o formato diferente. BROERTJES (1966) encontrou frequência de mutantes de forma entre 9 e 18 % do total, usando doses entre 15 e 25 Gy de raios X. ICHIKAWA (1970) encontrou apenas 3 mutantes de forma, mas apenas na dose mais alta, em torno de 20 Gy de raios gama, o autor conclui que altas doses devem ser usadas com o objetivo de produção de mutantes de forma, enquanto baixas doses devem ser preferidas para a indução de mutações de cor de inflorescência.

Apesar da dose utilizada no presente experimento ter sido semelhante a dose usada por ICHIKAWA (1970), em torno de 20 Gy, a dose não demonstrou ser elevada para esta variedade e nas condições experimentais, pois apesar de ter sido responsável

pela redução de 50 % na altura das plantas, não alterou a sobrevivência, o número de ramificações e nem ocasionou efeitos fisiológicos mais drásticos tais como folhas cloróticas, deformadas, plantas multifaceadas. Assim, se justifica a ocorrência de elevado número de mutações de cor em comparação as mutações de forma de inflorescência.

Tabela 4. Número e frequência de mutantes de cor e forma das inflorescências, da variedade 'Repin rosa', avaliados no florescimento das diversas gerações obtidas pelo método de podas repetidas, após a irradiação de plantas com 20 Gy de raios gama.

Geração	Plantas avaliadas	Mutantes observados na inflorescência				Total de mutantes observados (3)	
		cor	(%)	forma	(%)	Nº	(%)
M1V1(1)	577	68	11,78	2	0,34	70	12,13
M1V1(2)	1725	113	6,55	1	0,06	114	6,61
M1V2(4)	-	-	-	-	-	-	-
M1V3	1550	71	4,58	4	0,26	75	4,84
M1V4	1308	75	5,73	0	0	75	5,73
M1V5	1284	69	5,37	0	0	69	5,37
M1V6	1320	54	4,09	7	0,53	61	4,62
TOTAL	7764	450	5,80	14	0,18	464	5,98

(1) M1V1(1) - Geração M1V1 proveniente da 1ª poda da planta matriz, executada no ramo principal. Obteve-se uma muda M1V1(1) de cada planta matriz.

(2) M1V1(2) - Geração M1V1 proveniente da 2ª poda da planta matriz, executada em ramos desenvolvidos de gemas axilares. Obteve-se 3 mudas M1V1(2) de cada planta matriz.

(3) Nas gerações provenientes do controle, não foram observados mutantes, avaliando-se um total de 1609 plantas; sendo 107 da geração M1V1(1); 324 da geração M1V1(2); 316 da geração M1V3; 300 da geração M1V4; 284 da geração M1V5 e 278 da geração M1V6.

(4) Parcela perdida em função de problemas fitossanitários.

A Tabela 5 mostra o espectro de mutações de cor, da variedade 'Repin' e em que geração o mutante foi observado. O espectro de mutações de cor da variedade 'Repin rosa', foi maior do que o observado em 'Tinsel branco'. As principais cores obtidas foram: rosa escuro, rosa pálido, branco, amarelo pálido, bronze, champanhe, marrom-avermelhado, creme, rajado bronze/rosa, rajado champanhe/rosa e rajado champanhe/bronze. Todas plantas com cor diferente podem ser resultantes de rearranjos de camadas celulares, associados ou não a mutações verdadeiras. Destes mutantes foram selecionados 3 que apresentavam potencial para comercialização.

A variedade 'Repin rosa' apresentou um maior número de mutantes de cor bronze, com um total de 229 mutantes, na sequência vieram os mutantes de cor de champanhe, rosa escuro, rajado bronze/rosa, rosa claro, branco, amarelo claro, creme, rajado champanhe/bronze, rajado champanhe/rosa e marrom-avermelhado.

É interessante notar que alguns mutantes apareceram somente em algumas gerações, enquanto outros apareceram em todas gerações.

A utilização do método de podas repetidas da planta, teve como objetivo principal, a ampliação do setor mutado antes da seleção, associado a vantagem de que uma maior quantidade de setores mutados (setores contidos em gemas axilares e outros tecidos que não pertençam ao meristema apical), ter a possibilidade de se desenvolver, podendo ser selecionados nas várias gerações que irão florescer.

Uma dificuldade encontrada foi a necessidade da condução da planta matriz com apenas três ramos. A razão para tal fato se deveu a padronização, da época da retirada da parte apical (poda) e da geração em que se encontrava cada muda (M1V1, M1V2, por exemplo). Assim, gemas que deram origem a ramos e posteriormente a mudas foram escolhidas ao acaso. Muitas gemas foram eliminadas.

Para seleção das mudas a serem eliminadas ou retiradas na planta matriz, levou-se em conta o trabalho de BOWEN (1965), que recomendava a utilização preferencialmente de mudas basais, pois estas produzem mutantes completos (não setoriais). A seleção foi feita então ao acaso, mas dando preferência às mudas basais.

Seria importante comparar as frequências de obtenção de mutantes, em cada geração do método de podas repetidas da planta, para determinar se existe um padrão para o aumento de tamanho dos setores e para perda de setores menores em função do avanço das gerações. Entretanto, isto só seria possível se fosse permitido a planta desenvolver todas as gemas axilares após cada poda e se avaliasse todas plantas provenientes destes ramos. Esta avaliação deveria ser feita, no máximo, até a geração M1V3, pois seria impossível manter a padronização do estágio dos ramos após esta geração.

A escolha das gemas ao acaso explica também o aparecimento de mutantes em apenas algumas gerações.

Tabela 5. Espectro de mutações⁽³⁾, na coloração da inflorescência da variedade 'Repin' rosa. Avaliações efetuadas no florescimento das diversas gerações⁽⁴⁾, obtidas pelo método de podas repetidas, após a irradiação com 20 Gy de raios gama.

