**METODOLOGIA *IN VIVO* E *IN VITRO* NA MUTAGÊNESE DE
CRISÂNTEMO (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) COM O USO
DE RAIOS-GAMA E METANOSSULFONATO DE ETILA (EMS)
VISANDO O MELHORAMENTO**

ALVIS HERNÁN ADAMES

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **AUGUSTO TULMANN NETO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Agosto - 1998

ADAMES, Alvis Hernán. Metodologia *in vivo* e *in vitro* na mutagênese de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzevelev) com o uso de raios-gama e matanossulfonato de etila (EMS) visando o melhoramento. Piracicaba, Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 1998.129p.

ERRATAS

p.	onde se lê	leia-se
xv	mutagenesi	mutagenesis
xv	The attainment of mutants for flower color in the mutant cv. 'Ingrid' with dark pink color, originally obtained from cv. 'Repin Rosa', was aimed.	It was aimed to obtain mutants for flower color in the mutant cv. 'Ingrid' with dark pink color, originally obtained from cv. 'Repin Rosa'.
xvi	tea-rose e wine	tea-pink e burgundy
2	comercio	comércio
4	...concentra mais do 70 %...	...concentra mais de 70 %...
5	...flor de corte e comercializada...	... flor de corte comercializada...
5	US\$ 4.00 e US\$ 25.00	US\$ 4,00 e US\$ 25,00
7	...a região mediterrânea (Algeria...)	...a região mediterrânea (Argélia)
9	- grupo de anêmonas...	- anêmonas...
10	...em função do comprimento do haste...	...em função do comprimento da haste...
10	...manter um dia longo...	...manter em dia longo...
10	...longo continuo, dia longo por interrupção...	...longo contínuo, dia longo com interrupção...
10	...submetidas até 16 horas de...	...submetidas a até 16 horas de...
10	pratica	prática
12	...mutagênicos químicos iniciou-se desde 1940.	...mutagênicos químicos iniciou-se em 1940.
20, 42	epidermes	epiderme
22, 28	evidencias	evidências
26	...o ácido indol butírico (IAA)...	...o ácido indol acético (IAA)
27, 28, 29	por tanto	portanto
31	listas	listras
40	... em mudas de crisântemo, a resposta...	...em mudas de crisântemo, onde a resposta...
41	tem	têm
43	...pigmento amarelo foi o causa das mutações...	...pigmento amarelo foi a causa das mutações...
44	... eles sugerem que em toda as análises...	...eles sugerem que em todas as análises...
45	Tulmann & Latado (1997)	Tulmann Neto & Latado (1997)
45	...foram cortados e levados ao enraizamento.	...foram cortados e levados ao enraizamento, este consistindo no contato prévio das pontas basais dos ápices (parte cortada) com o produto comercial a base de ácido indol butírico veiculado em talco (0,1 %) , e logo colocados em estufas contendo casca de arroz queimado.
46	...constou de várias etapas, descritas...	...constou das etapas descritas...
46	...foram imersos por 30 segundos...	...imersos completamente por 30 segundos...

46	...EMS na solução: 0, 0,05 e 0,1 M.	...EMS na solução: 0, 0,05 e 0,1 M; a temperatura ambiente da água ($\pm 18^{\circ}\text{C}$) e sem solução tampão.
46, 47	auxílio	auxílio
47, 49, 51	phythagel	Phytagel
47	...mantidas, na sala de crescimento,...	...mantidas por 7 dias na sala de crescimento,...
49	desinfecção	desinfecção
49	...avaliação e retirada de mudas, foram observadas plantas menores que 0,4 cm... ...uma segunda avaliação com relação...	...avaliação, feita aos 30 dias, e retirada das mudas, foram observadas brotações menores que 0,4 cm... ...uma segunda avaliação, feita aos 40 dias, com relação...
50	...considerando como adequada para a...	...considerando-as como adequadas para a...
50	...com o uso do umificador...	...com o uso de umidificador...
51, 52, 53, 54	internódio	segmento caulinar contendo um nó
51, 56, 57	ápices meristemáticos	por estacas apicais
51	...por aproximadamente um mês. Este período é suficiente...	...por aproximadamente 30 dias. Este período foi suficiente...
52	... <i>in vitro</i> apresentem um bom crescimento vegetativo e possam ser utilizadas...	... <i>in vitro</i> apresentassem um bom crescimento vegetativo e pudessem ser utilizadas...
52	...ápices meristemáticos de plantas...	...ápices meristemáticos de aproximadamente 1 cm de plantas...
52	140	133
54, 64	início	início
55 (fig. 2)	na segunda poda das plantas <i>in vitro</i> o enraizamento e desenvolvimento dos ápices inoculados constituiu a população de plantas M ₁ V ₁ -gema axilar, o esquema deveu mostrar a sua avaliação no campo	
56	...e induzidos ao enraizamento na empresa...	...e induzidos ao enraizamento, nas condições antes mencionadas, na empresa...
56, 60	...a base das mudas foram protegidas...	...a base das mudas foi protegida...
56	...enraizamento dos ápices foi utilizado um tipo de auxina veiculado em talco...	...enraizamento das estacas apicais foi utilizado o produto a base de ácido indol butírico, auxina veiculado em talco (0,1 %)...
59	...procedimentos do cultivo comercial.	... procedimentos do cultivo comercial, isto é, densidade de plantio de 80 mudas/m linear de canteiro, iluminação com lâmpadas de 100 w instaladas a cada 10 m ² , adubação orgânica (1 t/estufa), irrigação diária com duração de 5 minutos na primeira semana e em dias alternados nas seguintes semanas, etc...
61	subsequentes	subseqüentes
61	...foram plantadas à parte...	...foram plantados à parte...

63	...gemas axilares de modo de ser possível a obtenção...	... gemas axilares visando a obtenção...
63	...irrigação, adubação e manejo fitossanitário.	...irrigação, adubação e manejo fitossanitário, antes mencionado.
66	...testadas de EMS redução...	...testadas de EMS na redução...
66	...observa-se que houve diferenças...	... observa-se que houveram diferenças...
70	Eles verificaram observações semelhantes...	Eles observaram semelhança...
70	...os resultados obtidos com com plantas...	...os resultados obtidos com plantas...
71	...o número de pedicelos avaliados.	...o número de pedicelos avaliados; isto devido ao um maior tempo empregado entre as lavagens e a inoculação dos pedicelos nas primeiras etapas.
72	...lavagem em água, 4 nas diferentes...	...lavagem em água, nas diferentes...
73	mostra	mostram
73	valida	válida
79	...se este for a hipótese correta...	...se esta for a hipótese correta...
85	...frequência de mutantes e frequência de mutação, são mostrados...	...e frequência de mutantes, são mostrados...
em todo o texto, os termos "mutantes com duas ou mais cores", "mutantes com duas ou mais de uma cor", substituem-se por mutantes de mais de uma cor		
90, 97	excepção	exceção
91	...22,5 Gy da raios-gama...	...22,5 Gy de raios-gama...
93	...com variados tamanho de setores...	...com variados tamanhos de setores...
95	continua	contínua
96	O mutante bronze, variegado,...	Os mutantes bronze, variegado...
96	... <i>in vitro</i> , a indução... ...são imediatamente plantadas no campo...	... <i>in vitro</i> , da indução... ...são imediatamente plantadas no campo...
96	...foi um empregado...	...foi empregado...
101	...foi maior <i>in vitro</i> do que <i>in vivo</i> .	... foi maior <i>in vitro</i> do que <i>in vivo</i> , com exceção da geração M ₁ V ₁ -maristema apical.
103	...caule principal, foram conduzidas...	...caule principal, conforme descrito em 3.4, foram conduzidas...
106	...parte delas apresentavam as flores...	...parte delas apresentava as flores...
111	caráteres	caracteres
112	Todos os mutante...	Todos os mutantes...
114	...por pedicelo cultivados...	...por pedicelo cultivado...
114	...cinco minutos horas, associado...	...cinco minutos, associado...

SIMBOLOS e ABREVIATÖES

EMS - metanossulfonato de etila (mutagênico químico)

Gy - gray, unidade de dose de radiação absorvida

Fonte ⁶⁰Co do CENA - fonte de irradiação que utiliza o radioisótopo Cobalto 60 do Centro de Energia Nuclear na Agricultura

M₁V₁ - crescimento vegetativo após o evento mutagênico em plantas de propagação vegetativa

M₁V₁-meristema apical - geração de plantas obtidas pela propagação vegetativa (poda) do ápice caulinar de plantas irradiadas

M₁V₁-gema axilar - geração de plantas obtidas pela propagação vegetativa do ápice das gemas axilares desenvolvidas após a poda do ápice caulinar de plantas irradiadas

M₁V₂ - segunda geração após irradiação de plantas de propagação vegetativa, obtida do desenvolvimento de partes vegetativas de plantas ou ramificações M₁V₁

M₁V₃ - terceira geração após irradiação de plantas de propagação vegetativa, obtida do desenvolvimento de partes vegetativas de plantas ou ramificações M₁V₂

DNA - ácido desoxirribonucleico

nm - medida de longitude equivalente a 1x10⁻⁹ m

LD₅₀ - dose capaz de reduzir em 50% o número de indivíduos tratados

L-I, L-II, L-III - camada histogênica superior, média e inferior que forma o meristema apical

NAA - ácido naftaleno acético

IAA - ácido indol acético

BAP - benzil aminopurina

OH - material controle sem imersão em água

2H - material controle imerso em água por duas horas

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Hernán Adames, Alvis

Metodologia *in vivo* e *in vitro* na mutagênese de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) com o uso de raios-gama e metanossulfonato de etila (EMS) visando o melhoramento / Alvis Hernán Adames. - - Piracicaba, 1998.

129 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Crisântemo 2. Melhoramento genético vegetal 3. Mutação induzida 4. Planta ornamental 5. Raio gama 6. Regeneração "in vitro" 7. Seleção genética vegetal I.
Título

CDD 635.93355

**METODOLOGIA *IN VIVO* E *IN VITRO* NA MUTAGÊNESE DE CRISÂNTEMO
(*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) COM O USO DE RAIOS-GAMA E
METANOSSULFONATO DE ETILA (EMS) VISANDO O MELHORAMENTO**

ALVIS HERNÁN ADAMES

Aprovada em: 8 / 9 / 1998

Comissão julgadora:

Prof. AUGUSTO TULMANN NETO
Orientador

A Omayra,

ofereço,

aos meus pais Dora Lesvia, Eustorgio, a meus

irmãos e a toda a minha família, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Professor Dr. Augusto Tulmann Neto, pela sua orientação, pelo seu constante positivismo e por sua contribuição na minha formação científica.

Ao Professor Dr. Akihiko Ando, pela sua amizade, espontaneidade e sua constante preocupação na organização e trabalho em equipe.

Aos professores e ao Departamento da Genética pelos conhecimentos transmitidos para minha formação na pesquisa genética agrícola.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" pela permissão ser parte desta prestigiosa instituição.

Ao Laboratório de Radiogenética do CENA por ter me aberto as portas, me permitindo o desenvolvimento deste trabalho, especialmente aos funcionários Benedita Inés F. P. Rodrigues e Wlamir de Aguiar Godoy pela ajuda, amizade e constante estímulo ao trabalho.

Ao Dr. Rodrigo Rocha Latado, pelo companheirismo, pela incansável e espontânea vocação de trabalho em equipe.

Aos funcionários Paulo Casieiri e José Benedito Alves, pela amizade e a colaboração na realização e seguimento dos experimentos.

Aos colegas de estudo Alejandro Chaparro, Leonardo Rosse, Cláudio Tsutsumi, Gilberto Yokomizo, Raulindo Gardingo pela amizade, apoio e companheirismo durante todo o nosso estudo.

Aos amigos Cristian, Nalza e Allison que direta e indiretamente ajudaram na elaboração deste trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro, sem o qual seria impossível atingir este objetivo.

A meu país, Panamá, por incentivar a pesquisa genética agrícola.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Importância econômica.....	4
2.2 Aspectos genéticos.....	6
2.3 Aspectos botânicos.....	8
2.3.1 Fotoperíodo.....	9
2.4 Aspectos no uso dos mutagênicos.....	11
2.4.1 Radiossensitividade.....	15
2.4.1.1 Dose de irradiação.....	17
2.4.1.2 Determinação da dose de irradiação.....	17
2.5 Estrutura e funcionamento do meristema apical.....	19
2.5.1 Comportamento das gemas axilares.....	23
2.5.2 Gemas adventícias.....	24
2.6 Quimerismo.....	27
2.7 Seleção diplôntica.....	30
2.8 Rearranjamento de camadas.....	31
2.9 Isolamento de mutações somáticas.....	33
2.10 Técnica de cultura de tecidos e mutagênese.....	37
2.11 Melhoramento convencional.....	40
2.12 Indução de mutações.....	41
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1 Desenvolvimento e uso de metodologia para tratamento <i>in vitro</i> de pedicelos com EMS.....	46
3.1.1 Determinação da sensibilidade de pedicelos florais jovens de crisântemo ao mutagênico químico EMS.....	46

3.1.2 Tratamento de pedicelos florais jovens de crisântemo com concentração previamente selecionada de EMS, seguido de obtenção de gemas adventícias <i>in vitro</i>	48
3.2 Uso de podas repetidas em ápices meristemáticos e internódios após a irradiação de plantas <i>in vitro</i> com raios-gama, visando-se indução de mutação.....	51
3.2.1 Determinação da sensibilidade de plantas a raios-gama <i>in vitro</i>	52
3.2.2 Irradiação de plantas com a dose de raios-gama escolhida, avanço de gerações <i>in vitro</i> com o método das podas repetidas e seleção de mutantes no florescimento.....	53
3.3 Determinação da frequência de mutantes e tamanho do setor mutado <i>in vivo</i> em mudas enraizadas irradiadas.....	56
3.4 Determinação da frequência de mutantes em plantas da geração M ₁ V ₂ obtidas de gemas axilares de distintas posições ao longo de plantas da geração M ₁ V ₁ originadas da irradiação de plantas <i>in vivo</i>	59
3.5 Ensaio de produção e estabilidade da cor dos mutantes selecionados.....	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.1 Desenvolvimento e uso de metodologia para tratamento <i>in vitro</i> de pedicelos com EMS.....	65
4.1.1 Determinação da sensibilidade de pedicelos florais jovens de crisântemo ao mutagênico químico EMS.....	65
4.1.2 Tratamento de pedicelos florais jovens de crisântemo com concentração previamente selecionada de EMS, seguido de obtenção de gemas adventícias <i>in vitro</i>	70
4.2 Uso de podas repetidas em ápices meristemáticos e internódios após a irradiação de plantas <i>in vitro</i> com raios-gama, visando-se indução de mutação.....	82
4.2.1 Determinação da sensibilidade de plantas <i>in vitro</i> a raios-gama.....	82
4.2.2 Irradiação de plantas com a dose de raios-gama escolhida, avanço de gerações <i>in vitro</i> com o método das podas repetidas e seleção de mutantes no florescimento.....	85
4.3 Determinação da frequência de mutantes e tamanho do setor mutado <i>in vivo</i>	

vivo em mudas enraizadas irradiadas.....	92
4.4 Comparações das metodologias de indução de mutação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	97
4.5 Determinação da frequência de mutantes em plantas da geração M_1V_2 obtidas de gemas axilares de distintas posições ao longo de plantas da geração M_1V_1 originadas da irradiação de plantas <i>in vivo</i>	103
4.6 Ensaio de produção e estabilidade da cor dos mutantes selecionados.....	110
5 CONCLUSÕES.....	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Tamanho do setor mutado e número de células mutadas em primórdios de gemas axilares após irradiação (adaptado de Micke & Donini, 1984).....	35
2 Procedimento seguido para a realização das podas repetidas e o avanço das gerações <i>in vitro</i>	55
3 Procedimento seguido para a realização das podas repetidas e o avanço das gerações <i>in vivo</i>	58
4 Procedimento seguido para a realização das podas em distintas posições do caule M ₁ V ₁ , obtido após irradiação de plantas com raios-gama.....	62
5 Valores médios do número de plantas regeneradas por pedicelo após o tratamento com EMS por uma hora e quarenta e cinco minutos e 15 minutos de lavagem em água.....	68
6 Foto ilustrativa da regeneração de plantas <i>in vitro</i> a partir de pedicelos florais imaturos sem tratamento com água, em duas horas com água, tratados com 0,05 M de EMS e tratados com 0,1 M de EMS.....	69
7 Número de plantas regeneradas por pedicelo tratado <i>in vitro</i> com EMS, avaliado 30 dias após a inoculação nas 4 diferentes etapas (intervalo de 15 dias entre cada inoculação).....	74
8 Número de plantas regeneradas por pedicelo correspondente à testemunha com duas horas em água (2H) e ao tratamento com 0,075 M de EMS por uma hora e quarenta e cinco minutos e 15 minutos de lavagem em água avaliadas 40 dias após a inoculação nas 4 diferentes etapas.....	76

9 Mutantes sólidos obtidos por meio do tratamento <i>in vitro</i> de pedicelos com 0,075 M de EMS por uma hora e quarenta e cinco minutos e 15 minutos de lavagem em água.....	81
10 Média da altura de plantas obtidas por meio de diferentes doses de radiação em plantas cultivadas <i>in vitro</i> , avaliadas aos 30 dias.....	83
11 Frequência de mutantes de uma e mais de uma coloração em relação ao total de plantas avaliadas obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com 22,5 Gy de raios-gama <i>in vitro</i>	91
12 Frequência de mutantes de uma e mais de uma coloração em relação ao total de plantas avaliadas obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com 20 Gy de raios-gama <i>in vivo</i>	97
13 Frequência de mutantes em relação ao total de plantas avaliadas obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	99
14 Frequência de mutantes de uma única cor em relação ao total de plantas avaliadas obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	101
15 Frequência de mutantes de uma e mais de uma coloração em relação ao total de plantas avaliadas obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	102
16 Frequência de mutantes de uma e mais de uma coloração em ramos M_1V_2 originados de distintas posições da gema axilar ao longo de plantas da geração M_1V_1	110
17 Mutantes de cor vinho, variegado, chá-rosa e bronze, obtidos por indução de mutação com raios-gama.....	113

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Avaliação das plantas regeneradas após o tratamento de pedicelos <i>in vitro</i> com EMS.....	66
2 Valores médios do número de plantas transferíveis por pedicelo tratado <i>in vitro</i> com EMS por uma hora e quarenta e cinco minutos e 15 minutos de lavagem em água nas 4 diferentes etapas do experimento. Avaliação feita 30 dias após inoculação.....	72
3 Número de pedicelos, número de plantas, valores médios e porcentagem correspondente à testemunha com duas horas em água (2H) e ao tratamento com 0,075 M de EMS por uma hora e quarenta e cinco minutos e 15 minutos de lavagem em água nas 4 diferentes etapas avaliados 40 dias após inoculação.....	75
4 Espectro de mutação observado em plantas obtidas por meio de pedicelos tratados <i>in vitro</i> com 0,075 M de EMS por uma hora e quarenta e cinco minutos e 15 minutos de lavagem em água.....	77
5 Avaliação no florescimento dos tipos de mutantes obtidos nas plantas provenientes de pedicelos tratados com 0,075 M de EMS por uma hora e quarenta e cinco minutos e 15 minutos de lavagem em água.....	78
6 Altura média das plantas <i>in vitro</i> do cultivar 'Ingrid' avaliada 30 dias após irradiação com diferentes doses de raios-gama.....	83
7 Frequência de mutantes nas distintas gerações obtidas por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas <i>in vitro</i> com 22,5 Gy de raios-gama.....	86
8 Espectro de mutação nas distintas gerações obtidas por meio do método	

das podas repetidas em plantas irradiadas com 22,5 GY de raios-gama <i>in vitro</i>	87
9 Frequência de mutantes de uma e mais de uma coloração em relação ao total de plantas mutantes obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com 22,5 Gy de raios-gama <i>in vitro</i>	88
10 Frequência de mutantes de uma e mais de uma coloração em relação ao total de plantas avaliadas obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com 22,5 Gy de raios-gama <i>in vitro</i>	89
11 Frequência de mutantes nas distintas gerações obtidas por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com dose de 20 Gy de raios-gama <i>in vivo</i>	92
12 Espectro de mutação nas distintas gerações obtidas por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com 20 GY de raios-gama <i>in vivo</i>	93
13 Frequência de mutantes de uma e mais de uma coloração em relação ao total de plantas mutantes obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com 20 Gy de raios-gama <i>in vivo</i>	94
14 Número e frequência de mutantes de uma e mais de uma coloração em relação ao total de plantas avaliadas obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com 22,5 Gy de raios-gama <i>in vivo</i>	95
15 Número e frequência de mutantes nas distintas gerações obtidas por	

**METODOLOGIA *IN VIVO* E *IN VITRO* NA MUTAGÊNESE DE
CRISÂNTEMO (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) COM O USO DE
RAIOS-GAMA E METANOSSULFONATO DE ETILA (EMS) VISANDO O
MELHORAMENTO**

Autor: ALVIS HERNÁN ADAMES

Orientador: Prof. Dr. AUGUSTO TULMANN NETO

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos principais: desenvolvimento e aplicação de metodologias *in vivo* e *in vitro* na indução de mutação em crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev), com o uso de raios-gama e o mutagênico químico metanossulfonato de etila (EMS); comparação das metodologias *in vitro* e *in vivo* quanto à frequência de mutantes e o tamanho do setor mutado. Visou-se a obtenção de mutantes para a coloração das flores no cultivar mutante 'Ingrid' de cor rosa escuro, obtido a partir do cultivar original 'Repin Rosa'.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Radiogenética do CENA em Piracicaba - SP e na empresa Van Shaik da Cooperativa Holambra em Holambra - SP. Para a irradiação de plantas utilizou-se a fonte de ^{60}Co do CENA.