CORES	M1V1(1)	M1V1(2)	M1V3	M1V4	M1V5	M1V6	TOTAL
Bronze	43	60	36	35	31	24	229
Champanhe	13	33	11	14	15	10	96
Rosa escuro	4	6	6	4	9	6	35
Rosa claro	1	2	6	8	2	1	20
Creme	-	-	-	-	3	2	5
Branco	-	2	3	9	2	3	19
Amarelo	2	1	3	1	2	2	11
Marrom- avermelhado	-	-	1	-	-	-	1
Rajado Bronze/Rosa	5	8	1	2	5	4	25
Rajado Champanhe/Rosa	-	-	3	-	-	1	4
Rajado Champanhe/Bronze	-	1	1	2	-	1	5
TOTAL	68	113	71	75	69	54	450

(1) M1V1(1) - Geração M1V1 proveniente da 1ª poda da planta matriz, executada no ramo principal. Obteve-se uma muda M1V1(1) de cada planta matriz.

(2) M1V1(2) - Geração M1V1 proveniente da 2ª poda da planta matriz, executada em ramos desenvolvidos de gemas axilares. Obteve-se 3 mudas M1V1(2) de cada planta matriz.

(3) Nas gerações provenientes do controle, não foram observados mutantes.

(4) A parcela M1V2 foi perdida em função de problemas fitossanitários.

A ampliação do tamanho dos setores, pôde ser avaliada na Tabela 6 aonde foram discriminados dois grupos. O primeiro grupo foi formado por plantas mutantes de cor que se apresentavam com a cor apenas uma cor, em todas as inflorescências. Este grupo era formado por mutantes periclinais (com a camada LI totalmente mutada) ou mutantes sólidos (planta totalmente mutada).

O segundo continha todas as plantas que apresentavam flores de duas ou mais cores numa única flor (flor metade rosa metade bronze, por exemplo) ou plantas com flores de cores diferentes numa única planta (planta com uma flor completamente rosa e outra flor toda bronze, por exemplo), sendo chamadas de quimeras setoriais.

Examinando estes dados, pode-se verificar uma tendência ao aumento do tamanho do setor mutado com o avanço das gerações. Na geração M1V1⁽¹⁾ a frequência de mutantes de uma única cor (possivelmente periclinais) era de 5,8 %, na geração M1V4 a frequência passou para 81,1 %. A partir da geração M1V4, observou-se uma tendência a estabilização de mutantes de uma única cor, em torno de 81,5 %.

Conclue-se então que, neste experimento, a técnica de podas repetidas atuou ampliando os setores mutados somente até a geração M1V4. BROERTJES & VAN HARTEN (1988) recomendam o uso de 2 a 3 podas da planta irradiada. Uma outra conclusão importante é a de que esta técnica, pelo menos até a geração M1V6, não conseguiu tornar todas as plantas quimeras periclinais (100 % de

plantas mutantes periclinais). Nas figuras 4 e 5, observa-se a ocorrência de flores e plantas que contêm setores quiméricos.



Figura 4 - Foto ilustrativa da flor do mutante branco, contendo setores nas pétalas, da cor original rosa. Em comparação com a flor da variedade inicial 'Repin rosa'.



Figura 5 - Foto ilustrativa de planta da variedade 'Repin rosa', contendo flores rosa e flores com setores grandes de cor bronze.

Tabela 6. Frequência de mutações (3), de uma ou de mais de uma coloração nas inflorescências da variedade 'Repin rosa'. Avaliações efetuadas no florescimento das diversas gerações (4), obtidas pelo método de podas repetidas após a irradiação com 20 Gy de raios gama.

Geração	Mutantes com uma única cor (5)		Mutantes com duas ou mais cores(6)		Total mutantes cor	
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
M1V1(1)	4	(5,8)	64	(94,2)	68	(100)
M1V1(2)	10	(8,8)	103	(91,2)	113	(100)
M1V3	50	(70,4)	21	(29,6)	71	(100)
M1V4	60	(81,1)	14	(18,9)	74	(100)
M1V5	57	(81,4)	13	(18,6)	70	(100)
M1V6	44	(81,5)	10	(18,5)	54	(100)
TOTAL	225	(50,0)	225	(50,0)	450	(100)

(1) M1V1(1) - Geração M1V1 proveniente da 1ª poda da planta matriz, executada no ramo principal. Obteve-se uma muda M1V1(1) de cada planta matriz.

(2) M1V1(2) - Geração M1V1 proveniente da 2ª poda da planta matriz, executada em ramos desenvolvidos de gemas axilares. Obteve-se 3 mudas M1V1(2) de cada planta matriz.

(3) Nas gerações provenientes do controle não foram observados mutantes.

(4) A parcela M1V2 foi perdida em função de problemas fitossanitários.

(5) Plantas com apenas uma cor, branco, bronze, amarelo, etc..., em porcentagem, tomando o total de cada geração como 100%.

(6) Plantas com mais de uma cor. Em porcentagem, tomando o total de cada geração como 100%

4.1.3 Ensaio de estabilidade de coloração das flores e produtividade

O ensaio teve como objetivo principal, avaliar a produtividade dos mutantes selecionados em comparação com a variedade inicial e além disto, verificar se as características da coloração da flor, se manteriam após uma geração de propagação vegetativa (teste de estabilidade).

Com relação a estabilidade, os resultados obtidos indicaram a modificação da coloração do mutante de cor creme que, se apresentou com uma cor bem mais clara do que a planta anteriormente selecionada sendo então descartado. Os outros dois mutantes, o de cor branco e o rosa escuro, apresentaram-se com uma cor semelhante à das plantas anteriormente selecionadas. Entretanto, houve o aparecimento de algumas poucas plantas que ainda apresentavam quimeras, isto é, flores com setores de outra coloração, isto demonstrou a necessidade de uma nova seleção de plantas mutantes periclinais (com apenas uma cor na planta toda), dentro das parcelas colhidas neste experimento. Na figura 6, verifica-se a cor de flor dos três mutantes selecionados, em comparação com a variedade inicial.



Figura 6 - Foto ilustrativa das flores dos três mutantes de cor em comparação com a cor da variedade inicial, 'Repin rosa'. Na sequência, mutante de cor rosa escuro, creme, branco e embaixo, a variedade inicial, rosa.

Os dados obtidos com a avaliação dos parâmetros, número de dias de ciclo, número de flores abertas por planta, altura média de plantas e peso fresco de 10 plantas, estão expressos na tabela 7. Pode-se observar que quase não houve diferenças entre a variedade e os mutantes avaliados com relação ao número de dias do ciclo, apenas pode-se observar uma tendência do mutante de cor branco em ser mais precoce (3 dias), com florescimento aos 91 dias do plantio.

Para o parâmetro, número de flores abertas por planta, não se observou uma variação significativa entre a variedade 'Repin' e os mutantes avaliados, as médias observadas ficaram em torno de 7 flores por planta. Pode-se concluir então que este caráter não foi afetado quando da ocorrência da modificação da cor da flor, seja através de mutação verdadeira ou por rearranjo de camadas celulares. As variedades comerciais de corte devem produzir um mínimo de 5 flores por planta, flores estas de tamanho razoável, o que ocorreu com os mutantes selecionados.

Tabela 7. Avaliação do número de dias de ciclo, número de flores abertas por planta, altura média de plantas e peso fresco de 10 plantas, da variedade 'Repin rosa' e de 2 mutantes obtidos pelo método de podas repetidas.

Tratamento	Nº dias ciclo	Nº flores abertas planta	Altura média plantas (cm) (1)	Peso fresco 10 Plantas (g)
Controle	94	7,20	123,0 a	615,83
Rosa escuro	94	7,16	119,0 a	542,50
Branco	91	7,02	98,5 b	535,42
F		1,99 ns	36,18 **	1,63 ns
CV(%)		38,72	3,30	17,67

(1) Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5%.

** Valor de F significativo, ao nível de 1%.

ns Valor de F não significativo, ao nível de 5%.

Na análise dos dados do parâmetro altura de plantas, o resultado do teste de F para tratamentos demonstrou a existência de diferenças significativas entre tratamentos. O mutante de cor branco foi o único que demonstrou diferença em relação ao controle, a altura média obtida para esta variedade foi de 98,5 cm. Enquanto o controle apresentou uma altura média de 123,0 cm.

Os dados demonstram não haver diferenças significativas entre a variedade e os mutantes, para o parâmetro

peso fresco de 10 plantas. No entanto, observa-se uma tendência dos mutantes de cor branco e o de cor rosa escuro em apresentarem um menor peso fresco. O ramalhete da variedade 'Repin rosa' foi, em média, 15 % mais pesado do que o do mutante de cor branco e 13 % a mais do que do mutante de cor rosa escuro.

A importância da avaliação da produtividade através do parâmetro peso fresco de 10 plantas, está no fato da espécie ser bastante comercializada na forma de maços de 0,5 Kg de peso fresco, então quanto menor o peso de cada planta maior o número de plantas por maço, o que é um aspecto indesejável.

As diferenças observadas entre tratamentos nestes dois parâmetros podem ser explicadas, pela presença de plantas pouco desenvolvidas dentro das parcelas das plantas mutantes que, no caso, reduziram as médias das parcelas. A origem destas plantas pode ser devido a ocorrência de mutações em camadas mais internas ou mutações múltiplas que resultariam na modificação completa do genótipo.

Observou-se também a presença de grande diversidade entre plantas, dentro de uma mesma parcela e entre parcelas. Houve o aparecimento de plantas mutantes promissoras, isto é, indivíduos que apresentaram um grande crescimento vegetativo e um bom vigor, foi necessário então, a realização de uma nova seleção, com o objetivo de multiplicar somente os genótipos superiores. Isto foi feito e resultou num lote de plantas mutantes com boas características de produtividade.

Os dois mutantes selecionados e multiplicados, foram batizados de 'Ingrid' (mutante de cor rosa escuro) e

‘Cristiane’ (mutante de cor branco) e já estão sendo comercializados, na forma de mudas para os produtores e flores cortadas para o comércio.

Com relação a conservação pós-colheita, os resultados estão na Tabela 8. Todos os tratamentos demoraram em torno de 10 dias para a senescência das flores, isto demonstra que houve a manutenção da conservação dos mutantes, fato este de importância para a comercialização.

Tabela 8. Avaliação da conservação pós-colheita, dos mutantes ‘Ingrid’ e ‘Cristiane’, em relação a variedade original ‘Repin rosa’.

Material	Número de dias para as flores entrarem em senescência
Controle	10
‘Cristiane’	10
‘Ingrid’	10

4.2 Indução de mutações "in vitro"

4.2.1 Metodologia de produção de gemas adventícias

4.2.1.1 Experimento de regeneração de pedicelos

Os resultados da avaliação dos diversos níveis de reguladores de crescimento, ácido indolilacético (IAA) e 6-benzil aminopurina (BAP), na regeneração de plantas "in vitro" através de gemas adventícias obtidas, usando-se como explantes pedicelos florais, encontram-se na Tabela 9.

Utilizaram-se três parâmetros para avaliar a eficiência das várias combinações de reguladores de crescimento, na capacidade de produção de mudas.

O primeiro foi a relação número de mudas produzidas sob o número de pedicelos não contaminados, este parâmetro engloba a ação do meio, na capacidade de regeneração dos pedicelos (número de mudas regeneradas por pedicelo) e no número pedicelos que regeneram (possível perda de capacidade de regeneração do pedicelo devido ao meio), dando uma avaliação precisa da influência do meio de cultivo na capacidade de produção de mudas. Devido a isto, este foi o parâmetro escolhido para a determinação do meio de cultivo a ser utilizado.

O segundo parâmetro, foi a relação número de mudas produzidas sob o número de pedicelos regenerados. Este determina somente a ação do meio, na capacidade de regeneração dos

pedicelos (número de mudas regeneradas por pedicelo), mas não determina a ação do meio no número de pedicelos que regeneram.

O último parâmetro usado foi a relação número de mudas produzidas sob o número de pedicelos inoculados. Este parâmetro engloba a ação do meio, na capacidade de regeneração dos pedicelos (número de mudas regeneradas por pedicelo), no número pedicelos que regeneram (possível perda de capacidade de regeneração do pedicelo devido ao meio) e o número de pedicelos contaminados no experimento. Assim este parâmetro deve ser usado apenas no planejamento experimental, pois dá uma idéia da quantidade de pedicelos a serem inoculados para se obter um número adequado de plantas a serem avaliadas no campo (supondo a porcentagem de contaminação como estável).

Estes parâmetros são semelhantes aos usados por BROERTJES et alii (1976), para avaliar a radiosensitividade de diversos explantes de crisântemo a diversas doses de raios X.