EMS foi utilizado para o tratamento *in vitro* de pedicelos de botões florais imaturos visando-se a indução de gemas adventícias e a regeneração de plantas. Realizou-se um teste preliminar de sensibilidade, escolhendo-se a concentração em função da redução de 50% no número de plantas regeneradas por pedicelo. Após o tratamento com a concentração escolhida (0,075 M 1:45 horas) obteve-se uma frequência de 14% de mutantes sendo que destes houve uma ocorrência de uma alta frequência (11,8%) de mutantes sólidos para a cor da inflorescência.

Num experimento preliminar, determinou-se que a dose de 22,5 Gy de raios-gama reduzia cerca de 50% a altura das plantas da geração M_1V_1 obtida por meio de plantas crescidas *in vitro*. Plantas *in vitro* foram irradiadas com esta dose e o avanço de gerações foi realizado utilizando a técnica das podas repetidas, por meio do cultivo de internódios *in vitro*. Mudanças enraizadas foram irradiadas *in vivo* com 20 Gy de raios-gama, avançando-se *in vivo* as gerações também por meio das podas repetidas. A frequência de mutantes foi maior *in vitro* (13,8%) do que *in vivo* (7,1%) e em ambos os casos na geração M_1V_3 obteve-se a maior porcentagem de quimeras periclinais.

Avaliou-se a frequência e o tipo de quimeras em plantas da geração M_1V_2 proveniente de 6 gemas axilares obtidas ao longo de ramos M_1V_1 originados após a irradiação de plantas enraizadas *in vivo* com 20 Gy de raios-gama. O número de quimeras periclinais foi baixo (0,4%) e não foram observadas diferenças significativas no número e tipos de quimeras observadas nas plantas originadas das 6 diferentes posições.

Dentre os diferentes tipos de mutantes obtidos nos vários experimentos, foram selecionados os de cor chá-rosa, vinho, bronze e variegado que foram avaliados em ensaios de produção. O mutante variegado mostrou instabilidade para a coloração, os outros, com exceção do chá-rosa, mostraram potencial para liberação como novos cultivares, porque além do interesse pela nova coloração de pétalas, mantiveram em geral as boas características agronômicas e comerciais do cultivar original. Estes mutantes estão sendo multiplicados pelo produtor para verificação de sua aceitação pelos consumidores.

**IN VIVO AND IN VITRO METHODOLOGY FOR MUTAGENESIS OF
CHRYSANTHEMUM (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) WITH USE OF
GAMMA RAY AND ETHYL METHANESULFONATE (EMS) AIMING
GENETIC IMPROVEMENT**

Author: ALVIS HERNÁN ADAMES

Adviser: Prof. Dr. AUGUSTO TULMANN NETO

SUMMARY

The present work had as major objectives: the development and application of *in vitro* methodologies for mutation induction in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev), using gamma ray and the chemical mutagen ethyl methanesulfonate (EMS); the development and application of *in vivo* methodology for mutation induction using gamma ray; comparison of *in vitro* and *in vivo* methodologies for frequency of mutant induction and the size of mutated sector. The attainment of mutants for flower color in the mutant cv 'Ingrid' with dark pink color, originally obtained from cv 'Repin Rosa', was aimed.

The experiments were carried out at the Laboratory of Radiation Genetic of CENA in Piracicaba-SP and in the company Van Shaik of the Holambra Cooperative in Holambra-SP. A source of ^{60}Co at CENA was used to irradiate the plants.

EMS was used to mutate pedicels of immature floral buds *in vitro*, aiming to produce adventitious buds and plant regeneration. A preliminary test of sensitivity determined the concentration that reduced the number of plants regenerated from pedicel in 50%. The chosen concentration (0.075 M EMS for 1:45 hours) induced 14% of mutants, with a high frequency (11.8%) of solid mutants for flower color.

In a preliminary experiment, it was determined that a dose of 22.5 Gy of gamma ray reduced the height in about 50% of the M_1V_1 plants. *In vitro* plants were irradiated with this dose and generations were

advanced using cutting back technique by culturing stem segments. Rooted cuttings were irradiated *in vivo* with 20 Gy of gamma ray, advancing generations by cutting back. The frequency of mutants was larger *in vitro* (13.8%) than *in vivo* (7.1%), and in both the cases, the generation M_1V_3 got the largest percentage of periclinal chimeras.

The frequency and type of chimeras were evaluated in plants of generation M_1V_2 , proceeding from six axillary buds originated from branches of rooted plants *in vivo* M_1V_1 after irradiation with 20 Gy of gamma ray. The number of periclinal chimeras was low and no significant differences were observed in number and type of chimeras.

Among the different types of mutants obtained in the experiments, the "tea-rose", "wine", "bronze" and "variegated" were selected and evaluated in production trial. The variegated mutant showed instability for color. With the exception of tea-rose, all mutants had shown potential as new cultivars. The mutants have kept the good agronomic and commercial features besides their new colors. These mutants are being multiplied by the producer for market test with consumers.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil a floricultura movimenta, como um todo, cerca de US\$ 600 milhões por ano; as exportações não tem grande significado no comércio internacional e o consumo *per capita* é baixo. No Estado de São Paulo, onde concentra-se cerca do 70% da produção nacional de flores, o setor começa a se estruturar em moldes empresariais. Isto, junto a maiores investimentos em pesquisas parece ser o caminho para a maior exploração de grandes mercados consumidores, como Europa, Estados Unidos e o Japão. O potencial de crescimento do setor é elevado uma vez que o país pode complementar a oferta de flores de corte no inverno para os países de clima temperado (Matsunaga, 1995).

O crisântemo é uma das principais espécies cultivadas da floricultura nacional (Olivetti et al., 1994). É uma planta ornamental, alógama pertencente ao grupo de plantas que comumente são multiplicadas via propagação vegetativa. Espécies deste grupo são altamente heterozigotas, com freqüente autoincompatibilidade, algumas sendo poliplóides, triplóides e aneuplóides. Como consequência da alta heterozigosidade, autofecundações ou cruzamentos geram uma ampla variabilidade. Algumas outras espécies de propagação vegetativa apresentam um longo período vegetativo, portanto é requerido um maior espaço de tempo para o desenvolvimento de novas variedades por cruzamentos (Brock, 1977). A autoincompatibilidade no crisântemo somada à poliploidia e a alta heterozigosidade dificultam os cruzamentos, devido a isto, a contribuição do melhoramento por meio de métodos convencionais têm sido limitada.

As mutações constituem uma fonte primaria da variabilidade genética em todos os organismos vivos, podendo ocorrer de maneira espontânea durante a evolução e/ou podendo ser induzida por meio de agentes físicos ou químicos. Em essência, a variabilidade induzida não difere da variabilidade produzida naturalmente (Sigurbjörnsson, 1977; Parodi, 1984).

O melhoramento de plantas por meio das mutações induzidas faz uso das alterações genéticas ocorridas pela exposição de sementes e/ou outras partes vegetativas da planta à ação de mutagênicos físicos ou químicos. O crisântemo, portanto, pelas razões expostas anteriormente constitui uma espécie dentro de um grupo de plantas apropriadas para a sua aplicação, método que de fato tem contribuído grandemente na liberação de muitas variedades (Broertjes & Van Harten, 1988).

O uso de indução de mutações, entre outros objetivos, visa a alteração de uma ou poucas características de cultivares já estabelecidos, mas sem outras alterações em suas características desejáveis; em plantas ornamentais como o crisântemo, a detecção de tais mutações é facilitada devido a que geralmente procura-se alterar características como: cor, tamanho e forma da inflorescência.

Para o comercio tem sido observada a importância da produção de uma ampla gama, tanto de novas cores como de formas. A indução de mutações tem-se tornado uma importante ferramenta para agilizar o desenvolvimento de tais cultivares. As pesquisas demostram que o crisântemo, por esta técnica, é uma das espécies com maior número de cultivares liberadas (Micke et al., 1990).

A natureza quimérica de muitas plantas ornamentais como, rosas, begônias e crisântemos, assim como o tipo de reprodução, tem favorecido o surgimento de mutantes espontâneos (Wasscher, 1956), os quais tornaram-se novas variedades, constituindo um fator importante na modernização e industrialização da floricultura atual (Donini, 1982).

Os mutagênicos físicos (raios-gama, raios-X, neutrons) têm sido os mais usados, pois o uso de mutagênicos químicos, nestas espécies, é muito restrito devido à pouca penetrabilidade nas diversas partes *in vivo* normalmente utilizadas para o tratamento. Com o desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos, o uso de mutagênicos químicos tem aumentado dada a maior e melhor penetrabilidade nos diversos explantes utilizados na regeneração e multiplicação *in vitro* (Broertjes & Van Harten, 1988).

Trabalhos em crisântemo, utilizando técnicas de mutagênese induzida *in vivo* e *in vitro* com o uso de raios-gama, têm sido desenvolvidos no Laboratório de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, o que tem permitido a liberação de cultivares mutantes de interesse agrônômico (Latado et al., 1996; Tulmann Neto & Latado, 1997).

Existe a necessidade do estudo de certos aspectos metodológicos que permitiriam uma melhor utilização destas técnicas.

Neste trabalho objetivou-se o desenvolvimento e aplicação de metodologias na indução de mutações *in vivo* e *in vitro* em crisântemo. Para isto, foram realizados vários experimentos: a) desenvolvimento e uso de metodologia para tratamento *in vitro* de pedicelos com EMS. b) aplicação de podas repetidas *in vitro* por meio do cultivo de internódios visando-se indução de mutação com o uso de raios-gama. c) determinação da frequência de mutantes e tamanho do setor mutado *in vivo* em mudas enraizadas irradiadas. d) determinação da frequência de mutantes em plantas da geração M_1V_2 obtidas de gemas axilares de distintas posições ao longo de plantas da geração M_1V_1 originadas da irradiação de plantas *in vivo*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância econômica do crisântemo

Entre as plantas ornamentais e flores de corte cultivadas, o crisântemo ocupa um lugar de destaque, sendo uma das principais espécies produzidas e comercializadas no mundo.

O cenário da floricultura mundial é dominado por três grandes mercados: Europa, Estados Unidos e Japão. Nesses países, o cultivo é entendido como a indústria da floricultura dada a logística necessária à produção e distribuição (Matsunaga, 1995).

As exportações brasileiras não têm muita expressão no comércio internacional; em 1990 este setor participou apenas com 0,3% do comércio mundial. No entanto, observa-se na última década, um movimento ascendente nesse aspecto; em 1987, as exportações totalizaram US\$ 6,0 milhões; em 1990 chegaram a US\$ 9,2 milhões, um aumento de 122% com relação à cifra obtida em 1983. Em 1994 as cifras deveriam alcançar os US\$ 16,0 milhões (Gatti, 1991). Por outro lado, as estimativas indicam que o setor movimenta cerca de US\$ 600 milhões por ano no país como um todo (Matsunaga, 1995).

No Estado de São Paulo, que concentra mais do 70% da produção da floricultura nacional, o setor começa a se estruturar em moldes empresariais. A estrutura de comercialização representada pela Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo

(CEAGESP), Centrais de Abastecimento S/A de Campinas (CEASA), o leilão do *veiling* em Holambra, e o recente comércio por atacado da Associação Central de Produtores de Flores e Plantas Ornamentais, garante especialmente o suporte da distribuição por atacado das flores no Estado. Este setor congrega cerca de 2.500 produtores no Estado, abrangendo cerca de 10.000 hectares de produção de diferentes tipos de flores de corte (Matsunaga, 1995).

O crisântemo é a principal flor de corte e comercializada no Estado, participando com aproximadamente 75% do comércio de flores, sendo produzido em 131 municípios (Olivetti et al., 1994).

Apesar da estrutura de produção e de comercialização, o País tem um baixo consumo *per capita* (US\$ 4.00), enquanto em outros países vizinhos como a Argentina, o consumo chega aos US\$ 25.00 (Matsunaga, 1995).

Dados de 1991 indicam o crisântemo como o principal produto da floricultura do Estado de São Paulo com quase 12 milhões de maços, o que corresponde a quase 30 milhões de dúzias. Essa tendência vem-se mantendo crescente na última década (Olivetti et al., 1994).

A idéia que se tem dos produtos da floricultura e plantas ornamentais no Brasil é equivocada por se imaginar que planta ornamental é um produto supérfluo e restrito às camadas de alta renda. Este quadro é um reflexo das políticas econômicas adotadas no passado, onde a prioridade era a oferta de alimentos e o controle da inflação. Isto deixou de lado alternativas econômicas com potencial ainda não devidamente explorados na agricultura, como é o caso particular da floricultura. Nota-se que o setor nem sempre é tratado com a devida relevância quando se compara com outras culturas; as estatísticas são escassas, pouco detalhadas e o apoio institucional é quase inexistente (Gatti, 1991).

Uma característica marcante da atividade é de não demandar grandes áreas, mas paralelamente, existe a demanda de um contingente

expressivo de mão-de-obra, significando cerca de 20 empregos/ha de cultura (Olivetti et al., 1994).

O potencial de crescimento do setor no mercado interno é elevado. No nível internacional, o Brasil tem potencial para ampliar as exportações, uma vez que produz plantas típicas que apresentam apelo tropical. Por estar nos trópicos, o país pode completar a oferta de flores de corte no inverno para os países de clima frio como os Estados Unidos e os países europeus, e mesmo no Japão para alguns tipos de flores e plantas (Matsunaga, 1995).

2.2 Aspectos genéticos

O nome comum "crisântemo" é derivado do grego *chrysanthemum* ("chrysos", ouro; "anthemon", flor) que significa flor amarela ou flor dourada. Os primeiros relatos escritos da flor amarela foram feitos pelos chineses 500 anos a.C., onde a planta seria utilizada para dar perfume ao vinho. Ela foi introduzida no Japão por volta do ano 800 de nossa era e logo tornou-se a flor nacional. Quase mil anos depois (1764), o crisântemo era introduzido no mundo ocidental, especificamente na Inglaterra (Dowrick, 1953; Souza, 1957; Natureza, 1993).

Algumas mudanças de forma e tamanho da flor têm sido observadas com relação às espécies ancestrais. Dowrick (1953) estudando a origem, distribuição e evolução, sustenta que provavelmente o crisântemo apresentava inicialmente uma flor única similar ao *Chrysanthemum indicum* que ocorre naturalmente no oriente. Processos inerentes ao cultivo e domesticação transformaram a corola e incrementaram o tamanho do disco floral; estas mudanças foram acompanhadas por outras nos órgãos reprodutivos, como: atrofia dos órgãos masculinos e redução do tamanho das anteras.

O crisântemo tem como centros de diversidade, duas regiões distintas: a região Mediterrânea (Algeria e Ilhas Canárias) e, uma outra, a China e o Japão (Dowrick, 1952). As possíveis espécies ancestrais apresentam diversos complexos cromossômicos; na região Mediterrânea encontram-se espécies anuais e diplóides; na região Oriental as espécies são perenes e poliplóides. Neste último centro são encontradas espécies diplóides até decaplóides, incluindo as espécies *C. indicum* e *C. japonense*, ambas hexaplóides ($2n = 6X = 54$) e ambas provavelmente ancestrais que desenvolveram o crisântemo de jardim hoje cultivado.

Diversos estudos genéticos mostram a variabilidade quanto ao número de cromossomos das variedades cultivadas. Trabalhos realizados em variedades japonesas, inglesas e americanas, desenvolvidos respectivamente por Shimotoma (1933), Dowrick (1953) e Walker (1966), citados por Dowrick & El Bayoumi (1966a), apresentaram uma variação quanto ao número de cromossomos; assim, as variedades japonesas variando entre $2n = 45 - 64$, as inglesas $2n = 47 - 63$ e as americanas $2n = 45 - 64$, demonstrando que não necessariamente correspondem ao múltiplo do número básico ($X = 9$).

Dos estudos feitos por Dowrick (1953), além da variação encontrada no número de cromossomos, ele observou que a maior parte das variedades estudadas apresentou tal variação entre $2n = 54 - 56$ cromossomos.

2.3 Aspectos botânicos

Os crisântemos, anteriormente classificados dentro do gênero *Chrysanthemum*, abrangem cerca de duzentas espécies (Rendle, 1938; Natureza, 1993). A complexidade e multiplicidade do gênero, tem originado recentes reclassificações. Anderson (1987) discutindo a

reclassificação sugere que o gênero *Chrysanthemum* contenha somente três espécies (*C. corinatum*, *C. coronarium* e *C. segetum*); sendo que a maior parte das espécies de importância na floricultura estariam contidas no novo gênero *Dendranthema*, incluindo mais de 7000 cultivares de plantas ornamentais e de jardins, os quais são comercializados em dúzias, maços, flor única ou envasados.

O Código Internacional de Nomenclatura de Plantas Cultivadas julga como correto a classificação dos crisântemos cultivados para a produção de flores de corte, vaso e de jardins, como *Dendranthema grandiflora* (Strasburguer et al., 1988; Anderson, 1987).

Dendranthema grandiflora Tzvelev., segundo a classificação de Cronquist pertence à divisão: *Magnoliophyta* (*Angiospermae*); classe: *Magnoliopsida* (*Dicotyledoneae*); sub-classe: *Asteridae*; ordem: *Asterales*; família: *Asteraceae* (*Compositae*); tribo: *Anthemideae*; sub-tribo: *Chrysantheminae* (Rendle, 1938; Catharino et al., 1984; Rochelle et al., 1991).

O crisântemo é uma planta perene, herbácea, apresenta folhas simples e alternas. As flores se caracterizam por estarem sempre reunidas em capítulos compostos por dois tipos diferentes de flores: um, externo, composto por flores exclusivamente femininas, com corola alongada, chamada de flores radiais. Outro, interno, formado por uma série de pequenas flores distribuídas em círculos, com corola reduzida, abrigando os elementos femininos e masculinos e, constituindo as chamadas flores do disco (Souza, 1957; Lorenzi & Souza, 1995; Griffiths, 1987).

O valor ornamental desta planta reside especialmente nas "flores", como são chamadas vulgarmente suas inflorescências em capítulo.

A Sociedade Inglesa de Cultivadores de Crisântemo classificou as variedades em 7 grupos distintos conforme as características dos capítulos, tentando dar certa ordenação à diversidade existente (Natureza, 1993):

- retroflexos, capítulos com pétalas curvadas para dentro.
- reflexos, capítulos com pétalas formando uma curva voltadas para fora.
- intermediários, capítulos com pétalas tanto voltadas para dentro como para fora.
- globosos, capítulo assumindo a forma de um globo.
- flores simples, capítulos apresentando apenas uma camada de pétalas.
- grupo de anêmonas, capítulos com muitos raios saindo do disco central.
- variados, crisântemos cujos capítulos não se enquadram nos grupos anteriores.

O método de propagação convencional do crisântemo é a propagação vegetativa, feita por meio do uso de mudas enraizadas; comercialmente são destacados os ápices vegetativos, com cerca de 8 a 10 cm de comprimento, com 5 a 6 folhas, e induzidos ao enraizamento na presença de auxinas (ácido indolbutírico veiculado em talco). O enraizamento ideal é logrado num período aproximado de duas semanas.

2.3.1 Fotoperíodo

O sucesso do crisântemo como flor de corte se deve à precisão com que responde ao fotoperíodo para a indução floral, à grande diversidade de tipos de cores de flores, à resistência ao transporte e a uma excelente durabilidade nos vasos (Castro, 1992).