Em todos os parâmetros avaliados o meio em que se obteve melhor resultado, foi constituído de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ da IAA, com a obtenção de 1,22 mudas, maiores de 0,4 cm para cada pedicelo não contaminado (dados não transformados). O alto coeficiente de variação experimental não impediu a ocorrência de diferenças significativas entre tratamentos. No meio sem regulador de crescimento não se obteve regeneração de mudas.

ROEST & BOKELMANN (1975), usaram o meio básico de MS, ligeiramente modificado e adicionado de reguladores de crescimento. Para a variedade 'Super yellow', o melhor nível de

reguladores de crescimento foi de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de IAA e para a variedade 'Bravo', $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de IAA. As médias de obtenção de mudas, foram de 11,3 mudas para cada pedicelo inoculado, da variedade 'Super yellow' e de 2,6 mudas para cada pedicelo inoculado, da variedade 'Bravo', com avaliação aos 80 dias.

BROERTJES et alii (1976), obtiveram uma média de 30,5 mudas regeneradas com mais de 0,4 cm de altura, da variedade 'Bravo', para cada pedicelo inoculado, aos 60-90 dias de avaliação, o meio usado foi o mesmo descrito no trabalho de ROEST & BOKELMANN (1975).

O número de médio de mudas obtidas, no presente, trabalho foi bem menor que as obtidas nos trabalhos de ROEST & BOKELMANN (1975) e BROERTJES et alii (1976), mas deve se levar em conta que, em tais pesquisas, a avaliação foi efetuada entre 60 e 90 dias e neste trabalho, a avaliação foi feita aos 30 dias da inoculação. Pode ser que o aumento do tempo da avaliação causasse o aumento no número de mudas regeneradas.

Tabela 9. Efeitos de diferentes níveis de BAP e IAA, na regeneração de plantas (mudas maiores que 0,4 cm) da variedade 'Repin rosa', a partir do cultivo "in vitro" de pedicelos florais em meio básico MS, com caseína hidrolisada (1 g.L⁻¹). Avaliação efetuada aos 30 dias após a inoculação.

Tratamento (mg.L ⁻¹)	Número de mudas por pedicelo		
	Não contaminado (1)	(2)	Regenerado Inoculado
BAP 0,0+IAA 0,0	0,00	b	0
BAP 1,0+IAA 0,1	0,30	ab	1,20
BAP 2,0+IAA 0,1	0,44	ab	1,40
BAP 3,0+IAA 0,1	0,21	ab	1,00
BAP 1,0+IAA 0,5	0,37	ab	1,40
BAP 2,0+IAA 0,5	1,22	a	2,75
BAP 3,0+IAA 0,5	0,68	ab	2,16
BAP 1,0+IAA 1,0	0,70	ab	1,75
BAP 2,0+IAA 1,0	0,42	ab	1,14
BAP 3,0+IAA 1,0	0,42	ab	2,66
F	2,34	*	
CV(%)	39,50		

(1) Dados originais observados.

(2) Médias seguidas letras iguais não diferem significamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5%.

* Valor de F significativo, ao nível de 5%.

4.2.1.2 Experimento de enraizamento e desenvolvimento das plantas

A mudas de crisântemo "in vitro", obtidas através do método descrito anteriormente, foram selecionadas, destacadas e colocadas em meio de enraizamento e crescimento.

O meio utilizado foi o mesmo do experimento de regeneração de plantas. O meio básico MS acrescido de 1 g.L^{-1} de caseína hidrolisada e 30 g.L^{-1} de sacarose. O regulador de crescimento usado foi o ácido indolilacético, em diversas concentrações.

Para o parâmetro porcentagem de sobrevivência, não houve diferenças significativas entre tratamentos. Todos os tratamentos obtiveram aproximadamente 100 % de sobrevivência.

Os resultados dos parâmetros, altura de plantas e peso fresco de plantas, estão contidos na Tabela 10. Os dados demonstram não haver diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos. Entretanto o tratamento sem a presença de regulador de crescimento, foi o que apresentou plantas de melhor aspecto visual. Estas plantas apresentavam um menor número de raízes, mas com maior vigor. A parte aérea também possuía, em média, folhas e caules de maior vigor.

Os tratamentos compostos por níveis mais elevados de IAA apresentaram plantas raquíticas e com um elevado número de raízes pequenas e finas, talvez devido a existência de certos níveis de auxina endógena.

Devido a isto, o meio escolhido para promover o crescimento e o enraizamento das plantas foi o meio sem reguladores de crescimento.

Os parâmetros avaliados não conseguiram detectar estas diferenças, devido ao fato de se avaliar o peso fresco total das plantas e não o peso fresco da parte aérea. Um outro problema foi a presença de um alto coeficiente de variação experimental que pôde causar a não detecção das diferenças significativas existentes.

DE JONG & CUSTERS (1986), usaram o meio semelhante mas acrescido de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de IAA e descreveram ter obtidos bons resultados. ROEST & BOKELMANN (1975), relataram que o melhor meio de enraizamento para as suas condições experimentais e variedades usadas, foi o meio MS ligeiramente modificado, acrescido de 20 g.L^{-1} de sacarose e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de IAA.

Tabela 10. Efeito de diferentes níveis de IAA, na altura e peso fresco de plantas "in vitro", da variedade 'Repin rosa', a partir do subcultivo de mudas de 0,4 cm de altura, usando o meio básico MS, com caseína hidrolisada (1 g.L⁻¹). Avaliação efetuada aos 30 dias após a inoculação.

Tratamento (mg.L ⁻¹)	Altura de plantas (cm)	Peso Fresco de plantas (g)
IAA 0,0	3,42	1,15
IAA 0,1	3,74	0,93
IAA 0,5	3,84	1,24
IAA 1,0	3,58	1,30
IAA 1,5	3,50	1,33
F	0,10 ns	1,31 ns
CV(%)	56,45	45,40

ns Valor de F não significativo, ao nível de 5%.

4.2.1.3 Experimento de readaptação das plantas "in vitro", às condições ambientais externas

As frequências de sobrevivência de mudas, neste experimento foram de aproximadamente 82,2 %, para o tratamento número 1, 20 % para o segundo tratamento e de 0 % para o último tratamento. Assim os dados demonstram que o melhor tratamento foi o número 1, que consistiu em se retirar as plantas da condição "in vitro" e colocar em bandejas com solo autoclavado, numa

câmara na presença de um umidificador de ambientes por aproximadamente uma semana, após as plantas foram colocadas em um local fresco e sombreado até completar aproximadamente 1 mês, quando as mudas foram levadas ao solo.

É importante observar que as plantas "in vitro", são muito mais sensíveis que as provenientes de mudas e perdem umidade com a maior facilidade, então torna-se imperativo que este processo de transfêrencia do vidro para o solo, também seja feito numa câmara, na presença do umidificador, pois assim, as perdas serão menores.

Foi verificado também a ocorrência de uma pequena porcentagem de perda de mudas devido ao "tombamento", sem que se tenha descoberto efetivamente a causa, se por causa de danos físicos decorrentes do transplântio ou se pela ação de patógenos, principalmente do solo. O cuidado então deve ser redobrado no processo de autoclavagem do solo, na limpeza das bandejas e na pureza da água utilizada, além destes pode-se usar a imersão da parte basal e colo das plantas em solução de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de Benomyl (Benlate 500), por 15 segundos.

O segundo tratamento apresentou uma menor frequência de aproveitamento, em torno de 20 % de mudas adaptadas. As maiores perdas se deram devido a ocorrência de contaminação do meio de cultura. O processo poderia ser aprimorado com a utilização de tampas de vidros que permitissem uma maior troca gasosa com o meio ambiente, sem contudo permitir a entrada de contaminantes. De qualquer forma, neste tratamento, as plantas sobreviventes sofreram maiores danos devido a redução

da umidade relativa, do que as do tratamento 1. Os principais danos foram a desidratação de folhas e a morte do meristema apical.

A vantagem do tratamento número 1 é que a planta realiza a sua adaptação ao solo, num ambiente de umidade relativa do ar em torno de 100 %, semelhante ao que existia no vidro. Quando se inicia o processo de redução desta umidade, a planta já possui um sistema radicular capaz de absorver a quantidade de água necessária para repor as perdas por evapotranspiração.

Através do terceiro tratamento não se conseguiu adaptar nenhuma muda, pois todas morreram devido ao choque entre o ambiente "in vitro", com 100 % de umidade relativa do ar e o ambiente externo, com a umidade bem menor.

4.2.2 Teste de radiosensitividade de pedicelos

Os dados a respeito da radiosensitividade de pedicelos de crisântemo à radiação gama estão apresentados na Tabela 11. Foram avaliados dois parâmetros que poderiam determinar a resposta do explante a radiação.

A radiação pode afetar a capacidade de organogênese de um explante até o limite em que ele perca completamente a capacidade de regeneração. Pode-se notar por exemplo, que a dose de 10 Gy reduziu o número de pedicelos que regeneraram, em torno de 44,5 %.

A radiação afetou também o número de mudas que cada pedicelo teve condições de produzir. Na dose de 10 Gy de

raios gama cada pedicelo produziu em média, 3,48 mudas. No controle cada pedicelo produziu uma média de 7,93 mudas.

O parâmetro que melhor refletiu a sensibilidade ao mutagênico é o número de plantas regeneradas pelo o número total de pedicelos inoculados não contaminados, que inclui os pedicelos que regeneram e os que não regeneram.

O critério usado para a seleção da dose, foi o da redução em torno de 50 % no número de mudas regeneradas por pedicelo não contaminado, escolhendo-se então a dose de 8 Gy de raios gama.

DE JONG & CUSTERS (1986) e BROERTJES et alii (1976) usaram doses semelhantes, em torno de 8 Gy, mas com raios X.

AHLOOWALIA (1992) relatou ter usado uma dose bem maior, em torno de 20 Gy de raios gama, em uma série de variedades obtendo também um grande número de mutantes.

BROERTJES et alii (1976) obtiveram na testemunha em torno de 30 mudas por pedicelo que regenerava e na dose de 8 Gy, houve uma redução para 14,7 mudas por pedicelo. No presente experimento a variação foi próxima de 50 %, com uma redução de 7,52 mudas no controle, para 4,16 mudas por pedicelo não contaminado, na dose 8 Gy.

Tabela 11. Efeito da radiação gama na regeneração "in vitro", de plantas da variedade 'Repin rosa', obtidas através do cultivo de pedicelos florais. Avaliação efetuada 30 dias após a inoculação.

Doses (Gy)	Número de mudas por pedicelo		Regenerado	% Pedicelos que Regeneram
	Não contaminado (1)	(2)		
0	7,52	a	7,93	100
6,0	6,00	ab	7,29	91,1
8,0	4,16	bc	6,05	82,3
10,0	1,39	d	3,48	55,5
12,0	3,09	c	4,41	82,0
F	24,96 **			
CV(%)	35,21			

(1) Dados originais observados.

(2) Médias seguidas letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5%.

** Valor de F significativo, ao nível de 1%.

4.2.3 Irradiação de pedicelos visando a seleção de mutantes

O experimento foi realizado em quatro repetições, com a irradiação de 200 pedicelos por repetição, além de 20 pedicelos como controle, perfazendo um total de 800 pedicelos

inoculados no tratamento e 80 pedicelos inoculados, como controle.

A Tabela 12 foi obtida com os dados das 4 repetições e tem como objetivo avaliar se neste experimento os dados seriam semelhantes aos do estudo de radiosensitividade, relatado anteriormente.

Os dados demonstram portanto que a repetibilidade foi apenas parcialmente alcançada. O número médio de mudas obtidas pelo controle neste experimento foi de 2,22 mudas por pedicelo não contaminado. Número este que fica bem abaixo do obtido no experimento inicial de radiosensitividade, que foi de 7,52 mudas, por pedicelo não contaminado. Este resultado pode ser explicado, em parte, pelas dificuldades de se trabalhar com uma grande quantidade de materiais num curto período de tempo.

O tratamento de 8 Gy de raios gama também apresentou situação semelhante com a produção de apenas 1,21 mudas obtidas por pedicelo, em comparação com a produção de 4,97 mudas por pedicelo, no experimento de radiosensitividade.

Apesar da redução no número médio de mudas produzidas, observou-se que esta redução foi proporcional para o tratamento irradiado e para o controle. Se compararmos a média do número de mudas obtidas no tratamento (1,21 mudas por pedicelo), em relação a média de mudas produzidas no controle (2,22 mudas por pedicelo), observamos que houve uma redução aproximada de 45 %, semelhante a obtida no experimento de radiosensitividade.