O crisântemo é uma planta fortemente influenciada pelo comprimento do dia, e é dita como planta de dia curto (PDC), isto é, as plantas são induzidas ao florescimento quando o fotoperíodo for inferior à duração do período crítico; também chamadas de plantas de

fotoperiodicidade negativa. O período crítico entende-se como o exato comprimento do dia capaz de alterar o comportamento da planta. Quando cultivado em dias longos, com fotoperíodo maior do que 13 h/dia, o crisântemo responde com crescimento vegetativo (Popham & Chan, 1950; Cuquel, 1997).

O conhecimento destes dados é de muita importância para a produção comercial do crisântemo; a classificação das flores se dá em função do comprimento do haste e, este, depende do fotoperíodo. Mesmo durante o enraizamento, as plantas permanecem sob período de dias longos. Procura-se manter um dia longo, a fim de que as plantas não sejam induzidas ao florescimento num momento indesejável (Miranda et al., 1994). Para o crescimento vegetativo, as plantas são submetidas a períodos de luz de até 16 horas por dia, num espaço de tempo aproximado de 5 semanas após o plantio, requerendo para tal o suplemento de luz artificial em esquemas de dia longo contínuo, dia longo por interrupção da noite ou dia longo por interrupção da noite com luz intermitente. Para a indução ao florescimento, o tratamento com dia curto inicia-se às 5 semanas após o plantio, abrangendo um período de 4 semanas nas quais as plantas serão submetidas até 16 horas de escuro; isto logra-se com cobertura de polietileno nas estufas que veda totalmente a entrada de luz sobre as plantas. Na prática mantém-se o crisântemo sob dias curtos até pelo menos o momento em que é possível observar a cor das pétalas que caracteriza a variedade (Cuquel, 1997).

O crisântemo é uma cultura que leva em torno de 110 dias para atingir o ponto de corte, com variações em função da época do ano; no verão são necessários 15 semanas e no inverno 16 semanas (Miranda, et al., 1994).

2.4 Aspectos gerais no uso dos mutagênicos

Em estudos feitos sobre a importância para os floricultores das novas variedades originadas de mutações somáticas, Wasscher (1956), constatou que um terço das novas formas cultivadas de crisântemo surgiram como mutantes somáticos espontâneos, denominados comumente na literatura como "sports".

Após estudos citológicos em 27 variedades, Dowrick & El Bayoumi (1966a), sugeriram que tanto a perda como o ganho de cromossomos durante as mitoses poderia ser responsável pela origem de novas variedades. De fato, Dowrick (1953), estudou várias famílias observando variações no número de cromossomos das novas variedades, entre e dentro das famílias. Ele destacou a importância básica de tais observações com o objetivo de estimular a produção de mutantes similares em trabalhos posteriores.

As taxas de ocorrência de mutações espontâneas, na natureza, são muito baixas; em plantas diplóides, uma mutação espontânea dominante origina-se numa taxa de 2×10^{-5} ; se a planta é poliplóide, a chance de ocorrência é correspondentemente maior. A expressão fenotípica de uma mutação recessiva depende da ocorrência de dois ou mais eventos mutacionais independentes sobre o mesmo zigoto ou na união dos gametas mutantes. Em qualquer dos casos, a probabilidade de um novo fenótipo é cerca de 1×10^{-5y} , sendo y, o nível de ploidia da planta. Estes cálculos referem-se a espécies alógamas, onde os cruzamentos e a recombinação gamética se dão ao acaso. Em espécies autógamas, de autopolinização, a probabilidade de que um zigoto seja formado pela união de gametas mutantes recessivos, para um determinado caráter, é aproximadamente 1×10^{-5} na segunda geração após a mutação gamética (Nabors, 1976).

Estas mutações têm tido um papel importante também no melhoramento de outras espécies de propagação vegetativa como frutíferas (Donini & Micke, 1984; Maluszynski et al., 1995).

Dermen (1960) estudou diversas espécies frutíferas de propagação vegetativa como a macieira, pessegueiro, citrus; espécies ornamentais como a poinsetia e geranium e até espécies monocotiledôneas, procurando um melhor entendimento da natureza das mutações somáticas nestas plantas. Ele estudou tais espécies induzindo a formação de plantas poliplóides por meio do uso da colchicina. Fenômenos como variação de folhas em plantas ornamentais, diferentes formas e tonalidades de cor em frutos, que têm sido observados de forma natural ao longo dos anos, constituem variantes das formas normais. Tais mudanças observadas podem ter sido originadas por mudanças genéticas em um ou mais genes ou por alterações cromossômicas ocorridas originalmente no núcleo de uma única célula localizada num ponto de crescimento (gema ou meristema axilar) dando origem, posteriormente, a quimeras. Segundo ele, muitas mutações são facilmente reconhecidas quando atingem pontos de crescimento que dão origem a folhas, flores e frutos, porém, mutações que afetam a fisiologia da planta não são facilmente detectáveis.

Para a indução de um evento mutacional em plantas, o melhorista deverá escolher entre dois grupos de agentes mutagênicos: mutagênicos físicos e químicos. Os agentes físicos tem sido utilizados com maior frequência do que os agentes químicos, porém a utilidade de qualquer mutagênico, no melhoramento de plantas, depende de sua efetividade (relação entre frequência de mutação e dose utilizada) e também da sua eficiência (relação entre mutações desejáveis e indesejáveis). Segundo Broertjes & Van Harten (1988), o uso dos mutagênicos químicos iniciou-se desde 1940. Um ano mais tarde, era comprovada a capacidade mutagênica do gás mostarda (Auerbach & Robson, citado por Brewbaker, 1969).

Os mutagênicos químicos compreendem uma série de substâncias que induzem mutações de ponto e quebras cromossômicas, entre elas, azida sódica, antibióticos, bases análogas, agentes alquilantes (metanossulfonato de etila, por exemplo), etc. (Yamaguchi, 1980; Tulmann Neto et al., 1990).

Os mutagênicos químicos atuam a nível nuclear, reagindo com o DNA das células, alquilando os grupos fosfato (agentes alquilantes), incorporando-se no lugar das bases do DNA (bases análogas), alterando as bases via oxidação (acridinas) ou provocando aberrações cromossômicas, propriamente ditas (azida sódica) (Yamaguchi, 1980).

Os compostos alquilantes podem ser monofuncionais ou bifuncionais, conforme apresentem um ou dois grupos reativos, respectivamente. Estes grupos reativos interagem covalentemente em sítios nucleofílicos diferentes do DNA. Se estes sítios estiverem localizados na mesma cadeia polinucleotídica do DNA, o produto de reação é considerado como uma ponte intracadeia; se os dois sítios estão sobre cadeias opostas, resulta na formação de uma ponte intercadeia do DNA.

O metanossulfonato de etila (EMS) é um agente monofuncional agindo num sítio nucleofílico no DNA, podendo provocar transições pela alquilação da guanina, pareando incorretamente com a timina. Outro mecanismo de ação deste mutagênico é a remoção de sítios purínicos (depurinização), causando transições e transversões (Henriques & Querol, 1987).

Os mutagênicos químicos têm sido pouco utilizados devido à dificuldade na penetração nos tecidos, nas espécies de propagação vegetativa nas quais são tratadas estacas, gemas, mudas enraizadas e outras partes da planta. Mais recentemente, com o desenvolvimento das técnicas em cultura de tecidos, o uso destes mutagênicos têm aumentado; este fato é interessante devido a existência de diferenças

tanto no modo de ação, como na eficiência entre estes e os mutagênicos físicos (Brewbaker, 1969; Tulmann Neto, et al., 1990).

Os mutagênicos físicos compreendem os diversos tipos de radiações, como os raios ultravioletas (U.V.), radiações eletromagnéticas (raios-X, gama) e radiações corpusculares (partículas beta, alfa, prótons, neutrons, etc.).

Cada tipo de radiação ionizante possui em comum a propriedade de liberar energia, porém cada um tem características físicas particulares que são consideradas para seu uso na indução de mutações pela capacidade de penetração nos tecidos vegetais. Os raios-X e gama apresentam um comprimento de onda (λ) menor do que 10 nm. A ionização é o principal meio pelo qual a energia da radiação ionizante é transferida para os tecidos vegetais e ela resulta da passagem de uma radiação eletromagnética a qual causa a projeção de um elétron de um átomo criando um par de íons, negativo e positivo, interagindo com a matéria por meio da remoção de elétrons (Rogerio & Nascimento, 1997).

A energia absorvida a partir da radiação ionizante pode atuar no material vegetativo direta e indiretamente. Além do efeito direto de coalisão das moléculas, as radiações produzem reações com as moléculas estudadas. A quebra das moléculas da água gera radicais livres, tais como: hidroxila e hidrogênio. Estes radicais, provenientes da radiólise da água, podem interagir entre si ou com moléculas próximas levando à formação de peróxidos.

Os peróxidos são altamente reativos, destacados como promotores dos danos às macromoléculas e podem ser responsáveis por mutações causadas por radiações ionizantes associando-se aos efeitos diretos.

A luz ultravioleta não é uma radiação ionizante, e sua energia emitida é transferida por um processo conhecido como excitação capaz de produzir um efeito genético (mutações gênicas ou cromossômicas). Seu comprimento de onda está entre 190 - 290 nm; por causa de seu

maior comprimento, a capacidade de penetração nos tecidos é muito baixa, por tanto, não é utilizada nos trabalhos de indução de mutações *in vivo*. O seu uso esta sendo considerado para tratamentos *in vitro* de células isoladas, protoplastos, calos, esporos, grãos de pólen, etc., tecidos que, por sua natureza, facilitam a penetração (Yamaguchi, 1980; Donini & Micke, 1984).

A literatura revela um grande número de trabalhos realizados em indução de mutação em crisântemo; muitas novas variedades mutantes tem sido liberadas, a grande maioria induzidas por meio do uso de raios - X e gama (Broertjes et al., 1980; Datta & Gupta, 1983; Datta & Gupta, 1984; Datta, et al., 1985; Datta, 1985; Datta, 1987; Banerji & Datta, 1990; Banerji & Datta, 1992; Datta & Banerji, 1993; Tulmann Neto & Latado, 1996).

2.4.1 Radiossensitividade

A radiossensitividade refere-se à sensibilidade do material vegetativo ao efeito dos mutagênicos físicos.

A deposição da energia da radiação nas estruturas celulares resulta numa seqüência de reações físicas, químicas e bioquímicas. Num princípio da cadeia de eventos, produzem-se a coalisão de partículas com as moléculas alvos, a perda de elétrons, a radiólise de pequenas moléculas como a água e a conseqüente ativação de radicais, conhecidos agentes que causam efeitos radiobiológicos (Yamaguchi, 1980).

A radiossensitividade varia entre espécies e dentro de espécies, e depende do volume nuclear (conteúdo de DNA). O número de cromossomos e o nível de ploidia, são fatores genéticos que influenciam a sensibilidade dos genótipos. Sparrow et al. (1968), relataram uma série de fatores que podem contribuir a variadas

respostas radiobiológicas por parte da planta. Além dos fatores genéticos, aspectos fisiológicos (idade da planta, estágio de crescimento, dormência), bioquímicos (taxa metabólica, concentração de hormônios de crescimento), radiológicos (classe de radiação, taxa de exposição, etc.) e ambientais (temperatura, conteúdo de umidade nos tecidos).

Broertjes & Van Harten (1988), sugerem que fatores climáticos e condições ambientais antes e depois do tratamento, bem como o estágio de desenvolvimento de raízes e brotações possam também influenciar a sensibilidade.

Segundo Purdom (1963), durante os ciclos de divisão celular, profundas mudanças ocorrem no aspecto e estrutura dos cromossomos. Segundo ele, marcadas diferenças de sensibilidade ocorrem entre os diferentes estágios da divisão.

Amiro (1986), avaliou o efeito da taxa de dose e dose total de radiação gama sobre o crescimento do caule em mudas de pinus, observando um decréscimo visualizado na altura das plantas para ambas variáveis.

Tecidos radiculares são altamente sensíveis aos tratamentos; raízes danificadas comprometem o crescimento vegetativo e podem levar à letalidade das plantas. Smilansky et al. (1986), irradiaram estacas de rosas com doses variando de 10 - 130 Gy, sem a proteção basal e verificaram que, quase em sua totalidade, o desenvolvimento do sistema radicular foi danificado, verificando uma taxa de sobrevivência de plantas menor do que 10% a uma dose de 50 Gy; paralelamente observaram uma alta sobrevivência, nesta mesma dose, nos tratamentos onde foram protegidas as bases das estacas.

Dowrick & El Bayoumi (1966b), testaram a radiosensibilidade numa variedade de crisântemo com várias doses de raios-X e raios gama. Compararam os valores obtidos com os valores provenientes de outros trabalhos, também realizados em crisântemo, e encontraram diferenças significativas quanto à sensibilidade dos materiais.

2.4.1.1 Dose de radiação

A dose de irradiação é a medida usual de uma radiação ionizante em trabalhos de indução de mutação, e corresponde à quantidade de energia absorvida por unidade de massa de tecido irradiado. A unidade de dosimetria é o *rad*, o qual é definido como a energia absorvida de 100 erg por grama de tecido (Purdom, 1963).

Alguns autores utilizam o *roetgen* (R) como unidade de dose de exposição, sendo que para finalidades práticas: $1 \text{ rad} \cong 1 \text{ R}$; tendo-se em conta a existência de um fator F de conversão que depende do material a ser tratado e da energia de radiação envolvida (Eisenlohr, 1977).

A unidade oficial de dose absorvida (D), definida mais recentemente pelo Sistema Internacional de Unidades (SI), é o *gray* (Gy), em equivalência: $1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad} = 10^4 \text{ erg.g}^{-1}$; $1 \text{ krad} = 10 \text{ Gy}$.

A dose de irradiação liberada é formada pelo produto da intensidade da radiação (taxa) e a duração da exposição; assim, diferentes doses podem ser dadas variando a taxa ou o tempo da exposição. A taxa de dose absorvida, então, é usualmente expressa em Gy/h, Gy/min., Gy/s ou rad/h, rad/min., e rad/s (Purdom, 1963; Yamaguchi, 1980).

2.4.1.2 Determinação da dose de irradiação

No caso de mutagênicos físicos, a escolha da dose correta de irradiação constitui uma etapa indispensável na aplicação da mutagênese induzida em programas de melhoramento. Utilizam-se várias doses, ao redor das doses aplicadas em trabalhos anteriores,

sobre plantas ou explantes apropriados, e a partir dos danos fisiológicos, geralmente refletidos na diminuição do crescimento, é elaborada uma curva de resposta às doses de irradiação. A sobrevivência de plantas (LD_{50}) e o número de perfilhos são outros parâmetros levados em conta na escolha da dose mais adequada.

Sparrow et al. (1968) realizaram um amplo e detalhado trabalho sobre a radiosensitividade em 28 espécies de plantas, determinando a LD_{10} , LD_{50} , LD_{90} e LD_{100} , observando uma alta correlação dos dados obtidos com o volume nuclear.

Geralmente, em doses baixas de irradiação, a sobrevivência de plantas é maior, mas diminui a freqüência de mutações. Altas doses aumentam a freqüência de mutações, mas ao mesmo tempo verifica-se uma diminuição na taxa de sobrevivência e na capacidade de regeneração do material vegetativo induzido. Sabe-se também que a doses altas, maior é o risco de que uma mutação desejável esteja acompanhada de uma mutação indesejável, devido ao fato de que muitos eventos mutacionais por célula podem ser induzidos.

Isto, no caso de plantas de propagação sexuada, pode ser contornado; mutações desejáveis podem ser separadas das indesejáveis por meio de cruzamentos, especificamente por retrocruzamentos seguido de seleção na população segregante. No entanto, em plantas de propagação vegetativa, esta separação é quase impossível, o que sugere escolher doses mais baixas para uma maior probabilidade de ocorrência de mutações favoráveis.

Broertjes & Van Harten (1988), definiram as vantagens e desvantagens da aplicação das doses de irradiação em crisântemo, assim têm-se:

baixa dose

vantagens:

- aproximadamente 100% de sobrevivência;
- problemas reduzidos quanto ao crescimento das plantas.

desvantagens:

- baixa frequência de mutações;
- pequenos setores;
- poucos casos de rearranjo de quimeras periclinais.

alta dose**vantagens:**

- alta frequência de mutações;
- grandes setores;
- alta porcentagem de quimeras periclinais;
- alta porcentagem de rearranjo.

desvantagens:

- baixa sobrevivência de plantas;
- crescimento com malformações;
- maior número de mutações por células (mutações indesejáveis).

2.5 Estrutura e funcionamento do meristema apical

Geralmente na propagação do crisântemo são utilizadas gemas apicais, gemas axilares desenvolvidas, estacas, etc., partes vegetativas que após o corte são levadas ao enraizamento e posteriormente plantadas no campo. Mudas enraizadas também constituem o material vegetativo comumente utilizado no tratamento mutagênico *in vivo*. Quando é discutido o funcionamento e estrutura dos meristemas, estão sendo incluídos os termos comumente encontrados na literatura, e utilizados indiferentemente, como: gema apical, meristema, gema axilar, domo apical, etc., todos apresentando uma estrutura multicelular e que constituem pontos de crescimento importantes do qual novos crescimentos são originados (Broertjes & Van Harten, 1988).

Dermen (1960), estudou a estrutura de meristemas apicais em várias espécies ornamentais e frutíferas. Em cortes histológicos, observou amplas camadas de células dispostas de forma curvada e apresentando rápido crescimento do qual, segundo ele, novas folhas, ramos, caules, flores e frutos surgiam. A massa de células dispostas no extremo superior do ponto de crescimento como também nos lados do mesmo, daria origem às folhas; dos tecidos dispostos abaixo do extremo superior e na parte central do ponto de crescimento, dariam origem ao caule e às ramificações. Ele observou uma constante divisão de células em todos os sentidos do domo apical quando era ativado o crescimento da planta e quando era quebrada a dominância apical, do qual surgiram as brotações laterais.

O crescimento vegetativo e mesmo a formação de flores no crisântemo se originará a partir de células localizadas dentro do mesmo domo apical.

A massa de células do domo apical organiza-se em camadas. Satina & Blakeslee (1941), propuseram as expressões L-I, L-II, L-III para indicar as três camadas histogênicas superior, média e inferior, respectivamente, que formam o meristema apical. As três camadas dão origem aos diversos tecidos e órgãos das plantas.

Discussões sobre a ontogenia das camadas histogênicas têm sido abordadas pelos autores, encontrando-se diferenças, entre as espécies, sobre a origem dos distintos órgãos da planta.

Satina & Blakeslee (1941), detalharam suas observações feitas sobre a estrutura de ápices florais e apicais estudadas em *Datura stramonium*. Eles descreveram a ontogenia da flor, sépalas, pétalas e estames, baseando-se na atividade mitótica, nos planos de divisão e a constituição diferencial cromossômica das células das três camadas histogênicas. Eles concluíram que a camada L-I foi responsável pela formação da epidermes das diversas partes, cujas células seguem um plano de divisão periclinal nos estágios iniciais, seguido de divisões anticlinalis, nos estágios mais avançados; no entanto, a iniciação do

desenvolvimento dos primórdios das folhas em meristemas apicais, e de sépalas e pétalas em ápices florais, foi similar e dependente, primariamente, da atividade das células das camadas L-II, cuja divisão segue um plano periclinal inicial, sendo que divisões anticlinais e em diversos planos também estão envolvidas no desenvolvimento. Divisões em todas as direções resultarão na expansão lateral e longitudinal das regiões dos primórdios.

Dermen (1960), estudando a natureza das mutações somáticas em pessegueiro, verificou que apenas o tecido epidérmico das folhas foi originado da camada L-I, sendo que a maior parte do tecido interno do limbo folhar foi originada da camada L-II, e somente o tecido localizado na nervura central das folhas originou-se da camada L-III. Estas observações foram determinadas pela análise do nível de ploidia em cada tecido das folhas.

Stewart & Dermen (1970b), em análises genéticas feitas nas camadas histogênicas de mutantes somáticos espontâneos de crisântemo, sugeriram a origem das pétalas a partir das camadas mais externas, L-I e L-II.

Estudos feitos em macieira também revelaram importantes observações quanto à estrutura, organização e funcionamento das camadas histogênicas. Plantas quiméricas diplo-tetraplóides foram analisadas quanto ao nível de ploidia dos diversos tecidos em várias regiões na folha, partes da flor, e do caule, dentro do ápice meristemático (Dermen, 1953). Ele estabeleceu uma relação direta entre as camadas histogênicas individuais no ápice e a origem dos tecidos nas folhas, flores e do caule, observando que células com vários níveis de ploidia estavam presentes dentro de um mesmo órgão vegetativo, assim, o ovário era tetraplóide, estilo, estigma, pétalas e sépalas, eram diplóides; ele baseou as observações em análises cromossômicas, tamanho do núcleo e tamanho das células das diversas camadas.