O esperado portanto é que independente da capacidade de regeneração do explante ou do meio utilizado, a

dose de 8 Gy de raios gama tenha a capacidade de reduzir em torno 45 %, o número médio de mudas regeneradas "in vitro" de plantas da variedade 'Repin rosa', obtidas através do cultivo de pedicelos florais.

Tabela 12. Regeneração "in vitro", de plantas da variedade 'Repin rosa', obtidas através irradiação de pedicelos florais, com 8 Gy de raios gama. Avaliação efetuada 30 dias após a inoculação, médias de 4 repetições.

Tratamento	Número de mudas por pedicelo			
	Não contaminado		Regenerado	Inoculado
	obs.	%(1)		
Controle	2,22	100	4,52	1,80
8 Gy	1,21	54,5	3,30	0,94

(1) Porcentagem em relação ao controle não irradiado, considerado como 100 %.

Foram avaliadas no campo, 690 plantas obtidas através da técnica de obtenção de gemas adventícias, originadas de pedicelos irradiados, além de 105 plantas do controle.

Na Tabela 13 estão apresentados os dados do número e frequência de mutantes observados nas 795 plantas avaliadas. O tratamento 8 Gy de raios gama apresentou uma frequência de 6,52 %, de mutantes de cor e 0,14 % de mutantes de forma, no total de plantas avaliadas. Portanto, a porcentagem de mutantes de cor

ficou em torno de 97,7 % do total de mutantes observados. Resultado semelhante ao obtido no experimento de irradiação "in vivo" em que se obteve um total de 97,0 % de mutantes de cor.

BROERTJES (1966) trabalhando com a variedade 'Bravo', obteve frequências de 5,1 a 60 % de mutação de cor de inflorescência, usando a técnica de obtenção de gemas adventícias irradiadas a partir de pedicelo floral, com diversas doses de raios X.

DE JONG & CUSTERS (1986), obtiveram frequências de mutação de cor bem menores, entre 0 e 2,5 % de mutantes, trabalhando com dose de 8 Gy de raios X na variedade 'Spider branco' que pela cor inicial, possui uma maior dificuldade de produzir mutantes de cor.

As plantas do controle neste experimento não apresentaram mutantes para o caráter coloração de inflorescência. Pode-se então afirmar que, a passagem das mudas pelo processo de regeneração "in vitro" não causou variação somaclonal, para este caráter em questão.

Com relação a outros caracteres seria necessário fazer um estudo mais aprofundado, pois não se pode garantir que não houve a modificação das outras características agrônomicas. Para se ter certeza é necessário a execução de ensaios de produtividade e estabilidade, para se comparar o desempenho destas plantas que passaram pela fase "in vitro" com plantas da variedade original.

A frequência de mutação do experimento "in vitro", em torno de 6,67 %, foi um pouco maior que a frequência de

mutação obtida no experimento "in vivo" (5,98 %). Entretanto o espectro de mutação foi muito maior no experimento "in vivo", com a obtenção de 11 variações de cor de flor culminando com a obtenção de duas variedades comerciais.

A Tabela 14 apresenta o espectro de mutações de cor e a frequência de aparecimento dos mutantes. O mutante de cor bronze foi o que apareceu com maior frequência, em torno de 64,4 % do total, resultado semelhante ao obtido na indução de mutações "in vivo". Partindo-se de uma variedade rosa e supondo a ocorrência da mutação na camada LI da planta, o mutante de cor bronze é o mais fácil de ser obtido, segundo STEWART & DERMEN (1970).

O mutante de cor rosa escuro somente apareceu nas repetições de número 2 e 3, enquanto o mutante de cor rosa claro, somente na repetição número 2.

O fato de ter sido necessário subdividir os pedicelos em grupo de 200, serviu também para reafirmar que em trabalhos com indução de mutação, sempre deve-se recomendar o uso de grandes populações. No presente experimento, o uso de 800 pedicelos iniciais possibilitou a seleção de 46 mutantes, com 4 tipos de cor e 1 com folha variegada. Se apenas 200 pedicelos fossem utilizados, da repetição número 2 por exemplo, apenas 14 mutantes de cor seriam obtidos. E sempre preferível um número maior de mutantes, da mesma cor por exemplo, para se avaliar pois pode-se escolher o melhor dentre eles, supondo-se que tenham origens geneticamente diferentes.

Todas as plantas obtidas incluindo o mutante variegado possuíam coloração de flor única, podendo ser consideradas então como mutantes periclinais ou sólidos. O mutante de folha variegada apresentou-se com a inflorescência de cor rosa, semelhante a variedade original mas, no entanto, não pôde ser chamado de mutante periclinal ou sólido. Este resultado comprova relatos anteriores que afirmam que a indução de mutações "in vitro" em gemas adventícias de crisântemo, obtidas a partir de pedicelo floral, produzem somente mutantes sólidos.

Uma dificuldade adicional foi a uniformização do florescimento das plantas obtidas pelo método "in vitro". O que se recomenda para um trabalho posterior, é que se faça uma poda no meristema apical de todas as plantas obtidas "in vitro", após o plantio no campo ou então que se use estas plantas como matrizes, retirando-se destas, mudas para serem avaliadas. Estes procedimentos possibilitarão a uniformização do lote, com relação ao desenvolvimento e a data de florescimento.

A avaliação dos métodos "in vivo" e "in vitro", utilizados neste trabalho, nos dá a idéia de que ambos podem ser usados com sucesso, desde que se estabeleça antes o objetivo a ser alcançado e os meios disponíveis.

O método "in vitro" leva vantagem no que diz respeito ao tempo de conclusão do experimento. O tempo de duração deste experimento da irradiação até a seleção dos mutantes no florescimento foi de aproximadamente 200 dias, enquanto no método "in vivo" utilizado, com o avanço até a geração recomendada que é a M1V4, levou-se em torno de 280 dias.

No entanto, alterações que diminuiriam o tempo de conclusão da pesquisa podem ser introduzidas, por exemplo: a diminuição do período de crescimento vegetativo, a que as plantas são submetidas na estufa (pela manipulação do fotoperíodo do dia); o uso de variantes do método "in vivo", com o avanço de um menor número de gerações mas com o aproveitamento de todas os ramos desenvolvidos a partir das gemas axilares. Outra variante seria o uso do método "in vivo", sem a técnica de podas repetidas, neste caso a planta irradiada seria conduzida intacta até a época da seleção, no florescimento.

As outras vantagens do método "in vitro" estão relacionadas a questão da menor utilização de um espaço físico no campo e a uma menor quantidade de tratos culturais, isto porque as plantas ficam um menor tempo no campo.

As desvantagens do método "in vitro", são referentes ao custo do projeto que são bem mais elevados que o do método "in vivo". Neste trabalho, através do método "in vitro" obteve-se um menor espectro de mutações de cor. Uma outra possível desvantagem e citada na literatura, mas que não ocorreu neste trabalho, está relacionado a dificuldade de cultivo "in vitro" de algumas variedades.

Tabela 13. Número e frequência de mutantes em plantas da variedade 'Repin rosa', provenientes da regeneração "in vitro" de pedicelos irradiados, com 8 Gy de raios gama. Avaliação efetuada no florescimento.

Tratamento	Plantas avaliadas	Mutantes observados				Total mutantes	
		cor	%	Forma	%	Número	%
Controle	105	0	0	0	0	0	0
8 Gy	690	45	6,52	1*	0,14	46	6,67

* Planta com folha variegada

Tabela 14. Espectro de mutação e frequência de mutantes na coloração das plantas da variedade 'Repin rosa', provenientes da regeneração "in vitro" de pedicelos irradiados, com 8 Gy de raios gama. Avaliação efetuada no florescimento.

Repetição	Plantas avaliadas	<u>Tipos de colorações e frequências</u>			
		Bronze	Champanhe	Rosa escuro	Rosa claro
1	232	5	3	-	-
2	196	6	2	2	4
3	122	8	2	2	-
4	140	10	1	-	-
Total	690 (1)	29 (64,4)	8 (17,7)	4 (8,8)	4 (8,8)

(1) Porcentagem de mutantes em relação ao total de mutantes avaliados

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições em que foi realizado este trabalho, permitem obter as seguintes conclusões:

a) O parâmetro, altura de planta de M1V1 aos 30 dias de plantio, após a irradiação de plantas com doses que variaram de 0 a 32,5 Gy de raios gama, representa melhor a sensibilidade ao mutagênico. O parâmetro, porcentagem de sobrevivência, não apresenta respostas claras quando avaliado aos 30 dias e para a faixa de doses utilizadas, devendo ser utilizado somente em avaliações mais tardias, no florescimento ou em experimentos com doses mais fortes.

b) A variedade 'Repin rosa' mostra-se mais sensível ao mutagênico usado do que a variedade 'Tinsel branco'. A dose escolhida para este programa de indução de mutações "in vivo", dentro dos objetivos estabelecidos e baseando-se na redução da altura de plantas de M1V1, é de 22,5 Gy de raios gama para a variedade 'Tinsel' e 20 Gy para a variedade 'Repin'.

c) A variedade 'Tinsel' apresenta uma baixa frequência de produção de mutantes, em torno de 0,58 %, e um baixo espectro de mutações de cor, todos sem valor comercial.

d) Na variedade 'Repin', a frequência de mutantes obtida pelo método "in vivo" e "in vitro", situa-se em torno de 6 %, bem maior que na variedade 'Tinsel', devido ao tipo de

coloração. Conclui-se então que é muito importante o tipo de coloração do material inicial, em trabalhos com indução de mutações em crisântemo.

e) Há uma ocorrência preferencial de mutação de cor em relação a mutação de forma de inflorescência, nas duas variedades.

f) O mutante produzido em maior quantidade nos métodos "in vivo" e "in vitro" para a variedade 'Repin' foi o de cor bronze.

g) O método de podas repetidas da planta mutada, tem a capacidade de ampliar o setor mutado somente até a geração M1V4, depois há uma estabilização, não se necessitando portanto, avançar mais.

h) Dentre muitos, selecionou-se apenas 3 mutantes de cor da variedade 'Repin', com possível valor comercial. Após o teste de estabilidade e produtividade, somente dois mutantes foram aprovados, os de cor rosa escuro e branco que já estão sendo comercializados com o nome de 'Ingrid' e 'Cristiane', respectivamente.

i) Não é possível determinar se há uma modificação na frequência de aparecimento de mutantes em relação ao avanço das gerações, pelo método de podas repetidas.

j) O melhor meio utilizado para a regeneração de plantas, através de gemas adventícias, originadas de pedicelos é o meio MS modificado, acrescido de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de IAA.

k) Há uma redução no número de pedicelos que regeneram mudas e também uma redução no número de mudas produzidas por cada pedicelo, em função do aumento da dose de mutagênico.

l) A dose escolhida para o experimento "in vitro" foi de 8 Gy de raios gama, dose que causa aproximadamente 50 % de redução no número de mudas obtidas sob o número de pedicelos não contaminados.

m) O método de indução de mutações "in vitro", usando pedicelos como explante, a excessão de um mutante de folha variegada, só produziu mutantes sólidos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AHLOOWALIA, B.S. In-vitro radiation induced mutants in *Chrysanthemum*. *Mutation Breed. Newsletter*, 39: 6, Jan. 1992.
- BALKEMA, G.H. Diplontic drift in chimeric plants. *Radiation Botany*, London, 12(1): 51-55, Feb. 1972.
- BOWEN, H.J.M.; CAWSE P.A.; DICK, M.J. The induction of sports in *Chrysanthemums* by gamma radiation. *Radiation Botany*, London, 1: 297-303, 1962.
- BOWEN, H.J.M. Mutations in horticultural *Chrysanthemums*. *Radiation Botany*, London, 5 (Suppl.): 695-700, 1965.
- BROERTJES, C. Mutation breeding of *Chrysanthemum*. *Euphytica*, Wageningen, 15(2): 156-162, May. 1966.
- BROERTJES, C. Mutation breeding of *Streptocarpus*. *Euphytica*, Wageningen, 18(3): 333-339, Dec. 1969.
- BROERTJES, C. Mutation breeding of *Achimenes*. *Euphytica*, Wageningen, 21(1): 48-63, Feb. 1972.