Dayton (1969), observando a heterogeneidade genética nas camadas histogênicas, também em macieira, descreveu a possibilidade

de que genes mutantes em células e tecidos derivados das camadas mais internas, L-II e L-III, não possam tornar-se aparentes devido ao efeito de "mascaramento" produzido pela camada mais externa, L-I. Uma mutação ocorrendo em tecidos derivados da camada L-I, poderá tornar-se aparente se afeta característica facilmente observável, como coloração de flores e frutos. Segundo ele, muitos mutantes espontâneos para coloração são provavelmente resultantes de mutações na camada L-I, observações estas, surgidas após o estudo feito sobre a intensidade da antocianina nos frutos de várias plantas originadas de gemas adventícias de duas espécies de macieira.

Trabalhos semelhantes quanto ao estudo das camadas histogênicas que formam o ápice meristemático de plantas dicotiledôneas, tem sido realizados também em espécies monocotiledôneas. Stewart & Dermen (1979), relatam a similaridade básica da ontogenia em monocotiledôneas e dicotiledôneas. Segundo eles, ambos meristemas apicais apresentam as três camadas histogênicas, as quais se mantêm durante o desenvolvimento das brotações e durante a formação de crescimentos secundários ou laterais.

Evidencias genéticas e quiméricas, são provenientes de evidencias experimentais sobre a funcionalidade das camadas nos meristemas apicais, fato que sugere a presença destas em talvez todas as plantas angiospermas (Stewart & Dermen, 1979; Broertjes & Van Harten, 1988).

Popham & Chan (1950) discutiram alguns termos e hipóteses sobre a formação e estrutura dos meristemas apicais. Segundo eles o conceito de "túnica - corpo", sugerido por alguns autores (Schmidt, Rudiger, Engard, Artschwager, citados por Popham & Chan, 1950) abrigou a hipótese da existência de várias camadas túnicas caracterizadas pela divisão anticlinal das células, e em cuja camada mais interna, o corpo ou coração (core), estivessem células dividindo-se em todas as direções. Eles delimitaram cinco zonas em meristemas de

crisântemo, analisando os planos de divisão em diversos estágios de desenvolvimento.

Satina & Blakeslee (1941) e Popham & Chan (1950), utilizaram a expressão camada núcleo (layer - core) para explicar suas hipóteses, ao invés da terminologia túnica-corpo que, segundo eles, admitia certa confusão e falsas implicações.

2.5.1 Comportamento de gemas axilares

No crisântemo, o desenvolvimento das gemas axilares é controlado pela influência da dominância apical do ápice principal da planta. A dormência, o estado latente destas gemas, pode ser induzida pelos efeitos ambientais da estação climática ou por meios artificiais (Broertjes & Van Harten, 1988).

A variedade de formas das plantas resulta de três fases de desenvolvimento dos ramos: a iniciação dos primórdios das gemas, o desenvolvimento das gemas antes da fase de dormência e, finalmente, o crescimento dessas gemas. Esta última fase é conhecida como dominância apical e é determinada pelo balanço hormonal bem como pelo estado nutricional dos tecidos.

As auxinas são sintetizadas na planta em regiões de crescimento ativo como meristema apical, gemas axilares, folhas jovens e meristemas radiculares. A concentração de auxinas e outros hormônios causa uma translocação de nutrientes para essa região, no caso o meristema apical, em detrimento das gemas laterais que ficam carentes de substrato para crescimento. A quebra da dominância apical provoca uma queda na concentração de auxinas, um desequilíbrio hormonal, translocação de nutrientes para outros pontos de crescimento e o conseqüente desenvolvimento de gemas axilares (Ferri, 1979).

Popham & Chan (1950) descreveram os três tipos de gemas terminais em crisântemo, comumente estudadas pelos botânicos e utilizadas pelos floricultores: a gema vegetativa, a gema flor ou gema inflorescência, e uma terceira gema denominada de gema coroa (crown bud), caracterizada pela posição terminal no caule principal, cuja formação é acompanhada pela perda da dominância apical e o conseqüente desenvolvimento das gemas laterais.

2.5.2 Gemas adventícias

As gemas adventícias constituem crescimentos vegetativos iniciados fora das regiões meristemáticas primárias. Elas podem originar-se a partir de diferentes partes da planta, freqüentemente de calos formados nas feridas no caule, e ainda surgir diretamente a partir de tecidos lesados. Elas podem ter origem endógena ou exógena, do tecido epidérmico (L-I) ou do tecido-corpo (L-III), no entanto, o número de células envolvidas na formação do primórdio de uma gema adventícia pode variar de uma a várias células dependendo da espécie (Broertjes & Van Harten, 1988).

O número de células iniciais que esteja envolvida na formação de uma gema adventícia, constitui um fato de extrema importância no melhoramento de plantas por indução de mutação. O tratamento mutagênico de gemas adventícias, cuja formação inicial esteja restrita a uma única célula, poderá originar mutantes sólidos se plantas forem regeneradas destas gemas.

Broertjes et al. (1968), compilaram uma lista com mais de 350 espécies, cobrindo um grande número de famílias entre monocotiledôneas e dicotiledôneas, das quais obtiveram-se gemas adventícias e, conseqüentemente, plantas a partir de folhas destacadas.

O interesse na indução de gemas adventícias como meio para produzir um grande número de plantas não quiméricas ou mutantes sólidos, foi iniciado por Sparrow et al. citado por Broertjes & Keen, (1980), com experimentos realizados em violeta africana (*Saintpaulia* sp). Eles irradiaram folhas jovens de várias cultivares e induziram *in vivo* a formação de gemas adventícias e subseqüentemente, a produção de plantas, sendo que estas, quase que em sua totalidade, foram mutantes sólidos. Eles sugeriram que a alta porcentagem destas plantas, presumivelmente, originaram-se devido ao fato de que novas plantas poderiam ter-se formado a partir de uma única célula epidérmica.

Stewart & Dermen (1970b), analisaram um grande número de gemas adventícias em cultivares de crisântemo, observando que a grande maioria desenvolveu quimeras periclinais, concluindo que no mínimo duas células iniciais estavam presentes no seu estágio inicial de desenvolvimento, ambas derivadas de camadas histogênicas diferentes.

No entanto, procurando evidenciar experimentalmente a origem unicelular ou pluricelular das gemas adventícias, Broertjes & Keen (1980), desenvolveram um modelo matemático, por meio do qual descreveram o processo de formação do ápice e o cálculo da porcentagem relativa de quimeras esperadas (RCE) após um evento mutagênico. Após a análise matemática realizada em diversos trabalhos onde foi induzida a formação de gemas adventícias, eles concluíram que duas alternativas poderiam explicar a baixa freqüência de quimeras obtidas em relação a um alto número de mutantes sólidos e plantas não mutantes:

- 1- o ápice da brotação adventícia é formado por uma única célula da camada mais externa de um meristema ou massa de calos.
- 2- - o ápice da brotação adventícia é formado por duas ou três células da camada mais externa.

Eles propuseram ainda, a seguinte definição: "o ápice de uma gema ou brotação adventícia é formado por uma ou poucas células

filhas de uma célula original e esta, portanto, origina-se de uma única célula”.

Hill (1968), foi uns dos pioneiros em desenvolver uma metodologia *in vitro* para a indução e desenvolvimento de gemas adventícias em crisântemo. Ele utilizou explantes provenientes do caule e da base do receptáculo de flores jovens, testando diferentes meios de cultura, subcultivando os explantes e obtendo um valor médio de dez brotações adventícias por explante.

Mais tarde, Bush et al. (1976), obtiveram plantas a partir do cultivo *in vitro* de pequenos segmentos de pétalas, como também do tecido epidérmico das pétalas de crisântemo, com o objetivo de examinar a natureza quimérica das cultivares estudadas, sendo que a epiderme das pétalas derivaram-se da camada L-I e segmentos de pétalas derivadas da camada L-I e L-II.

Mais recentemente, Kaul et al. (1990), relataram a obtenção de plantas a partir da indução e regeneração direta de gemas adventícias provenientes de explantes de folhas e do caule em crisântemo.

A indução de gemas adventícias *in vitro* requer do uso de reguladores de crescimento; geralmente são utilizados o ácido naftaleno acético (NAA), o ácido indolbutírico (IAA) e a benzylaminopurina (BAP), que usados em diferentes concentrações, apresentam maior regeneração de plantas, conforme o cultivar (Earle & Langhans, 1974a, b; Bush et al., 1976; Kaul et al., 1990).

Devido à origem unicelular das gemas adventícias de crisântemo cultivadas *in vitro*, o tratamento mutagênico de explantes seguido da regeneração de plantas, via gemas adventícias, possibilita a obtenção de plantas mutantes sólidos (Latado, 1993).

2.6 Quimerismo

Muitos autores admitem que a formação de quimeras é um dos principais obstáculos no melhoramento de plantas de propagação vegetativa por meio da indução de mutação (Yamaguchi, 1980; Broertjes & Keen, 1980).

Um evento mutacional pode ocorrer ao acaso em qualquer célula de um meristema apical ou axilar, e em princípio, em qualquer uma das três camadas. Se a planta for originada a partir de uma única célula inicial e se esta célula for mutada, não haverá quimerismo. No entanto, sabe-se que as gemas constituem o material vegetativo que com maior freqüência são o alvo do tratamento mutagênico em espécies de propagação vegetativa. Tais gemas são multicelulares, o evento portanto, poderá ocorrer numa ou em várias células de diferentes regiões meristemáticas já presentes no ápice, o qual originará uma condição quimérica (Broertjes, 1982; Donini & Micke, 1984).

Broertjes & Van Harten (1988), afirmam que uma mutação espontânea ou induzida pode ocorrer em qualquer classe de tecido, mas um simples evento mutacional é normalmente restrito a uma única célula; a posição desta, é de extrema importância para atingir os objetivos do tratamento.

Uma planta quimérica é toda planta que apresenta dois ou mais tecidos somáticos geneticamente diferentes; assim, ocorre quimerismo automaticamente quando mais do que uma célula estiver presente no momento do tratamento mutagênico (Yamaguchi, 1980; Broertjes & Van Harten, 1988).

Dermen (1953), freqüentemente cita o termo citoquimera, referindo-se à condição quimérica da planta onde tecidos ou regiões vegetativas diferem em seu número cromossômico.

Se uma mutação for induzida numa célula do meristema apical, sucessivas divisões mitóticas darão origem a uma linhagem de

células mutadas dentro de um grupo de células não mutadas que também estarão em constante divisão. A evolução da célula mutada dependerá, por tanto, da posição dentro do ápice e da competição com as células vizinhas (Yamaguchi, 1980; Broertjes & Van Harten, 1988).

Yamaguchi (1980) afirma que é impossível, durante os estágios iniciais do desenvolvimento das plantas, selecionar os tecidos quiméricos para caracteres não visíveis.

Broertjes & Van Harten (1988), relatam os vários tipos de quimeras que podem ser originadas em decorrência de um evento mutagênico:

- 1- quimera setorial - quando são mutadas um grupo de células localizadas nas três camadas histogênicas.
- 2- quimera mericlinal - quando somente é mutado um grupo de células ou parte de uma camada histogênica.
- 3- quimera periclinal - quando todas as células de uma camada histogênica apresentam a mutação.

O quimerismo resulta num número de conseqüências desfavoráveis, tais como a redução da possibilidade de reconhecer setores mutados, a qual impede a seleção precoce e obriga a fazer um ou vários ciclos de propagação vegetativa até atingir a condição de quimera periclinal (Broertjes, 1982).

Ichikawa et al. (1970), relatam sobre a possibilidade de que espécies vegetativas tenham acumulado pequenas mutações somáticas ao longo do tempo, mantidas pelo tipo de reprodução. Segundo eles, esta hipótese é mais difícil de afirmar em plantas de reprodução sexuada onde a recombinação gamética dificulta as possíveis evidências genéticas.

De fato, Broertjes et al. (1968), já reconheciam a condição quimérica das camadas histogênicas em crisântemo, preservada pelo tipo de reprodução, e admitiam a possibilidade de que este fenômeno estivesse ocorrendo em outras plantas ornamentais e frutíferas.

Dayton (1969) e Stewart & Dermen (1979), sugerem que a condição de quimera periclinal seja o estado histogênico de um grande número de espécies frutíferas e ornamentais de propagação vegetativa, dada a estabilidade dos mutantes somáticos espontâneos. No entanto, Donini & Micke (1984), divergem sobre a estabilidade relativa das quimeras periclinais, uma vez que existe a possibilidade de ocorrer um rearranjo ou deslocamento de uma camada para outra, causando uma reversão de um mutante para o fenótipo original, espontaneamente. Eles concordam em que a estabilidade é restrita a um mutante sólido ou não quimérico.

Stewart & Dermen (1970a), mediram os setores mericlinais em termos da porção da circunferência do caule que os setores ocuparam e o número de internódios por meio do qual eles persistiram em duas espécies ornamentais.

As quimeras resultam de um evento mutacional, por tanto estão associadas a todos os fatores que influenciam a mutagênese, tais como o tipo e a dose do mutagênico, e do período pré e pós tratamento. Altas doses podem ser letais à célula e a quimera, conseqüentemente, pode ser perdida. Quando são utilizados mutagênicos químicos, geralmente, o tempo de exposição é relativamente longo em comparação ao tempo de exposição dos materiais quando submetidos aos mutagênicos físicos; processos biológicos como a síntese do DNA e divisões mitóticas poderão estar ocorrendo simultaneamente. Se isto acontecer numa célula inicial apical, dois setores serão formados. O quimerismo também depende do estágio em que se encontra o material vegetativo quando é tratado, assim, especificamente em plantas de propagação vegetativa, quanto mais jovem for o meristema, menor será o número de quimeras formadas (Yamaguchi, 1980).

O uso de técnicas para o isolamento de mutações somáticas, hoje conhecidas, poderá contornar o problema do quimerismo e facilitar a recuperação de tais mutações (Donini & Micke, 1984). Com o desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos em conjunto com o

uso de indução de mutação se objetiva, cada vez mais, a obtenção de mutantes sólidos, isto é, aquelas plantas que após tratamento e desenvolvimento apresentam todas as camadas histogênicas idênticas quanto ao caráter mutado.

2.7 Seleção diplôntica

O tratamento com mutagênicos, principalmente os mutagênicos físicos, pode afetar diversas células, conseqüentemente, a sua taxa de divisão mitótica. O tratamento também pode causar a morte das células, neste caso, as células vizinhas poderão ocupar o lugar delas e retomar o crescimento meristemático (Donini & Micke, 1984).

A mutação é um evento unicelular, isto é, restrita a uma célula. A célula mutada origina um grupo de células e finalmente uma camada de células. Pelo discutido anteriormente, a irradiação de ápices multicelulares gera uma competição interna entre a célula mutada e as células não mutadas que estão ao seu redor. Este tipo de competição, em células do tecido somático, é dita de seleção diplôntica, seleção intrasomática, seleção intraindividual, etc. Quando este mesmo fenômeno atua a nível de gametas é chamado de seleção haplôntica, comumente evidenciada quando aberrações cromossômicas no pólen diminuem a capacidade de fertilização. Segundo Broertjes & Van Harten (1988), os fortes danos fisiológicos e/ou cromossômicos causados na célula diminuem a capacidade dela passar pelo crivo mitótico.

Quando a célula mutada sobrevive e se divide, origina a formação de quimeras dado que os ápices meristemáticos, como foi dito, constituem-se de grupos de células em camadas independentes (Broertjes et al., 1968).

A seleção diplôntica e o quimerismo constituem-se nos principais obstáculos no uso de indução de mutações no melhoramento

de plantas de propagação vegetativa.

Uma discussão é mantida quanto a diferenças seletivas entre células genotipicamente diferentes dentro de um mesmo tecido, fato que poderia gerar vantagens para o crescimento de uma sobre a outra; tal diferença seletiva poderia estar ocorrendo quando células normais e mutadas estão presentes dentro de um mesmo tecido vegetativo (Yamaguchi, 1980; Broertjes & Van Harten, 1988).

Setores mutados causam crescimentos aberrantes como a fasciação e bifurcações do caule, os quais são geralmente perdidos. Segundo Yamaguchi (1980), estes fatos constituem clara evidência da seleção diplôntica.

Normalmente, após um evento mutagênico, pequenas listras de cor diferente são observadas ao acaso, nas pétalas como exemplo. Broertjes & Van Harten (1988) relatam que o desaparecimento desta listas, ao longo do desenvolvimento da planta, freqüentemente é considerado como um outro exemplo de seleção diplôntica.

2.8 Rearranjamento de camadas

A irradiação pode causar a morte de células das camadas mais externas dos meristemas, possibilitando que células das camadas mais internas possam ocupar o lugar delas.

Stewart & Dermen (1970a) estudaram diversas espécies quiméricas, entre elas plantas ornamentais, procurando evidenciar experimentalmente a independência das camadas apicais em plantas quiméricas, referindo-se freqüentemente a fenômenos como deslocamento e reposição de células nos ápices, responsáveis pelo rearrranjamento de camadas e aparecimento de novos mutantes periclinais. Segundo eles, uma célula ou grupos de células podem se deslocar de uma camada interna (por exemplo, L-II) para uma camada

externa do ápice (L-I). Isto pode resultar do dano causado em células da camada externa ou de um maior e mais rápido crescimento das células da camada interna, tanto que células da camada externa são empurradas a um lado ou deslocadas por células de origem interna. Se as células que se deslocaram para a camada externa passam a conviver simultaneamente com as células originais da camada, forma-se uma quimera mericlinal; no entanto, se as células de origem interna deslocarem totalmente as células externas uma quimera periclinal será originada.

Somente com o conhecimento do potencial genético para a cor de todas as três camadas histogênicas apicais de uma planta quimérica é possível determinar se os setores encontrados são devidos a um rearranjo de camadas geneticamente diferentes ou originados de uma nova mutação (Stewart & Dermen, 1970b). Eles afirmam que o termo mutação não parece ser tão amplo quanto para abranger as mudanças resultantes do rearranjo das camadas histogênicas e a correspondente formação de quimeras periclinais. Segundo eles, o termo "sport", tem sido usado indiferentemente pelos autores, e inclui tanto mutações somáticas quanto o rearranjo, induzidos ou espontâneos e deverá ser usado quando a causa específica da variabilidade somática não for conhecida.

Weaver (1963) irradiou 4 variedades de crisântemo e obteve uma alta frequência de mutantes para a cor da flor em três destas variedades, sugerindo a sua natureza quimérica. Para tais variedades, ele interpretou a gama de cores obtidas como produto do rearranjo, provocado pela destruição dos tecidos das camadas mais externas e a conseqüente reconstituição destas regiões pelas camadas mais internas dentro das quimeras baseado no efeito da irradiação com raios gama.

Dowrick & El Bayoumi (1966b) induziram mutações numa variedade de crisântemo, com o uso de diferentes doses de raios-X e raios gama, observando nas plantas sobreviventes mudanças de cor, de

forma e tamanho das inflorescências. Eles realizaram análises nos cromossomos das plantas que apresentavam tais mudanças, observando tanto fragmentações cromossômicas como variação no número de cromossomos. Os autores sugeriram que algumas das mutações observadas originaram-se em consequência das aberrações cromossômicas geradas pelas altas doses utilizadas, não descartando que um rearranjo, devido à destruição de células da camada mais externa, poderia ter originado mutantes para cor quando doses menores foram utilizadas.

Ichikawa et al. (1970), também chegaram a conclusões similares quando após a análise citológica de mutantes induzidos em crisântemo, observaram diminuição no número cromossômico, não rejeitando a possibilidade de um rearranjo de camadas ter sido a causa das mutações na cor observadas.

2.9 Isolamento de mutações somáticas

Como foi dito anteriormente, a situação ideal para evitar o quimerismo, tanto *in vivo* como *in vitro*, é aquela em que a planta origina-se de uma única célula. O tratamento mutagênico de protoplastos, calos embriogênicos, células em suspensão e a indução de gemas adventícias de origem unicelular *in vitro* poderá resultar na obtenção de mutantes sólidos (Tulmann Neto et al., 1990).

Em trabalhos de indução de mutação em plantas de propagação vegetativa existe variação na nomenclatura utilizada para designar as diferentes gerações obtidas a partir das plantas iniciais tratadas. Gupta & Jugran (1978) utilizaram o termo vM_1 e vM_2 para denominar a primeira e segunda geração via propagação vegetativa do material irradiado. Datta (1985) utilizou a mesma nomenclatura. Donini & Micke (1984) utilizaram MV_1 , MV_2 e MV_3 . No entanto, Latado et al.

(1996) utilizaram M_1V_1 , M_1V_2 , M_1V_3 e M_1V_4 . Assim, para fins do presente trabalho, toda planta obtida diretamente do material irradiado, via propagação vegetativa, denomina-se M_1V_1 ; as plantas originadas desta última serão chamadas de M_1V_2 e assim sucessivamente.

Todo meristema apical apresenta um número de primórdios de gemas axilares em diferentes estágios ontogênicos com diferentes número de células. Como todo evento mutacional ocorre ao acaso, portanto em qualquer célula do meristema, o isolamento de um pequeno setor mutado é muito difícil em condições normais. Segundo Donini & Micke (1984), após o tratamento, o número de células mutadas será maior nos primórdios maiores, mas o tamanho do setor mutado será menor do que em primórdios com menor número de células, conseqüentemente, a probabilidade de recuperação de uma mutação somática será maior numa planta obtida por meio da propagação clonal de um primórdio de gema com menor tamanho. O conhecimento de tais implicações ontogênicas torna-se importante para a manipulação das gerações após tratamento com o mutagênico (M_1V_1 , M_1V_2).

A figura 1 mostra os primórdios de gemas axilares e o tamanho do setor mutado segundo a hipótese proposta por Donini & Micke (1984).

Ainda que o tratamento mutagênico seja *in vivo*, alguns procedimentos poderão ser seguidos para contornar o quimerismo. A técnica de podas repetidas ("cutting back method") tem sido sugerida, com a finalidade de forçar o desenvolvimento das gemas axilares em ramos laterais que constituirão a primeira geração vegetativa (M_1V_1). Os novos crescimentos a partir destes ramos darão origem à geração M_1V_2 . As sucessivas propagações tendem ampliar os setores e estabilizar as quimeras, isto é, obter quimeras periclinais (Donini & Micke, 1984).

Figura 1 - Tamanho do setor mutado e número de células mutadas em primórdios de gemas axilares após irradiação (adaptado de Donini & Micke, 1984).

Uma questão que deve ser discutida é com relação ao número de podas a ser feito na planta matriz (planta tratada com mutagênico), ou seja, o número de podas e o subsequente avanço de gerações necessário para lograr um maior número de mutantes periclinais ou mutantes sólidos. Broertjes & Van Harten (1988) recomendam que duas ou três podas são suficientes, enquanto outros trabalhos utilizaram apenas uma poda (Datta, 1987; Gupta & Jugran, 1978). Latado (1993) realizou seis podas, avançando até a geração M_1V_6 e concluiu que a partir da quarta poda (M_1V_4) houve uma estabilização na porcentagem de mutantes periclinais (plantas apresentando uma única cor nas inflorescências).

Bowen (1965) observou uma tendência na redução da freqüência de mutação e um aumento do tamanho do setor mutado, entre plantas obtidas da primeira, segunda e terceira podas respectivamente, entretanto nem todas as gemas axilares da planta matriz foram avaliadas.

Associando as observações de Donini & Micke (1984) com o método de podas repetidas é possível de se avaliar as relações entre tamanho de primórdios de gemas axilares no evento mutagênico com a freqüência de obtenção de mutantes e com o tamanho de setor mutado. Para isto é necessário irradiar plantas ou mudas, tendo-se marcado a altura do ápice meristemático no momento da irradiação. Após um período de desenvolvimento, deve-se fazer podas em diferentes alturas da planta (acima da 1ª gema axilar desenvolvida, acima da 2ª gema, ...até a 6ª gema, por exemplo), após o desenvolvimento das gemas axilares até então dormentes, eliminar todas a exceção da gema em que se deseja avaliar a mutação. A seleção deve ser realizada para caracteres de fácil visualização, como é o caso de cor de flor, por exemplo, ou outros. Por meio deste procedimento pode-se recomendar a realização das podas na parte superior ou na parte inferior da planta, ou a conclusão de que na prática não haveria variação entre estes diversos tratamentos (altura da poda).

Uma técnica alternativa para o isolamento de mutações somáticas consiste na irradiação e podas repetidas *in vitro*, ou seja, irradiação de plantas cultivadas *in vitro* e realizar o avanço de gerações a partir do cultivo de internódios em meio de cultura apropriado. Após a readaptação ao meio ambiente as mudas são levadas para a seleção no florescimento. A vantagem desta com relação à anterior é de uma maior economia de tempo (Tulmann Neto et al., 1990).

2.10 Técnica de cultura de tecidos e mutagênese

Lazarte (1984) relata o uso das técnicas de cultura de tecidos vegetais e sua importância no melhoramento de plantas, especificamente a sua utilização como ferramenta junto com as técnicas de mutação induzida.

O eficiente desenvolvimento dos métodos de cultivo *in vitro* tem facilitado o uso de indução de mutação no melhoramento de plantas, principalmente em plantas de propagação vegetativa. O uso de técnicas *in vitro*, tais como cultivo de antera, organogênese e embriogênese somática, pode superar algumas das limitações na aplicação das técnicas de mutação. O tamanho das populações, aplicação de efetivas técnicas de seleção, o espaço físico, bem como o tempo necessário para o avanço de gerações são algumas das características vantajosas que proporciona a mutagênese *in vitro* (Maluszynski et al., 1995).

Segundo Handro (1981), a seleção de fenótipos desejáveis *in vitro* pode ser feita manipulando especificamente as condições no meio de cultura. No caso de mutantes resistentes a herbicidas, o ingrediente ativo pode ser adicionado no meio onde estão sendo mantidas as células em suspensão ou protoplastos; no caso de resistência ao

estresse ambiental, as culturas podem ser submetidas a diversas condições de temperatura.

No caso de espécies de propagação assexuada, freqüentemente o tamanho convencional dos propágulos dificulta o tratamento mutagênico de um grande número de plantas. O cultivo *in vitro* não somente provê uma relativa uniformidade e maiores populações livres de doenças para a irradiação, senão também, micropropágulos que possibilita a irradiação de um maior número de explantes (Maluszynski et al., 1995).

No crisântemo, os trabalhos referidos ao cultivo *in vitro* relatam, principalmente, o uso de pequenos segmentos meristemáticos (Ben-Jaacov & Langhans, 1972; Earle & Langhans, 1974a, b), segmentos de folhas (Kaul et al., 1990; Latado et al., 1997), pétalas (Bush et al., 1976; Jong & Custer, 1986), caule (Kaul et al., 1990) e pedicelos (Roest & Bokelmann, 1975; Broertjes et al., 1976; Jong & Custer, 1986) para a posterior regeneração de plântulas.

A partir dos explantes, poderá ser induzida uma organogênese direta, isto é, a obtenção de plântulas sem prévia passagem pela fase de calos, ou organogênese indireta, em que a formação das estruturas foliares iniciará após a formação dos calos. O tipo de organogênese dependerá do uso de reguladores de crescimento e da concentração dos mesmo nos meios de cultura.

Constantin (1984) relatou as vantagens e limitações que resultam do uso das técnicas de cultura de tecidos associadas à indução de mutação. De fato, a variação somaclonal referida por muitos autores em diversas espécies de plantas é considerada uma das grandes limitações.

Variantes somaclonais surgem ocasionalmente da multiplicação clonal *in vitro* de algumas espécies.

Binns (1981) definiu as mudanças e/ou alterações observadas com relação à base genética das mesmas. Segundo ele, as mudanças fenotípicas que originam-se do processo de cultura de tecidos podem

ter uma base genética e portanto, serem transferidas por meio dos gametas. Tal estabilidade genética resulta de uma alteração permanente do genoma. Mas, a estabilidade fenotípica das plantas regeneradas pode não ser transmitida às progênes via propagação sexual; tais mudanças são ditas de alterações epigenéticas, e só poderão ser mantidas por meio da propagação clonal.

As mudanças induzidas podem ser influenciadas pelos subcultivos do material vegetativo, o período de tempo que as plantas permanecem no estado *in vitro*, pela influência do meio de cultura (natureza e concentração de fitohormônios) e o grau de diferenciação que os tecidos suportam em cultura (Dominguez, 1992).

Em trabalhos de Horn (1984), calos e células em suspensão de 5 diferentes clones de crisântemo foram irradiados; os mesmos tipos de explantes também foram tratados com EMS em outro tratamento. O autor relata a regeneração de plantas em todos os tratamentos, obtendo variantes de cor, forma da flor, tipo de crescimento e forma de folhas. Variantes quanto a sensibilidade à temperatura também foram selecionados. O autor, no entanto, admite a possibilidade de que os variantes obtidos tenham sido originados devido a mudanças epigenéticas.

Khalid et al. (1989), avaliaram os variantes fenotípicos obtidos por meio do subcultivo de plântulas regeneradas a partir de pétalas e folhas de crisântemo, observando variações na forma e na cor das flores em 4 variedades testadas. Em ambos explantes houve prévia formação de calos, ao mesmo tempo, algumas plantas foram regeneradas via organogênese direta. No entanto, devido à natureza quimérica dos materiais originais, os autores admitiram a possibilidade de que variantes para a cor da flor tenham surgido pelo rearranjo de camadas durante a rápida proliferação na cultura.

Em crisântemo, geralmente, os segmentos de pedicelos florais constituem o tipo de explante mais utilizado na regeneração de plantas *in vitro*. Roest & Bokelmann (1975) obtiveram centenas de

plantas regeneradas diretamente de pedicelos; uma alta homogeneidade foi observada entre elas, fato atribuído a uma maior organização celular dentro do explante utilizado do que em massas de calos.

A obtenção de mutantes sólidos em crisântemo por meio do tratamento de pedicelos florais jovens com mutagênicos físicos, seguido da obtenção de gemas adventícias *in vitro* tem sido relatada (Broertjes et al., 1976; Latado et al., 1996). A vantagem desta técnica é que dispensa a utilização de podas para a ampliação de setores.

Bowen (1965) utilizou os mutagênicos químicos EMS e EI (Etilenimina) em mudas de crisântemo, a resposta a estes mutagênicos foi baixa, desde então vários autores citam que os mutagênicos químicos não devem ser usados devido a sua baixa penetrabilidade nos tecidos, causando uma baixa repetibilidade experimental. Teoricamente, não deve existir esta restrição no caso de tratamento de pedicelos florais jovens com mutagênicos químicos, pois a origem das gemas adventícias se dá a partir de uma única célula da epiderme do explante.

Kaul et al. (1990), regeneraram plantas de crisântemo a partir de segmentos nodais e segmentos de folhas, observando uma regeneração direta dos explantes. Nenhuma variação fenotípica foi encontrada.

2.11 Melhoramento convencional

Os métodos de melhoramento convencional estão baseados na seleção individual das melhores plantas de uma população natural ou originada de cruzamentos e autofecundações. Para o logro efetivo dos objetivos do melhoramento é de muita utilidade conhecer a herança básica dos caracteres a serem melhorados. Em cultivos de plantas de propagação vegetativa o comportamento genético de tais caracteres não é muito conhecido (Donini & Micke, 1984).

A cor da flor é um caráter qualitativo, para o qual com relativa facilidade são selecionados fenótipos mutantes nas populações geradas. No entanto, a resistência a doenças, especificamente a resistência horizontal, é um caráter quantitativo cuja avaliação é mais difícil.

O nível de ploidia e a alta heterozigosidade nas espécies de propagação vegetativa causa uma herança complexa dos caracteres. Como consequência da heterozigosidade, autofecundações e cruzamentos entre variedades geram uma alta variabilidade, e novas recombinações genéticas freqüentemente causam a perda de características importantes das variedades originais (Donini & Micke, 1984; Broertjes & Van Harten, 1988).

O crisântemo comumente apresenta autoincompatibilidade, no entanto Broertjes & Van Harten (1988), relatam o melhoramento, por meio de cruzamentos, de caracteres tais como: produção, resistência a doenças e reação ao meio ambiente. Até o final da década do 50, um terço das variedades comerciais tinham sido originadas como mutantes somáticos espontâneos.

Segundo Hattori (1992), no crisântemo a autoincompatibilidade é do tipo esporofítica, controlada por mecanismos genéticos, os quais impedem o desenvolvimento do tubo polínico dentro do estigma dificultando a obtenção de sementes na geração seguinte proveniente de autofecundações. Esta é uma característica bastante freqüente em muitas outras espécies da família compositae.

2.12 Indução de mutações

Desde o início da agricultura, o uso de mutantes espontâneos superiores ao material original, tem sido utilizados pelos primeiros agricultores (Van Harten, 1982).

O uso de indução de mutações incrementa a variabilidade genética existente em populações homogêneas, seja pela exposição de células de plantas ou pelo tratamento de tecidos, órgãos ou mesmas plantas inteiras à ação de mutagênicos físicos ou químicos. Por meio do uso de métodos e técnicas eficientes na seleção de mutantes pode-se evidenciar uma maior frequência das alterações genéticas induzidas do que aquelas observadas via seleção fenotípica (Handro, 1981).

Detalhes sobre a metodologia utilizada na obtenção de mutantes em ornamentais podem ser vistos em revisões (Broertjes & Van Harten, 1988). Em resumo, observa-se que existem duas situações: na primeira, tratamentos mutagênicos são efetuados em plantas ou explantes em que estruturas multicelulares serão atingidas, como por exemplo ápices meristemáticos, gemas axilares ou embriões. No segundo caso, o tratamento é efetuado em estruturas unicelulares, que devido ao fenômeno da totipotência darão origem a novas plantas a partir de uma única célula.

A maior parte dos trabalhos desenvolvidos com o uso das mutações induzidas em crisântemo visa obter variantes fenotípicos quanto a cor e forma da flor.

Micke et al. (1990), numa revisão de trabalhos na área, revelam que o crisântemo é a espécie de ornamentais em que se obteve o maior número de cultivares por meio de mutagênese induzida (169) e que esta técnica é comumente utilizada por melhoristas em vários países.

Mudanças na coloração das inflorescências em crisântemo podem resultar tanto de mutações gênicas induzidas, como do rearranjo de camadas histogênicas em quimeras periclinais preexistentes. Como se trata de uma espécie poliplóide, o reconhecimento de mutações gênicas não é tão fácil se comparada com espécies diplóides. Isto sugere que aberrações cromossômicas sejam responsáveis, provavelmente, pelas mutações observadas,

principalmente quando são usados mutagênicos físicos (Dowrick & El Bayoumi, 1966b).

Stewart & Dermen (1970b), sugerem que a perda de um cromossomo carregando o gene dominante supressor para a formação do pigmento amarelo foi o causa das mudanças de cor em cultivares por eles estudadas.

Quanto aos diversos tipos de pigmentos encontrados em crisântemo, Stewart & Dermen (1970b), afirmam que a cor rosa das flores deve-se à concentração da antocianina nas células da camada L-I que dá origem à epiderme e a cor branca deve-se à total ausência da antocianina nas camadas superiores. Eles ainda sugerem que a origem dos gametas provêm da camada L-II.

Dowrick (1953), relata que a coloração das flores em crisântemo obedece à presença ou ausência de três pigmentos, antocianina solúvel, flavona solúvel e um pigmento plastídico insolúvel, encontrados usualmente em células nas camadas de células superior e inferior da epidermes das pétalas. No entanto, Bowen et al. (1962) (citado por Dowrick & El Bayoumi, 1966b) admitiram que diferenças em proporções relativas dos pigmentos podem alterar a cor das flores.

Kawase & Tsukamoto, citados por Hattori (1992), afirmaram que a coloração das flores em crisântemo depende principalmente da antocianina nos vacúolos da epidermes das pétalas e do carotenóide nos cromoplastídeos encontrados em todos os tecidos das pétalas. A proporção na quantidade das duas classes de pigmentos controla a cor na flor, segundo eles.

Langton (1980) estudou a herança genética do carotenóide em crisântemo por meio do cruzamento de diversas cultivares apresentando flores de cor branca, amarelo claro e amarelo escuro. Segundo ele, a segregação do carotenóide depende da ação de um único gene dominante I (inibidor). Para todas as variedades, ele determinou o tipo de pigmento que apresentavam as células tanto da camada L-I como L-II, reafirmando as hipóteses de outros autores sobre

a herança qualitativa do pigmento. Por meio das distintas segregações, ele observou que estas obedeciam à cor do pigmento apresentado pela camada L-II, concordando com a hipótese da ontogenia dos gametas apresentada por Stewart & Dermen (1970b). Aliada a estas observações, eles sugerem que em toda as análises da herança na cor das flores deve ser considerada a estrutura quimérica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos realizados envolvendo cultura de tecidos, foram conduzidos no Laboratório de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP - Piracicaba - SP. A seleção inicial do material, coleta de mudas, plantio dos tratamentos, avaliação e seleção de mutantes foram realizadas na Fazenda Irmãos Van Schaik da Cooperativa Holambra em Holambra, São Paulo.

Todos os experimentos nesta pesquisa foram conduzidos com o cultivar mutante 'Ingrid', de cor rosa escuro induzido a partir do cultivar 'Repin Rosa', relatado por Tulmann & Latado (1997).

Freqüentemente são encontradas plantas de diferentes cultivares evidenciadas pelas diversas cores das flores dentro das áreas de plantio comercial, por isso, uma seleção inicial na época do florescimento foi feita no campo, com o objetivo de se obter e propagar plantas representativas do cultivar. O material selecionado foi plantado e induzido ao crescimento vegetativo sob condições de fotoperíodo longo. Os ápices vegetativos, com aproximadamente 10 cm de comprimento, foram cortados e levados ao enraizamento. As mudas já enraizadas e plantadas em canteiros específicos, constituíram o matrizeiro do qual foram obtidas todas as mudas necessárias para os experimentos que fizeram parte deste trabalho e que serão descritos a seguir.

3.1 Desenvolvimento e uso de metodologia para tratamento *in vitro* de pedicelos com EMS

Este experimento que objetivou a determinação da metodologia para uso de tratamento de pedicelos *in vitro* com EMS, constou de várias etapas, descritas a seguir.

3.1.1 Determinação da sensibilidade de pedicelos florais jovens de crisântemo ao mutagênico químico EMS

Um ensaio inicial foi realizado no Laboratório de Radiogenética do CENA/USP com o objetivo de se determinar a sensibilidade ao EMS para o posterior uso da concentração adequada.

Plantas de crisântemo do cultivar 'Ingrid', cultivadas sob condições de fotoperíodo curto (9 horas de luz/15 horas de escuro), em estágio de botão floral imaturo, foram retiradas dos canteiros. Os pedicelos com aproximadamente 10 cm (sem retirar o botão floral), foram excisados e levados para o tratamento com o mutagênico químico EMS (metanossulfonato de etila).

Inicialmente, os pedicelos foram imersos por 30 segundos em solução de etanol a 80%, com objetivo de quebrar a tensão superficial e facilitar a ação do mutagênico. Os pedicelos foram imersos em solução aquosa de EMS por 1 hora e 45 minutos, seguido de lavagem em água corrente por 15 minutos. Os tratamentos testados eram compostos por diferentes concentrações do EMS na solução: 0, 0,05 e 0,1 M. Durante a imersão proporcionou-se aeração na solução mutagênica com o auxílio de um compressor de ar.

Além do controle em que não se utilizou mutagênico mas os pedicelos ficaram imersos em água por duas horas, um segundo controle foi usado sem a permanência dos explantes por duas horas em água. O

objetivo neste caso foi monitorar a qualidade dos explantes vindos do campo.

A assepsia foi realizada após o tratamento mutagênico e a lavagem com água corrente, consistindo na imersão dos pedicelos em solução composta de água destilada e água sanitária comercial (Q'Boa - 2% de cloro ativo) na proporção 3:1, por 10 minutos em constante agitação. A seguir, em câmara asséptica, os pedicelos foram lavados por 3 vezes em água destilada autoclavada para completar a desinfecção.

A porção mais próxima do botão floral (com aproximadamente 1,0 cm de comprimento) foi retirada, cortada longitudinalmente ao meio, com o auxílio de pinças e bisturi flambados, e colocada em contato com o meio de cultura (parte cortada para baixo). Nestas condições os explantes foram inoculados em meio de cultura semi-sólido. Num experimento preliminar foi determinado o meio de cultivo para o cultivar, especificamente quanto à concentração de auxinas e citocininas, assim o meio utilizado foi composto por sais e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 1 g/L de caseína hidrolizada, 30 g/L de sacarose, suplementado com 1,0 mg/L de BAP (6-Benzil Aminopurina) e 2,0 mg/L de AIA (Ácido Indolacético). O agente solidificante utilizado foi o phytigel (Sigma) com a adição de 2,0 g/L, e o pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do Phytigel. A esterilização do meio foi realizada em autoclave à 121 °C por 20 minutos.