- BROERTJES, C. The significance of in vitro adventitious bud techniques for mutation breeding of vegetatively propagated crops. In: IAEA, ed. **Induced Mutations in Vegetatively Propagated Plants II**. Vienna, 1982. p.01-10.
- BROERTJES, C. & KEEN, A. Adventitious shoots: Do they develop from one cell ?. **Euphytica**, Wageningen, 29(1): 73-87, Feb. 1980.
- BROERTJES, C. & VAN HARTEN, A. **Application of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops**. Amsterdam, Elsevier Sci., 1978. 296p.
- BROERTJES, C. & VAN HARTEN, A. **Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops**. Amsterdam, Elsevier Sci., 1988. 345p.
- BROERTJES, C.; HACCIUS, B.; WEIDLICH, S. Adventitious bud formation on isolated leaves and its significance for mutation breeding. **Euphytica**, Wageningen, 17(3): 321-344, Dec. 1968.
- BROERTJES, C.; ROEST, S.; BOKELMANN, G.S. Mutation breeding of *Chrysanthemum morifolium* Ram. using in vivo and in vitro adventitious bud techniques. **Euphytica**, Wageningen, 25(1): 11-19, Feb. 1976.

- BROERTJES, C.; KOENE, P.; VAN VEEN, J.W.H. A mutant of a mutant of a mutant of a ...: Irradiation of progressive radiation-induced mutants in a mutation breeding programme with *Chrysanthemum morifolium* Ram. **Euphytica**, Wageningen, 29(3): 525-530, Nov. 1980.
- BROERTJES, C.; KOENE, P.; PRONK, T. Radiation-induced low-temperature tolerant cultivars of *Chrysanthemum morifolium* Ram. **Euphytica**, Wageningen, 32(1): 97-101, Mar. 1983.
- CACEX. Mercado das flores. **Informativo Semanal da Cacex/Banco do Brasil**, Rio de Janeiro, 22(1057): 4-13, 1987.
- DATTA, S.K. 'Man Bhawan' New *Chrysanthemum* cultivar induced by gamma irradiation. **J. Nuclear Agric. Biol.**, New Delhi, 16(4): 217-218, Dec. 1987.
- DE JONG, J. & CUSTERS, J.B.M. Induced changes in growth and flowering of *Chrysanthemum* after irradiation and in vitro culture of pedicels and petals epiderms. **Euphytica**, Wageningen, 35(1): 137-148, Mar. 1986.
- DOORENBOS, J. & KARPER, J.J. X-ray induced mutations in *Begonia X Hiemalis*. **Euphytica**, Wageningen, 24(1): 13-19, Feb. 1975.
- DOWRICK, G.J. The cromossomes of *Chrysanthemum* II. Garden varieties. **Heredity**, London, 7: 59-72, 1953.

- DOWRICK, G.J. & EL-BAYOUMI, A. The origin of new forms of the garden *Chrysanthemum*. *Euphytica*, Wageningen, 15(1): 32-38, Feb. 1966a.
- DOWRICK, G.J. & EL-BAYOUMI, A. The induction of mutations in *Chrysanthemum* using X and gamma radiation. *Euphytica*, Wageningen, 15(2): 204-210, May. 1966b.
- FIDES. *Fides mum manual for all year round Chrysantemuns*. Fides BV ed., De Lier, 1990. 102p.
- GAUL, H. Mutagen effects in the first generation after seed treatment: Plant injury and lethality. *Manual on Mutation Breeding*. IAEA, Vienna, 119: 87-91, 1977.
- GUPTA, M.N. & JUGRAN, H.M. Mutation breeding of *Chrysanthemum* II. Detection of gamma ray induced somatic mutations in vM2. *J. Nuclear Agric. Biol.*, New Delhi, 7: 50-54, jun. 1978.
- HATTORY, K. Inheritance of carotenoid pigmentation in flower color of *Chrysanthemum*. *Japanese Journal of Breeding*, 41(1): 01-09, 1991.
- HATTORY, K. Inheritance of anthocyanin in flower color of *Chrysanthemum*. *Japanese Journal Genet.*, 67: 259-264, 1992.

- HILL, G.P. Shoot formation in tissue cultures of *Chrysanthemum* 'Bronze Pride'. *Physiol. Plant.*, Kobenhavn, 21: 386-389, 1968.
- ICHIKAWA, S.; YAMAKAWA, K.; SEKIGUCHI, F.; TATSUNO, T. Variation in somatic chromosome number found in radiation-induced mutants in *Chrysanthemum morifolium* cv. Yellow Delaware and Delaware. *Radiation Botany*, London, 10(6): 557-562, Nov. 1970.
- KAMPF, E.; BAJAK, E.; JANK, M.S. O Brasil no mercado internacional de flores e plantas ornamentais. *Informe GEP/DESR*, Piracicaba, 3(4): 03-11, abr. 1990.
- LANGTON, F.A. Chimerical structure and carotenoid inheritance in *Chrysanthemum morifolium* (Ram.). *Euphytica*, Wageningen, 29(3): 807-812, Nov. 1980.
- LATA, P. Effect of ionizing radiation on roses: induction of somatic mutations. *Environmental and Experimental Botany*, London, 20: 325-333. 1980.
- MICKE, A.; DONINI, B.; MALUSZYNSKI, M. Induced mutations for crop improvement. *Mutation Breed. Review*, Vienna, 7: 1-41, jun. 1990.

- MINAMI, K. & CASTRO, C.E.F. Floricultura no Brasil: Situação atual e perspectivas. *Revista da Assoc. dos Ex-alunos da Esalq (Adesalq)*, Piracicaba, 9: 30-33, 1988.
- MURASHIGUE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-479, 1962.
- ROEST, S. & BOKELMANN, G.S. Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. in vitro. *Sci. Hortic.*, Amsterdam, 3: 317-330, 1975.
- STEWART, R.N. & DERMEN, H. Somatic genetic analysis of the apical layers of chimeral sports in *Chrysanthemum* by experimental production of adventitious shoots. *Amer. J. Bot.*, New York, 57(9): 1061-1071, 1970.
- WEAVER, G.M. The effect of Cesium 137 gamma radiation on plant growth and flower color of greenhouse *Chrysanthemum* cultivars. *Can. J. Genet. Cytol.*, Ottawa, 5(1): 73-82, Mar. 1963.
- YAMAGUCHI, T. Mutation breeding of ornamental plants. *Bulletin of the Institute of Radiation Breeding*, 7: 49-67, 1987.