Em câmara asséptica, o meio esterilizado foi vertido em placas de Petri de vidro, previamente esterilizadas em autoclave à 121 °C por 30 minutos.

As placas contendo os explantes foram mantidas no escuro à 27 ± 1 °C; após foram mantidas, na sala de crescimento, em condições de fotoperíodo de 16 horas de luz, intensidade luminosa de 16 W/m² e temperatura média de 27 ± 1 °C, durante um período de 30 dias após inoculação. Uma troca para meio fresco de igual composição foi realizada aos 15 dias após inoculação.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 20 repetições; cada tratamento composto por 20 placas de Petri (uma placa/repetição), cada placa contendo 3 pedicelos divididos longitudinalmente (6 metades de pedicelos). A avaliação foi realizada aos 40 dias, em função do número médio de plantas obtidas transferíveis (tamanho mínimo de 0,4 cm) no total de pedicelos avaliados.

A dose foi determinada segundo a curva de resposta gerada pelos dados obtidos, procurando-se uma redução aproximada do 50% do número de plantas regeneradas (LD_{50}).

3.1.2 Tratamento de pedicelos florais jovens de crisântemo com concentração previamente selecionada de EMS, seguido de obtenção de gemas adventícias *in vitro*

O experimento foi composto por um total de 1083 pedicelos florais jovens de crisântemo do cultivar 'Ingrid' tratados com EMS, além de 41 pedicelos não tratados, mas imersos em água (controle com duas horas em água, denominado 2H no trabalho), e 41 pedicelos sem nenhuma manipulação e tratamento prévio (controle sem água, denominado 0H no trabalho), na forma de quatro repetições.

Foram inoculados três pedicelos por placa de Petri, cada pedicelo com tamanho aproximado de 1 cm, dividido longitudinalmente em duas partes e inoculados com a face cortada em contato com o meio de cultura.

A razão da divisão do experimento em quatro repetições foi a necessidade de se evitar tratar uma grande quantidade de material e para se obter uma redução do tempo entre o tratamento e a inoculação. A manipulação, num curto período de tempo, de um grande número de explantes vindos do campo, poderia também ocasionar uma elevação nos níveis de contaminação e oxidação do material.

A concentração escolhida para o tratamento de pedicelos foi de 0,075M, sendo esta a que mais se aproximou da LD₅₀, isto é, a dose que causou uma redução média de 50% do número de plantas regeneradas.

Os métodos de tratamento com mutagênico, desinfecção, inoculação e cultivo *in vitro* de pedicelos foram semelhantes aos descritos no experimento anterior.

Após 30 dias da inoculação, as plantas que apresentaram o tamanho mínimo de 0,4 cm foram individualizadas e colocadas em meio para o enraizamento e desenvolvimento. Simultaneamente foi feita uma avaliação quanto ao número de plantas transferidas.

Nesta etapa, somente foram transferidas as plantas provenientes do tratamento com o mutagênico e as do controle com duas horas em água (2H).

Devido ao fato de que no momento da primeira avaliação e retirada de mudas, foram observadas plantas menores que 0,4 cm em desenvolvimento, realizou-se então uma segunda avaliação com relação ao número de plantas regeneradas, desta vez tendo em conta o material tratado e o controle 2H.

Após o período de organogênese no meio de indução (com reguladores de crescimento), as plantas foram transferidas para o meio de enraizamento e desenvolvimento, composto por sais e vitaminas de MS acrescido de 1 g/L de caseína hidrolizada e 30 g/L de sacarose. O agente solidificante utilizado foi o phytigel (Sigma) com a adição de 2,0 g/L, e o pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do phytigel. A esterilização do meio foi realizada em autoclave à 121 °C por 20 minutos.

Para facilitar o crescimento, foram colocadas 5 plantas por tubo de vidro, e mantidas em condições de fotoperíodo de 16 horas de luz, intensidade luminosa de 16 W/m² e temperatura média de 27 ± 1 °C, durante um período aproximado de 45 dias após a inoculação. A duração deste período esteve sujeita ao desenvolvimento radicular e da parte

aérea necessárias para se atingir altura entre 8 - 10 cm, considerando como adequada para a próxima etapa.

A aclimatização consistiu na etapa final da metodologia *in vitro*, necessária para a readaptação das mudas vindas do meio de cultura. As plantas foram retiradas do meio de cultura, lavadas com água corrente e plantadas em bandejas contendo vermiculita autoclavada. As bandejas foram mantidas sob alta umidade com o uso do umificador, por um período de uma semana. Após este período as plantas foram sendo gradualmente adaptadas a um ambiente de menor umidade. Posteriormente as plantas foram colocadas em casa de vegetação e sob sombreamento, por uma semana, tendo em conta um acréscimo gradual de luminosidade. Após este período, as plantas foram colocadas em estufas sob condições ambientais de umidade, luz e temperatura.

Dada a contínua regeneração de plantas por um longo período de tempo, quando atingiam o estado ideal, eram aclimatizadas e colocadas em condições de fotoperíodo longo para induzir o desenvolvimento vegetativo, para isto foram colocadas em câmaras de crescimento com luz suplementar.

Devido ao curto espaço de tempo para a conclusão do experimento, as plantas foram plantadas em vasos de alumínio e induzidas ao florescimento sob fotoperíodo curto, em tempo menor ao comumente praticado para o cultivo comercial, uma vez que o principal interesse deste trabalho era avaliação de mutações na cor, forma ou tamanho da flor.

A avaliação foi feita quanto ao número de mutantes, espectro de mutação e tipo de mutantes (sólidos ou com setores mutados).

3.2 Uso das podas repetidas em ápices meristemáticos e internódios após irradiação *in vitro* com raios-gama, visando-se indução de mutação

Este experimento foi realizado visando-se analisar a frequência de mutantes e tamanho do setor mutado avaliados no florescimento em plantas de diversas gerações obtidas após a aplicação do método das podas repetidas *in vitro* em ápices meristemáticos e internódios irradiados com raios-gama.

As plantas matrizes foram cedidas pela empresa Irmãos Van Shaik. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Radiogenética do CENA/USP.

A primeira fase consistiu na introdução de plantas da condição *in vivo* ao cultivo *in vitro* e a posterior propagação para a obtenção do número suficiente de material vegetal para os experimentos posteriores.

Os ápices meristemáticos como também segmentos do caule contendo gemas axilares de plantas provenientes do matrizeiro, foram desinfetados com solução de água sanitária comercial (a base de hipoclorito de sódio), na proporção de 1:3 de água destilada, lavados por 3 vezes com água destilada autoclavada e inoculados em meio semi-sólido, composto por sais básicos (macro e micronutrientes) e vitaminas do meio MS acrescido de 1 g/L de caseína hidrolizada, 30 g/L de sacarose, e solidificado com 2 g/L de phytigel. O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do phytigel. O meio de cultura foi vertido em tubos de ensaios que foram autoclavados à 121 °C por 20 minutos para sua esterilização.

Os ápices foram inoculados em câmara asséptica e levados à sala de crescimento onde foram mantidos em condições de fotoperíodo de 16 horas de luz, intensidade luminosa de 16 W/m² e temperatura média de 27 ± 1 °C, por aproximadamente um mês. Este período é suficiente para

que as plantas *in vitro* apresentem um bom crescimento vegetativo e possam ser utilizadas para as etapas seguintes.

3.2.1 Determinação da sensibilidade de plantas *in vitro* a raios-gama

A determinação da radiosensibilidade é uma das etapas preliminares nos trabalhos com indução de mutação. Este experimento foi realizado com o objetivo de se determinar a dose adequada de irradiação a ser utilizada em plantas cultivadas *in vitro*.

Para iniciar o experimento, retiraram-se os ápices meristemáticos de plantas cultivadas *in vitro*, que foram inoculados em meio contendo os mesmos componentes nutritivos e concentrações utilizadas na fase anterior. A preparação do meio de cultura e a manutenção dos materiais na câmara de crescimento, seguiu o procedimento descrito anteriormente.

Para a determinação da sensibilidade, as plantas desenvolvidas *in vitro* após um período aproximado de 15 dias e contendo aproximadamente seis gemas axilares, foram tratadas na fonte de raios-gama de ^{60}Co do CENA; as bases dos explantes foram protegidas com cilindros de ferro para se evitar o efeito fisiológico da irradiação nas raízes. As doses de raios gama utilizadas foram: 0 (testemunha), 5; 10; 15; 20; 25; e 30 Gy. Utilizou-se uma taxa de dose de 254 Gy/h. Imediatamente após o tratamento mutagênico, procedeu-se a medida e marcação no tubo de ensaio da altura das plantas. A seguir, as plantas foram levadas à sala de crescimento, sob as mesmas condições de luz e temperatura antes mencionadas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 7 tratamentos (doses de raios gama) e 19 repetições (um internódio/repetição), perfazendo um total de 140 internódios (um internódio/tubo, 19 tubos/tratamento).

A determinação da radiosensitividade foi feita em função da variação da altura de plantas (altura final menos altura inicial ao irradiar) medida 30 dias após a irradiação.

A dose foi determinada levando-se em conta uma redução aproximada da altura média das plantas em 50% (GR_{50}). Os dados sobre altura de plantas não foram transformados. A dose escolhida foi utilizada no experimento definitivo.

3.2.2 Irradiação de plantas com a dose de raios-gama escolhida, avanço de gerações *in vitro* com o método das podas repetidas e seleção de mutantes no florescimento

Seguiu-se o mesmo procedimento anterior quanto à preparação do material e os meios de cultura. O experimento foi iniciado com a irradiação de 21 tubos contendo cinco plantas por tubo, perfazendo um total de 105 plantas *in vitro*. O controle foi composto de 15 plantas (3 tubos, 5 plantas/tubo).

As plantas foram irradiadas com 22,5 Gy, sob uma taxa de dose de 254 Gy/h, sendo esta a dose escolhida no teste de radiosensitividade descrito anteriormente. Foi necessária a proteção das raízes com cilindros de ferro.

Imediatamente após a irradiação, retirou-se o ápice meristemático e aproximadamente dois internódios de cada planta que foram inoculados em tubos contendo meio de enraizamento e desenvolvimento. A seguir, os materiais inoculados foram levadas à sala de crescimento sob as mesmas condições de luz e temperatura do experimento anterior. Estes 105 ápices constituíram posteriormente, um total de 105 plantas denominadas M_1V_1 -meristema apical. Estas foram aclimatadas, levadas ao campo, e deixadas para florescer, visando-se a seleção de mutantes na coloração das pétalas.

A partir dos internódios induziu-se o desenvolvimento das gemas axilares e após determinado crescimento (± 10 cm), retirou-se de cada planta o ápice e aproximadamente dois internódios, logo inoculados em meio para o enraizamento e desenvolvimento. O desenvolvimento das plantas obtidas por meio do ápice destas gemas axilares irradiadas, constituiu a população de plantas denominada M_1V_1 -gema axilar. Os dois internódios retirados de cada planta resultaram, após o desenvolvimento, na população de plantas, denominada M_1V_2 . Desta população de plantas M_1V_2 foram retirados os ápices meristemáticos e mais dois internódios aproximadamente. O desenvolvimento vegetativo dos internódios constituiu a população de plantas M_1V_3 .

O corte dos internódios, em todas as fases, foi feito na maneira de se obter os segmentos vegetativos mais novos, isto é, foram aproveitados os segmentos internodais superiores das plantas, eliminando-se os mais velhos. Desde o início do avanço das gerações *in vitro*, foram retirados de 2 a 3 internódios de cada planta.

A Figura 2 mostra o procedimento seguido para a realização das podas.

Todas as populações de plantas de cada geração após o desenvolvimento *in vitro* seguiram o mesmo procedimento quanto à aclimatização, plantio, cultivo e avaliação da frequência de mutantes e tamanho do setor mutado no estágio de florescimento. A aclimatização de todas as plantas consistiu no plantio em bandejas contendo vermiculita autoclavada, sob alta umidade na primeira semana; na segunda semana, a umidade relativa foi gradativamente reduzida e, posteriormente, sob ambiente de luz natural plena, em casa de vegetação, respeitando a gradualidade nestas etapas.

A cada geração obtida do material tratado foram obtidas também as plantas testemunhas, seguindo os mesmos procedimentos e após o enraizamento e desenvolvimento, as plantas foram aclimatadas e levadas ao campo para a avaliação junto com o material tratado.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. A avaliação dos dados foi baseada na frequência (%) dos valores obtidos para efeitos de comparação, uma vez que somente uma repetição foi realizada para cada geração.

Mutantes de interesse foram selecionados e multiplicados na casa de vegetação do Laboratório de Radiogenética.

Figura 2 - Procedimento seguido para a realização das podas repetidas e o avanço das gerações *in vitro*.

3.3 Determinação da freqüência de mutantes e tamanho do setor mutado *in vivo* em mudas enraizadas irradiadas

Este experimento foi realizado com o objetivo de se comparar a freqüência de mutantes e o tamanho do setor mutado entre plantas das gerações M_1V_1 -meristema apical, M_1V_1 -gema axilar, M_1V_2 e M_1V_3 , obtidas pelo método das podas repetidas em planta irradiadas e propagadas *in vivo*, com o experimento realizado *in vitro*, descrito anteriormente.

A metodologia utilizada no experimento *in vivo* foi realizada de maneira a seguir certa semelhança à metodologia adotada no experimento *in vitro* (3.2.2), quanto ao avanço de gerações, levando em conta certas modificações.

Foram retirados do matrizeiro os ápices meristemáticos de crisântemo do cultivar 'Ingrid' (± 10 cm de comprimento) e induzidos ao enraizamento na empresa Irmãos Van Shaik. Um total de 500 mudas enraizadas, com aproximadamente seis gemas axilares, foram irradiadas com 20 Gy, com taxa de dose de 259 Gy/h, na fonte de irradiação de ^{60}Co do CENA. Para se evitar danos nas raízes, a base das mudas foram protegidas com cilindros de ferro. A dose utilizada neste experimento correspondeu a mesma dose utilizada em outros trabalhos realizados no Laboratório de Radiogenética com o cultivar 'Repin Rosa', do qual foi obtido o cultivar mutante 'Ingrid'. Esta dose reduz em cerca de 50% a altura das plantas da geração M_1V_1 (Latado, 1993).

Para a indução ao enraizamento dos ápices foi utilizado um tipo de auxina veiculado em talco, inserindo-se neste a parte basal do ápice cortado. Após o tratamento com o hormônio, os ápices foram plantados em canteiros localizados em estufas, contendo um substrato à base de casca de arroz calcinada e esterilizada. Um período de duas semanas foi requerido para o enraizamento apropriado das mudas. Estas mudas foram plantadas em estufas, em matrizeiros comerciais, submetidas a fotoperíodo longo para o crescimento vegetativo (16 horas

luz/8 horas de escuro). Junto com o material tratado, foram plantadas 50 mudas enraizadas representando o material controle.

Após um mês do plantio, foram retirados os ápices meristemáticos de todas as plantas; a poda consistiu no corte de um segmento de 10 cm do ápice, sendo levados ao enraizamento, obtendo-se após este período, aproximadamente 500 mudas enraizadas que constituíram a geração M_1V_1 -meristema apical, as quais foram plantadas no campo. A frequência de mutantes e tamanho do setor mutado foi avaliada no florescimento, além da seleção de mutantes.

A poda do ápice meristemático permitiu a quebra da dominância apical e por conseguinte, a brotação das gemas axilares até então dormentes.

Os ramos desenvolvidos das gemas axilares irradiadas foram denominados de M_1V_1 -gema axilar, pois se originaram de gemas axilares que estavam presentes no momento da irradiação. Os ramos M_1V_1 obtidos com o desenvolvimento destas gemas foram podados; o enraizamento dos ápices meristemáticos podados formaram a população de plantas M_1V_1 -gema axilar. Os ramos após a poda, permitiram o desenvolvimento de ramificações M_1V_2 ; estas foram podadas, os ápices foram enraizados e plantados para a avaliação posterior. Os ramos M_1V_2 , após a poda, permitiram o desenvolvimento de ramificações M_1V_3 as quais foram podadas, os ápices enraizados e plantados.

Antes de cada poda das novas ramificações surgidas, foi feita a poda dos "ramos ladrões", isto é, a retirada dos ramos situados na região inferior da planta e que não se originaram diretamente dos ramos podados anteriormente.

As podas foram feitas quando os ramos atingiam de 15 a 20 cm, na prática corresponderam a um intervalo de tempo de 20 a 25 dias.

A Figura 3 mostra o procedimento seguido para a realização das podas.

Figura 3 - Procedimento seguido para a realização das podas repetidas e o avanço das gerações *in vivo*.

Para facilitar a condução das ramificações nas várias gerações, permitiu-se o desenvolvimento de dois ramos na segunda geração e três ramos na terceira e quarta geração, por planta. A cada poda, os ápices colhidos formavam a população de plantas da geração respectiva, as quais seguiram o mesmo procedimento de indução ao enraizamento, plantio e avaliação da frequência de mutantes e tamanho do setor mutado no estágio de florescimento .

A cada poda do material tratado foram podadas as plantas testemunhas, seguindo o mesmo procedimento de indução de enraizamento, plantio no campo e avaliação no florescimento.

Em todos os experimentos as mudas obtidas foram plantadas em canteiros medindo 1,20 m de largura com espaçamento de 10 cm entre plantas. Todas as mudas obtidas em todas as gerações foram submetidas inicialmente ao fotoperíodo longo e posteriormente ao fotoperíodo curto, seguindo os mesmos procedimentos do cultivo comercial.

Após a avaliação, alguns mutantes de interesse foram selecionados e multiplicados na casa de vegetação do Laboratório de Radiogenética.

3.4 Determinação da frequência de mutantes em plantas da geração M_1V_2 obtidas de gemas axilares de distintas posições ao longo de plantas da geração M_1V_1 originadas da irradiação de plantas *in vivo*

Este experimento teve como objetivo comparar a frequência de mutantes e tamanho do setor mutado (como se denominou a proporção entre a coloração original e nova coloração na mesma inflorescência), em plantas obtidas pelo método de podas repetidas em plantas irradiadas *in vivo*. As podas foram realizadas em distintas

posições ao longo do caule M_1V_1 , obtido após a irradiação com raios-gama.

Foram retirados do matrizeiro os ápices meristemáticos de crisântemo da cultivar 'Ingrid' (± 10 cm de comprimento) e induzidos ao enraizamento na empresa Irmãos Van Shaik. Um total de 3200 mudas enraizadas, divididas em três repetições, foram irradiadas com 20 Gy, com uma taxa de dose de 238 Gy/h, na fonte de irradiação de ^{60}Co do CENA. Para se evitar danos nas raízes, a base das mudas foram protegidas com cilindros de ferro.

Inicialmente, antes da irradiação foram selecionadas mudas que tivessem no mínimo seis gemas axilares.

Antes do tratamento com o mutagênico, a última folha (folha mais nova) de cada muda foi cortada pela metade, servindo como marcador para o manejo futuro do crescimento surgido após irradiação. Acompanhando o material tratado, foram colhidas e enraizadas um total de 400 mudas como material controle, divididas em três repetições.

Após a irradiação, as mudas foram levadas ao campo, plantadas em estufas onde foram submetidas a fotoperíodo longo para induzir o crescimento vegetativo. Cada repetição, após o crescimento das plantas M_1V_1 , foi dividida em seis grupos de 166 plantas cada. A poda das plantas foi iniciada quando foi visualizado o aparecimento das seis gemas axilares acima da folha marcada, ao longo do caule; isto ocorreu num tempo aproximado de 40 dias do plantio.

No primeiro grupo de plantas foi feita uma poda acima da folha inicialmente cortada (folha marcada). A poda permitiu o desenvolvimento da gema axilar correspondente à primeira folha, por conseguinte foi denominada como a primeira gema axilar (T1). No segundo grupo de plantas, a poda foi feita na altura da segunda gema axilar (T2) (primeira folha acima da folha marcada). Assim sucessivamente o processo foi realizado até completar o último grupo, onde foi feita a poda na altura da sexta gema axilar (T6), isto é, cinco folhas acima da folha marcada. Desta forma formaram-se os seis grupos de plantas que constituíram os seis tratamentos.

O motivo de se escolher as seis gemas axilares subsequentes da geração M_1V_1 para a realização das podas deve-se à filotaxia do crisântemo, procurando-se explorar gemas axilares de modo a cobrir-se gemas localizadas nas várias posições ao longo do ramo.

A poda induziu a quebra da dominância apical na planta, assim as gemas axilares, até então dormentes desenvolveram novas ramificações denominadas de M_1V_2 . No decorrer do experimento só foi permitido o desenvolvimento vegetativo de uma gema axilar, a da folha mais superior. Periodicamente foram removidos os ramos ladrões.

Os ramos desenvolvidos (M_1V_2) formaram a geração de plantas, as quais foram cultivadas sob as mesmas condições do cultivo comercial. A seleção de mutantes e a avaliação quanto a frequência de mutantes foi realizada no florescimento.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com seis tratamentos e três repetições. Os controles, por terem menor número de plantas, foram plantadas à parte e não incluídos na análise.

Para efeito da análise estatística, os dados da variável número de plantas mutantes e número de plantas com distintos tamanhos dos setores mutados foram transformados pela equação $(x + 0,5)^{0,5}$.

A Figura 4 mostra o procedimento seguido para a realização das podas em distintas posições do caule M_1V_1 .

Figura 4 - Procedimento seguido para a realização das podas em distintas posições do caule M₁V₁, obtido após irradiação de plantas com raios-gama.

3.5 Ensaio de produção e estabilidade da cor dos mutantes selecionados

A partir da avaliação dos experimentos relatados anteriormente, vários mutantes foram observados. Juntamente com o produtor da Cooperativa Holambra, foram selecionados dentre eles, os que poderiam ter um possível interesse comercial. Destacaram-se neste caso quatro mutantes com as seguintes colorações de inflorescência: bronze, chá-rosa, vinho e variegado. O mutante vinho foi caracterizado pela cor das pétalas semelhante à cor de vinho tinto. O mutante variegado caracterizou-se pela cor rosa claro do fundo das pétalas com listas bronzeadas. Tais mutantes foram levados para a casa de vegetação do Laboratório de Radiogenética do CENA para a propagação visando-se a realização de ensaio de produção e observação da estabilidade da cor. A propagação foi realizada por meio do enraizamento de internódios das plantas mutantes, contendo gemas axilares. As mudas obtidas destes internódios foram plantadas sob condição de fotoperíodo longo, realizando-se sucessivas podas nestas matrizes para forçamento da brotação das gemas axilares de modo de ser possível a obtenção de um número significativo de ápices de cada mutante. Após este procedimento foram colhidos aproximadamente 200 ápices meristemáticos de cada mutante que foram induzidos ao enraizamento.

Após o enraizamento, foi instalado no campo o experimento com cinco tratamentos (mutante de cor bronze, chá-rosa, vinho, variegado e o cultivar original 'Ingrid' de cor rosa escuro, como testemunha). O delineamento utilizado foi blocos ao acaso com 4 repetições e cinco tratamentos, cada parcela contendo 50 plantas.

As mudas foram plantadas em canteiros seguindo as mesmas características do cultivo comercial com relação ao espaçamento, fotoperíodo, irrigação, adubação e manejo fitossanitário.

A avaliação foi feita no florescimento, baseada no número de dias para o ciclo (do plantio até a colheita), altura média das plantas, o número de flores abertas e o peso fresco. Para tal seguiu-se os procedimentos normais da colheita comercial, assim foi realizada a colheita formando-se maços de 10 plantas com 90 cm para se obter o peso fresco e contagem do número de flores abertas.

Todos os mutantes foram submetidos ao teste de durabilidade junto com o material controle. Os maços foram colocados em recipientes com água, tendo-se o cuidado de limpar as folhas da parte basal dos maços e a troca de água a cada três dias, conforme os parâmetros seguidos pela empresa. O início do amarelecimento das folhas indicou a durabilidade dos tratamentos.

Para a análise estatística, os dados não foram transformados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento e uso de metodologia para tratamento *in vitro* de pedicelos com EMS

4.1.1 Determinação da sensibilidade de pedicelos florais jovens de crisântemo ao mutagênico químico EMS

O efeito das concentrações testadas de EMS redução da capacidade de regeneração de plantas a partir dos pedicelos via organogênese somática constituiu-se no parâmetro determinado para a escolha da concentração do mutagênico.

Na Tabela 1 estão citados os dados de plantas regeneradas, número de pedicelos avaliados não contaminados e o número de plantas por pedicelo. Os dados do controle com duas horas em água (2H) foram considerados como 100% para efeito de comparação com os tratamentos com EMS.

Pelos dados obtidos, observa-se que houve diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. O tratamento controle sem água (0H) foi conduzido com o objetivo de verificar um possível efeito da água na redução da capacidade de regeneração dos pedicelos. Este efeito foi observado como verifica-se pela média comparada com o controle com água (2H).

Tabela 1. Avaliação das plantas regeneradas após o tratamento de pedicelos *in vitro* com EMS ⁽¹⁾.

Tratamentos	Número de		média de plantas por pedicelo
	plantas regeneradas	pedicelos avaliados	
Controle 0H (sem água)	279	59	4,742 a
Controle 2H (duas horas em água)	182	57	3,193 b (100%)
EMS [0,05 M]	116	59	1,958 bc (61,3%)
EMS [0,1 M]	81	59	1,367 c (42,8%)
F			17,991**
C.V. (%)			55,98

⁽¹⁾ tratamento efetuado por uma hora e quarenta e cinco minutos, seguido por lavagem em água por 15 minutos.

* 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%.

Considerando-se o número de plantas do tratamento sem água (0H) como 100%, observa-se uma redução de mais do 32,7% no tratamento com água (2H), o que indica um efeito negativo da hidratação dos pedicelos, que foi traduzido numa menor capacidade de formação de gemas adventícias e a conseqüente formação de plantas.

Com relação ao tratamento controle com duas horas em água (2H), o tratamento com o EMS a 0,1 M, mostrou ser uma concentração alta, diminuindo em 57,2% o número de plantas regeneradas; no entanto, a concentração a 0,05M foi relativamente baixa, diminuindo em 38,7% o número de plantas.

A Figura 5 representa graficamente o comportamento dos valores médios de plantas regeneradas por pedicelo dos quatro tratamentos, observando-se uma queda acentuada no tratamento onde foi utilizada uma maior concentração do EMS.

Neste experimento visou-se escolher uma concentração do mutagênico químico capaz de reduzir cerca de 50% o número de plantas regeneradas em relação ao controle com duas horas de água (2H); para tal foi escolhida a concentração de 0,075 M, intermediária entre as concentrações de 0,05 e 0,1 M testadas e que causaram redução de 57,2% e 38,7%, respectivamente.

Na Figura 6 observa-se a regeneração de plantas a partir dos pedicelos.

O EMS é um dos mutagênicos químicos mais amplamente utilizados em estudos de mutações induzidas em plantas (Fujii & Tano, 1986), no entanto seu uso tem-se limitado ao tratamento de sementes em plantas de propagação sexuada, devido à pouca penetrabilidade nos tecidos lenhosos em plantas de propagação vegetativa. Devido à esta dificuldade é que a alternativa de tratamento *in vitro* tem se mostrado de interesse (Constantin, 1984).

Para citar as concentrações quando os mutagênicos químicos são utilizados em trabalhos de indução de mutação, na literatura freqüentemente se expressam os valores em porcentagem (v/v); no presente trabalho a concentração do mutagênico é dada pela molaridade, no entanto a dose 0,1 M corresponde a 1,24% e 0,05 M a 0,62%.

As concentrações freqüentemente utilizadas nos trabalhos variam de 0,05 a 0,2% de EMS (Fujii & Tano, 1986). Ichikawa et al. 1990, utilizaram concentrações do mesmo mutagênico de 0,1 até 0,5% na indução de mutações somáticas em *Tradescantia*, utilizando metodologias *in vivo* no tratamento de inflorescências no estágio de botões florais. Eles trataram as inflorescências em diferentes tempos de duração (de duas até 16 horas) observando um incremento nos eventos

mutacionais a medida que as concentrações e os tempos de tratamento aumentavam.

Figura 5 - Valores médios do número de plantas regeneradas por pedicelo após tratamento com EMS por uma hora e quarenta e cinco minutos e 15 minutos de lavagem em água.

controle 0H = controle sem tratamento com água.

controle 2H = controle em duas horas em água.

Figura 6 - Foto ilustrativa da regeneração de plantas *in vitro* a partir de pedicelos florais imaturos sem tratamento com água (A), em duas hora em água (B), tratados com 0,05 M de EMS (C) e tratados 0,1 M de EMS (D).

Em plantas de propagação vegetativa, Sharma et al. 1983, relatam o uso *in vivo* de EMS em gemas de *Mangifera indica* que foram posteriormente enxertadas. Eles utilizaram concentrações variando de 0,5 até 1,5%, por um período de 13 horas e a escolha foi baseada na sobrevivência das gemas. Eles verificaram observações semelhantes quanto ao espectro de mutação quando compararam os resultados obtidos com plantas irradiadas.

Horn (1984), submergiu calos de crisântemo em solução de EMS, com concentrações variando de 0,5 a 1,5% por duas horas.

Latado (1993) realizou um teste de radiosensibilidade de pedicelos de crisântemo e obteve 1,22 mudas regeneradas por pedicelo não tratado. Estes valores são significativamente menores quando comparados com os obtidos no presente trabalho nas mesmas condições (controle sem água (0H) = 4,742).

Neste experimento foi demonstrado uma clara relação entre o número de plantas regeneradas via organogênese direta e as concentrações de EMS utilizadas. Este parâmetro foi considerado para a determinação da concentração que foi utilizada no cultivar 'Ingrid' no experimento visando-se usar esta metodologia.

4.1.2 Tratamento de pedicelos florais jovens de crisântemo com concentração previamente selecionada de EMS, seguido de obtenção de gemas adventícias *in vitro*

A determinação da concentração no experimento anterior (0,075 M por uma hora e quarenta e cinco minutos), serviu de base para o início do experimento definitivo do tratamento com EMS de pedicelos do cultivar 'Ingrid', objetivando-se o uso deste mutagênico *in vitro* e a obtenção de mutantes via indução de gemas adventícias.

A Tabela 2 mostra o número de plantas transferíveis por pedicelo avaliado em cada etapa, bem como a média geral por tratamento e a porcentagem correspondente à testemunha em duas horas com água (2H) e ao tratamento com a concentração escolhida do mutagênico EMS. Esta avaliação foi feita aos 30 dias após o tratamento e inoculação dos explantes nos meios de cultura.

Um total de 1329 pedicelos foi utilizado no experimento, sendo 1083 pedicelos tratados com 0,075 M de EMS, 123 pedicelos como testemunha sem água (0H) e 123 pedicelos como testemunha com duas horas em água (2H). De um total de 1329 pedicelos inoculados, somente 876 foram avaliados, correspondendo 687 pedicelos tratados com EMS, 105 testemunha sem água (0H) e 84 testemunha com duas horas em água (2H). Uma alta contaminação com fungos e bactérias nas primeiras repetições, reduziu o número de pedicelos avaliados.

Pelos dados obtidos observa-se que com relação ao controle sem água (0H), manteve-se uma redução quanto ao número de plantas regeneradas nos dois tratamentos conforme aconteceu no ensaio preliminar. Considerando-se a testemunha em água (2H) como 100%, verifica-se que a concentração de 0,075 M de EMS reduziu em 25,8%, a porcentagem de mudas obtidas; uma redução menor que a esperada baseando-se no experimento preliminar.

A testemunha sem água (0H), como no ensaio anterior, foi conduzida para monitorar os explantes e observar o efeito da hidratação dos mesmos sobre a capacidade de organogênese e a conseqüente formação de plantas. Novamente foi observado tal efeito na redução do número de plantas obtidas devido possivelmente à reduzida oxigenação das células bem como a hidratação propriamente dita. Somente as plantas provenientes da testemunha com duas horas em água (2H) e do tratamento com EMS foram transferidas para o meio de enraizamento, posteriormente aclimatadas e plantadas no campo para a avaliação na etapa do florescimento.

As quatro repetições do experimento foram consideradas como etapas, já que foram realizadas em tempos diferentes, dado ao

grande número de pedicelos tratados. As etapas foram realizadas com intervalos de aproximadamente de 15 dias.

Tabela 2. Valores médios do número de plantas transferíveis por pedicelo tratado *in vitro* com EMS por uma hora e quarenta e cinco minutos e 15 minutos de lavagem em água, 4 nas diferentes etapas do experimento. Avaliação feita 30 dias após a inoculação.

Tratamentos	Etapas ⁽¹⁾				Média
	1	2	3	4	
Controle 0H (sem água)	4,370	3,778	9,667	6,400	6,053
Controle 2H (2 horas em água)	1,812	1,767	3,259	4,629	2,866 (100%)
EMS [0,075 M]	1,960	1,080	2,140	3,329	2,127 (74,2%)

⁽¹⁾ etapa: cada intervalo de 15 dias em que foram realizados os tratamentos dos pedicelos.

Nas primeiras etapas o trabalho foi afetado no que se referiu ao tempo de inoculação dos pedicelos já tratados nas placas de Petri contendo o meio de cultura; isto causou uma maior oxidação dos pedicelos e maior contaminação posterior, principalmente nos pedicelos tratados com EMS devido ao grande número de explantes tratados em cada etapa. Tal oxidação não foi observada entre os explantes dos tratamentos testemunhas sem água (0H) e duas horas em água (2H) devido ao curto espaço de tempo requerido para realizar as etapas de assepsia e inoculação dos explantes.

Como pode-se observar na Tabela 2, os dados relacionados ao número médio de plantas regeneradas nos três tratamentos e nas

quatro etapas do experimento mostra um incremento contínuo. Com o tempo, foi se otimizando o procedimento, logrando-se uma queda acentuada no tempo entre a assepsia e a inoculação dos explantes, isto poderia ser uma explicação para o fato de se obter em cada etapa um número maior de plantas por pedicelo no tratamento com EMS; esta afirmativa é válida também quando se compara estes valores com as médias obtidas no teste de sensibilidade dos pedicelos para a escolha da concentração, observando-se um aumento da média do experimento com relação ao teste anterior.

A Figura 7 ilustra graficamente o aumento contínuo do número médio de plantas por pedicelo.

É importante ressaltar que a concentração de AIA (2 mg/L) e BAP (1 mg/L) utilizada neste experimento proporcionou uma maior regeneração de plantas por pedicelo não tratado (6,05) do que em outros trabalhos. Latado et al. (1996) que obtiveram em média 4,52 plantas por pedicelo não irradiado, utilizando 0,5mg/L de AIA e 2 mg/L de BAP no cultivar 'Repin Rosa' do qual foi obtida, por indução de mutação, o cultivar mutante 'Ingrid'. Quando o pedicelo foi irradiado com a dose escolhida (8 Gy), a regeneração de plantas foi reduzida a 3,30, contrastando com o valor obtido de 2,13 no presente trabalho em que foi utilizado a concentração de EMS (0,075 M). A comparação é válida já que em ambos trabalhos o tempo de avaliação foi de 30 dias.

Roest & Bokelmann (1975) induziram organogênese somática em duas cultivares de crisântemo, 'Super Yellow' e 'Bravo', utilizando como explantes o pedicelo de plantas em estágio de botão floral. Na cultivar 'Super Yellow', a concentração de 1,0 mg/L de BAP e 0,01 mg/L de AIA permitiu a maior regeneração, obtendo em média de 11,3 plantas por pedicelo; na cultivar 'Bravo', o meio contendo 1,0 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de AIA, proporcionou a maior regeneração, sendo este valor de 2,6 plantas por pedicelo. Os autores realizaram as avaliações 80 dias após inoculação.

Estas comparações são importantes e justificam a realização de teste de meios de cultura para todo e qualquer cultivar em que se pretenda fazer trabalhos de mutagênese *in vitro*.

Figura 7 - Número de plantas regeneradas por pedicelo tratado *in vitro* com EMS, avaliadas 30 dias após a inoculação nas 4 diferentes etapas (intervalo de 15 dias entre cada inoculação).

Uma ampla dispersão dos dados impediu uma análise da variância e, conseqüentemente, das médias de maneira a se poder demonstrar as diferenças significativas entre os tratamentos; mesmo quando os dados foram transformados, o coeficiente de variação mostrou-se muito alto.

Devido ao fato das plantas terem sido transferidas quando apresentavam um tamanho aproximado de 0,4 cm, observou-se que plantas de menor tamanho presentes no momento da avaliação e da transferência, desenvolviam-se após certo tempo no mesmo meio de

cultura. Com a finalidade de se obter o maior número de plantas tratadas, determinou-se fazer uma segunda avaliação e transferência de plantas 10 dias após a primeira avaliação; no entanto, esta última somente levou em conta os tratamentos controle em duas horas com água (2H) e o material tratado com EMS.

Os dados na Tabela 3 mostram o resultado das duas avaliações tendo em conta o valores totais de plantas transferidas e do número de pedicelos avaliados para cada tratamento.

Tabela 3. Número de pedicelos, número de plantas, valores médios e porcentagem correspondente à testemunha com duas horas em água (2H) e ao tratamento com 0,075 M de EMS por uma hora e quarenta e cinco minutos com 15 minutos de lavagem em água, nas 4 diferentes etapas avaliados 40 dias após inoculação.

	Controle 2H (2 horas em água)					EMS [0,075 M]				
	1	2	3	4	Total	1	2	3	4	Total
Nº de pedicelos	21	9	27	27	84	75	113	227	272	687
Nº de plantas	45	20	143	190	398	229	216	755	1472	2612
Média de plantas/ pedicelo	2,1	2,2	5,3	7,0	4,74 (100%)	3,1	1,9	3,3	5,4	3,8 (80,2%)

Na Figura 8 observa-se a projeção dos dados quanto ao número de plantas regeneradas avaliadas aos 40 dias.

Durante a transferência e repicagem das plantas para o meio de enraizamento e desenvolvimento, provenientes dos pedicelos tratados com EMS, observaram-se, em algumas delas, anormalidades do tipo fasciação.

Figura 8-Número de plantas regeneradas por pedicelo correspondente à testemunha com duas horas em água (2H) e ao tratamento com 0,075 M de EMS por uma hora e quarenta e cinco minutos com 15 minutos de lavagem em água avaliadas 40 dias após a inoculação nas 4 diferentes etapas (intervalo de 15 dias entre cada inoculação).

As plantas *in vitro* ao atingirem uma altura aproximada de 10 cm e um adequado desenvolvimento radicular foram aclimatizadas; esta fase foi realizada quando se constituíam lotes de aproximadamente 300 plantas. Após esta fase eram plantadas no campo para posterior avaliação de mutantes no florescimento.

Os resultados apresentados na Tabela 4 quanto ao espectro de mutação referem-se aos primeiros grupos de plantas avaliados pois, como explicado anteriormente, não foi possível a avaliação de todas as plantas do experimento, devido à falta de tempo. Os resultados obtidos serviram de base para as conclusões finais sobre a metodologia utilizada.

O espectro de mutação mostrou mutantes com flores de cor chá-rosa (19), rosa claro (6), bronze (2) e branco (5), como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Espectro de mutação observado em plantas obtidas por meio de pedicelos tratados *in vitro* com 0,075 M de EMS por uma hora e quarenta e cinco minutos e 15 minutos de lavagem em água.

Tratamentos	Cores mutantes observadas				Total
	chá-rosa	rosa claro	bronze	branco	
Controle 2H	0	0	0	0	0
(duas horas em água)					
EMS [0,075 M]	19	6	2	5	32

A Tabela 5 mostra os resultados à respeito dos tipos de mutantes obtidos nas plantas tratadas com EMS. Como pode-se observar, um total de 32 plantas mutantes foi encontrado dentro do grupo de plantas tratadas com EMS; deste número, 27 plantas eram mutantes sólidos, isto é, apresentando todas as inflorescências com uma única coloração, correspondendo ao 11,8% do total de plantas tratadas com o mutagênico. Do total de plantas mutantes, cinco eram quiméricas, correspondendo ao 2,2% do total de plantas tratadas. Destas plantas quiméricas, uma apresentou inflorescências brancas e as outras quatro apresentaram inflorescências de cor rosa claro. Importante ressaltar que todas as cinco plantas quiméricas observadas apresentaram amplos setores mutados, isto é, em todos os casos metade das inflorescências da planta com uma cor e a outra metade de

outra cor. Não foram observados setores mutados dentro de uma mesma inflorescência.

Tabela 5. Avaliação no florescimento dos tipos de mutantes obtidos nas plantas provenientes de pedicelos tratados com 0,075M de EMS por uma hora e quarenta e cinco minutos com 15 minutos de lavagem em água.

Tratamentos	Mutantes sólidos	Mutantes quiméricos	Total de mutantes	Plantas avaliadas
Controle 2H (duas horas em água)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	33
EMS [0,075 M]	27 (11,8%)	5 (2,2%)	32 (14%)	228
Total	27 (84,4%)	5 (15,6%)	32 (100%)	261

Uma das vantagens de se utilizar a técnica de indução de mutação e a regeneração de plantas a partir de gemas adventícias, está no fato de que as gemas adventícias podem ter origem a partir de uma única célula, com isto a obtenção de mutantes sólidos após um evento mutagênico é esperado. Neste experimento observou-se, de acordo com a Tabela 5, uma porcentagem maior de mutantes sólidos (84,4%) com relação ao número total de mutantes observados, isto é, uma célula mutada dando origem a uma gema adventícia e, esta, a uma planta mutante. Um total de 5 plantas (15,6%) do total de mutantes eram plantas quiméricas.

Broertjes et al. (1976), obtiveram uma alta frequência de mutantes sólidos quando regeneraram plantas de crisântemo da cultivar 'Bravo' *in vitro* a partir de pedicelos e de folhas irradiadas, sendo que de um total de 168 plantas mutantes, num primeiro experimento, somente

uma delas era quimérica. Em outro experimento, eles utilizaram maiores doses e irradiaram os mesmos tipos de explantes, desta vez obtiveram duas plantas quiméricas de um total de 191 plantas regeneradas de folhas tratadas. Do total de plantas mutantes regeneradas a partir de pedicelos tratados, 88,9 % corresponderam a mutantes sólidos.

Latado et al. (1996) tratou pedicelos com raios-gama e obteve 45 plantas mutantes de um total de 690 plantas regeneradas, correspondendo a 6,5%. Neste experimento os autores obtiveram 100% de mutantes sólidos. Eles concluíram que as plantas mutantes surgiram de gemas adventícias originadas de uma única célula.

Supondo a hipótese da origem unicelular das gemas adventícias de crisântemo *in vitro*, a explicação ao fato de ter-se observado plantas quiméricas neste experimento pode ser um possível efeito residual do mutagênico sobre o pedicelo, isto é, a ação de resíduos do EMS atuando posteriormente ao início do desenvolvimento da gema adventícia. Broertjes & Van Harten (1988) estudando a origem das gemas adventícias em violeta africana, observaram o desenvolvimento de plantas na base do pecíolo de folhas destacadas enraizadas. Tal desenvolvimento foi acompanhado de observações citológicas das células em divisão. Eles notaram que as primeiras divisões periclinais de células epidérmicas do pecíolo iniciavam aproximadamente cinco dias após as folhas terem sido destacadas, tais células originavam gemas adventícias e posteriormente plantas.

Outra explicação seria admitir a origem da gema adventícia a partir de mais do que uma célula; a característica das quimeras encontradas sugerem, se este for a hipótese correta, como sendo de pelo menos duas células o número do qual se originaram tais gemas; ambas as hipóteses podem ser relacionadas com as observações citadas anteriormente quanto à fasciação observada no caule das plantas. Broertjes & Keen (1980), tentando definir a origem destas, concluíram que o ápice de uma gema adventícia é formada por uma ou poucas células filhas de uma célula original e esta última é originada de uma única célula.

Ainda outra explicação poderia ser a ocorrência de variação somaclonal devido ao cultivo *in vitro*. De qualquer modo, a alta frequência de mutantes sólidos obtida torna a metodologia de interesse na mutagênese de crisântemo.

Na Figura 9, pode-se observar mutantes sólidos para a cor da flor obtidos neste experimento.

Figura 9 - Mutantes sólidos obtidos por meio do tratamento *in vitro* de pedicelos com 0,075 M de EMS por uma hora e quarenta e cinco minutos seguido de lavagem por 15 minutos em água.

4.2 Uso de podas repetidas em ápices meristemáticos e internódios após irradiação de plantas *in vitro* com raios-gama, visando-se indução de mutação

4.2.1 Determinação da sensibilidade de plantas *in vitro* a raios-gama

Os dados obtidos com a irradiação *in vitro* de plantas do cultivar 'Ingrid' com várias doses de raios-gama estão apresentados na Tabela 6.

Observou-se um decréscimo com a irradiação *in vitro* na altura das plantas à medida que a dose de irradiação foi aumentada. A análise da variância dos dados mostrou o valor F altamente significativo, o que indica que houve diferenças estatísticas entre tratamentos com relação à altura das plantas. Como pode-se observar, a maior dose de irradiação (30 Gy) causou uma redução acentuada na altura média das plantas (68,3%); a menor dose (5 Gy) reduziu 11,3%, segundo os dados observados. Neste experimento observou-se 100% de sobrevivência das plantas em todos os tratamentos.

A dose foi escolhida em função da redução média aproximada de 50% na taxa de crescimento das plantas durante um período de 30 dias. O objetivo era usar uma dose capaz de induzir mutações de cor da flor, mas evitando o surgimento de mutações múltiplas, que geralmente se associam a mutações indesejáveis quando doses altas são usadas. Para este cultivar, segundo estes critérios, foi escolhida a dose de 22,5 Gy, com taxa de dose de 262 Gy/h.

O comportamento dos dados observados quanto à altura média das plantas estão representados graficamente na Figura 10.

Tabela 6. Altura média das plantas *in vitro* do cultivar 'Ingrid' avaliada 30 dias após irradiação com diferentes doses de raios-gama.

Dose (Gy)	Altura média de plantas em cm	%
0	6,8316 a	100,0
5	6,0579 ab	88,7
10	5,8474 ab	85,6
15	5,6368 ab	82,5
20	4,6158 bc	67,5
25	3,4947 cd	51,1
30	2,1632 d	31,7
F	22,8**	
C.V. (%)	30,15	

* as médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey ao nível de 5%.

** valor do F significativo ao nível de 1%.

Figura 10 - Média da altura das plantas obtidas por meio de diferentes doses de radiação em plantas cultivadas *in vitro*, avaliadas aos 30 dias.

Redução na altura e sobrevivência das plantas e anormalidades morfológicas nas folhas e pétalas são efeitos fisiológicos freqüentemente observados após a irradiação, em plantas ornamentais (Banerji & Datta, 1994; Banerji et al., 1994).

O número de trabalhos de indução de mutação com o uso de mutagênicos físicos em crisântemo utilizando metodologias *in vitro* é reduzido. A dose escolhida neste trabalho assemelha-se às doses freqüentemente utilizadas por outros autores quando os trabalhos seguem uma metodologia *in vivo*. Banerji & Datta (1992) observaram uma redução de 14% na altura de plantas quando foram utilizadas doses de 20 Gy de raios-gama; a maior dose (25 Gy) reduziu em mais do 50%. Banerji et al. (1996) em outro cultivar de crisântemo, irradiou plantas *in vivo* e observou uma redução de 56% na altura de plantas quando foi utilizada a dose de 20 Gy; quando utilizou a dose de 25 Gy, a redução foi bem maior (82%).

Datta (1992) irradiou *in vivo* seis variedades de crisântemo com doses de 15 e 25 Gy e observou uma ampla redução da altura de plantas em todas as variedades, variando de 8,2% a 54,8%.

Guzewski & Muszynski (1988) irradiaram plantas de variedades de crisântemo 'Woking' e 'Luyona', utilizando doses de 15, 20, 25 e 30 Gy de raios-gama. Na variedade 'Woking', os autores observaram redução significativa quanto à altura das plantas, sendo esta de 47,1% na dose de 25 Gy. Inexplicavelmente e contrário às suas expectativas, eles observaram também que na variedade 'Luyona' houve um aumento significativo na altura quando maiores doses foram usadas, assim o aumento foi de 49,5%, 64,8%, 69,8% e 53,9% nas doses 15, 20, 25 e 30 Gy, respectivamente.

As citações anteriores reforçam a idéia da necessidade de se fazer testes prévios para a escolha da dose em qualquer programa de indução de mutação, devido às diferenças genotípicas entre os cultivares e também, ao tipo de mutagênico e condições em que foram realizados os tratamentos.

4.2.2 Irradiação de plantas com a dose de raios-gama escolhida, avanço de gerações *in vitro* com o método das podas repetidas e seleção de mutantes no florescimento

Neste experimento as plantas foram irradiadas com a dose 22,5 Gy escolhida no ensaio preliminar descrito anteriormente, utilizando-se a taxa de dose de 254 Gy/h.

Os resultados obtidos quanto ao número de plantas avaliadas, total de plantas mutantes, freqüência de mutantes e freqüência de mutação, são mostrados na Tabela 7.

Em comparação com os trabalhos realizados *in vivo*, uma alta mortalidade de plantas foi verificada neste experimento. Houve contaminação com fungos e bactérias na fase inicial de inoculação e indução à organogênese, mas foi na fase de aclimatização de plântulas em que se observou uma maior mortalidade, principalmente nas gerações M_1V_2 e M_1V_3 . Devido a isto, cerca de 85 % das plantas iniciais da primeira geração (M_1V_1 -meristema apical) foram avaliadas no florescimento; da segunda geração (M_1V_1 -gema axilar), do total de plantas iniciais, 84% foram avaliadas; da terceira geração (M_1V_2), 45% e da quarta geração (M_1V_3), 35%.

Pelos dados da Tabela 7, pode-se observar que neste experimento registrou-se um total de 93 plantas mutantes, correspondendo a 13,3% do total de plantas avaliadas. A maior freqüência de mutantes foi encontrada nas primeiras gerações (M_1V_1 -meristema apical e M_1V_1 -gema axilar).

Tabela 7. Frequência de mutantes nas distintas gerações obtidas por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas *in vitro* com 22,5 Gy de raios-gama.

Geração	Número de plantas		Frequência de mutantes (%)
	Avaliadas	Mutantes	
Testemunha	216	0	0,0
M ₁ V ₁ -meristema apical	89	13	14,6
M ₁ V ₁ -gema axilar	93	26	27,9
M ₁ V ₂	162	19	11,7
M ₁ V ₃	357	35	9,8
Total	701*	93	13,3

* número total de plantas em todas as gerações excluindo-se a testemunha.

O espectro de mutação é mostrado na Tabela 8; foram observadas plantas com variados tamanhos dos setores, isto é, desde pétalas raiadas, metade das pétalas com a cor mutante (setor mutado); flores completamente com a cor mutante, mas que possuíam também flores com a cor original (botão mutado), até plantas com todas as flores apresentando a cor mutante (mutante completo), nas distintas gerações. Para efeitos práticos, plantas com botões mutados e plantas inteiramente mutadas são consideradas de maior interesse para o melhorista quando se dispõe do uso de indução de mutações para o melhoramento de plantas de propagação vegetativa; isto devido à maior possibilidade de se isolar mutantes somáticos de interesse. As ramificações que contenham os botões mutados, poderão ser propagadas pela indução ao enraizamento dessa parte vegetativa

contendo, pelo menos, uma gema axilar, seja utilizando uma técnica de propagação *in vitro* como *in vivo*.

Flores de cor bronze, chá-rosa, rosa claro, listrada, vermelha e amarelo, foram observadas. Além de mutantes para a coloração da flor, foram observados mutantes para o tamanho da flor (flor de maior tamanho) e um mutante com maior número de pétalas. Pelos dados obtidos, a cor mutante bronze e amarela foram as mais freqüentes nas flores, no entanto a cor bronze e chá-rosa foram as únicas observadas em todas as gerações.

Tabela 8. Espectro de mutação nas distintas gerações obtidas por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com 22,5 Gy da raios-gama *in vitro*.

Cor mutante	Gerações				Total
	M ₁ V ₁ -MA ⁽¹⁾	M ₁ V ₁ -GA ⁽²⁾	M ₁ V ₂	M ₁ V ₃	
bronze	3	4	10	14	31
amarela	0	18	0	0	18
chá-rosa	1	1	1	13	16
rosa claro	4	3	0	1	8
rosa com ponta amarela	5	0	0	0	5
vermelha	0	0	2	0	2
listrada	0	0	0	1	1
flor grande	0	0	6	5	11
maior n ^o pétalas	0	0	0	1	1
Total	13	26	19	35	93

⁽¹⁾ geração de plantas obtidas a partir do meristema apical.

⁽²⁾ geração de plantas obtidas a partir da gema axilar.

Apesar da dificuldade para se determinar o tamanho do setor, neste trabalho, para efeito de análise designou-se inicialmente duas categorias de plantas mutantes; assim denominou-se as plantas quiméricas com setores e botões mutados como mutantes de duas ou mais cores. Como mutantes com uma única cor foram classificados aquelas plantas com todas as flores apresentando a cor ou o caráter mutante, (possivelmente quimeras periclinais).

A Tabela 9 mostra a freqüência de mutantes com duas ou mais de uma cor e de mutantes com uma única cor, com relação ao total de plantas mutantes observadas. Como se observa nesta Tabela, a maior freqüência de mutantes de duas ou mais cores foi encontrada na geração M_1V_1 -gema axilar (88,5%); a menor freqüência foi observada na geração M_1V_3 (31,4%). No total, 58,1% das plantas mutantes encontradas apresentavam duas ou mais cores.

Tabela 9. Freqüência de mutantes de uma e mais de uma coloração, em relação ao total de plantas mutantes obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com 22,5 Gy da raios-gama *in vitro*.

Geração	Mutantes com duas ou mais cores	Mutantes com uma única cor	Total de mutantes
M_1V_1 -meristema apical	8 (61,5%)	5 (38,5%)	13 (100%)
M_1V_1 -gema axilar	23 (88,5%)	3 (11,5%)	26 (100%)
M_1V_2	12 (63,2%)	7 (36,8%)	19 (100%)
M_1V_3	11 (31,4%)	24 (68,6%)	35 (100%)
Total	54 (58,1%)	39 (41,9%)	93 (100%)

Para a categoria de mutantes com uma única cor, a menor frequência foi observada na geração M_1V_1 -gema axilar (11,5%); a maior frequência (68,6%) foi observada na geração M_1V_3 , no entanto pelos dados visualizados na Tabela 9, este tipo de mutante foi observado em todas as gerações em menores frequências.

A Tabela 10 apresenta a frequência dos mutantes com duas ou mais de uma cor e a frequência de mutantes com uma única cor em relação ao número total de plantas avaliadas.

Tabela 10. Frequência de mutantes de uma e mais de uma coloração, em relação ao total de plantas avaliadas obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com 22,5 Gy da raios-gama *in vitro*.

Geração	Mutantes com duas ou mais cores	Mutantes com uma única cor	Total de plantas avaliadas
M_1V_1 -meristema apical	8 (9%)	5 (5,6%)	89 (100%)
M_1V_1 -gema axilar	23 (24,7%)	3 (3,2%)	93 (100%)
M_1V_2	12 (7,4%)	7 (4,3%)	162 (100%)
M_1V_3	11 (3,1%)	24 (6,7%)	357 (100%)
Total	54 (7,7%)	39 (5,6%)	701 (100%)

Ao se comparar a frequência de mutantes completos (mutantes com uma única cor) observados em cada geração com relação ao número total de plantas avaliadas, observam-se as seguintes frequências: M_1V_1 -meristema apical (5,6%), M_1V_1 -gema axilar (3,2%), M_1V_2 (4,3%) e M_1V_3 (6,7%). A maior frequência de mutantes completos na geração M_1V_3 (6,7%), coincidiu com a menor frequência de mutantes

(9,8%), como se observa na Tabela 7. Com exceção da primeira geração, verificou-se um aumento da freqüência de mutantes completos com o avanço das gerações.

As freqüências de mutantes com duas ou mais de uma cor observadas nas distintas gerações, com relação ao total de plantas avaliadas, foram: 9% na geração M_1V_1 -meristema apical, 24,7% na geração M_1V_1 -gema axilar, 7,4% na geração M_1V_2 e 3,1% na geração M_1V_3 . Com exceção da segunda geração, verificou-se uma tendência à redução da freqüência de este tipo de mutante em função do avanço das gerações por meio das podas repetidas.

O tratamento com mutagênicos, principalmente os mutagênicos físicos, pode afetar diversas células causando desde danos fisiológicos até a morte da célula (Broertjes & Van Harten, 1988). A morte de células pela irradiação das plantas *in vitro* pode ser uma possível explicação para o aparecimento de uma alta porcentagem de mutantes completos (38,4%) na geração M_1V_1 -meristema apical, com relação ao total de plantas mutantes.

O comportamento gráfico das freqüências observadas de mutantes com duas ou mais de uma cor e mutantes com uma única cor, em todas as gerações, são mostrados na Figura 11.

O uso da metodologia *in vitro* requer um maior domínio das diferentes etapas. Durante o enraizamento e aclimatização e, devido também aos efeitos da irradiação, as plantas desenvolvem de maneira não uniforme, o que se reflete nos estágios mais avançados do ciclo de crescimento como o florescimento, fato que obriga a fazer até duas avaliações de uma mesma geração. Otimizar os procedimentos em cada etapa ajudaria ao plantio no campo de plantas mais homogêneas, conseqüentemente, avaliações únicas. Outra alternativa seria a poda das plantas no campo com o objetivo de concentrar ao máximo a abertura das flores num determinado período de tempo.

Neste trabalho foi empregado um tempo aproximado de 270 dias desde a irradiação de plantas *in vitro* até a avaliação da última geração, isto é, a geração M_1V_3 , devido a algumas complicações na

aclimatização das plantas, no entanto, a aplicação do método poderia ser feito em até 230 dias. Entretanto, se o melhorista resolver fazer seleção em gerações menos avançadas, este tempo pode ser bem menor. Esta alternativa pode ser de interesse uma vez que os resultados indicaram que na geração M_1V_1 -meristema apical, obteve-se uma alta frequência de mutantes com uma única cor.

Figura 11 - Frequência de mutantes de uma e mais de uma coloração, em relação ao total de plantas avaliadas obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com 22,5 Gy da raios-gama *in vitro*.

4.3 Determinação da frequência de mutantes e tamanho do setor mutado *in vivo* em mudas enraizadas irradiadas

Baseado no método das podas repetidas, este experimento foi conduzido com os objetivos de se determinar a frequência de mutantes e o tamanho do setor mutado de plantas irradiadas, podadas e cultivadas *in vivo*, ao mesmo tempo pode-se comparar os dados obtidos com o experimento *in vitro* semelhante, anteriormente discutido.

Na Tabela 11 observa-se o número de plantas avaliadas, o total de mutantes e a frequência de mutantes em cada geração.

Segundo os dados da Tabela 11, um total de 317 plantas mutantes foram observadas neste experimento, correspondendo a 7,1% do total de plantas avaliadas. A maior frequência de mutantes (26,2%) foi encontrada na geração M_1V_1 -meristema apical; frequências menores, variando de 4 a 5%, foram observadas nas gerações seguintes

Tabela 11. Frequência de mutantes nas distintas gerações obtidas por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com dose de 20 Gy de raios-gama *in vivo*.

Geração	Número de plantas		Frequência de mutantes (%)
	Avaliadas	Mutantes	
Testemunha	551	0	0,0
M_1V_1 -meristema apical	480	126	26,2
M_1V_1 -gema axilar	993	43	4,3
M_1V_2	1478	78	5,3
M_1V_3	1500	70	4,7
Total	4451*	317	7,1

* número total de plantas em todas as gerações, sem contar a testemunha.

O espectro de mutação é mostrado na Tabela 12. Flores de cores mutantes como: bronze, chá-rosa, rosa claro, rosa escuro, amarelo variegado creme e branco foram encontradas. A cor mutante bronze foi observada com maior frequência (35,6%), seguido da cor chá-rosa (19,9%); além destas cores, a cor amarela e variegada foram observadas em todas as gerações.

Tabela 12. Espectro de mutação nas distintas gerações obtidas por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com 20 Gy de raios-gama *in vivo*.

Cor mutante	Gerações				Total
	M ₁ V ₁ -MA ⁽¹⁾	M ₁ V ₁ -GA ⁽²⁾	M ₁ V ₂	M ₁ V ₃	
bronze	42	18	22	31	113
chá-rosa	24	14	12	13	63
rosa claro	40	0	5	0	45
amarela	9	4	15	13	41
variegada	11	2	9	6	28
rosa escuro	0	3	11	7	21
branco	0	0	4	0	4
creme	0	2	0	0	2
Total	126	43	78	70	317

⁽¹⁾ geração de plantas obtida a partir do meristema apical.

⁽²⁾ geração de plantas obtidas a partir da gema axilar.

A semelhança do experimento *in vitro*, foram observadas plantas com variados tamanho de setores mutados.

Todos os mutantes observados foram com relação à cor da flor; nenhum mutante para a forma e tamanho da flor foi observado.

Também para efeitos da análise dos dados, as plantas mutantes observadas foram classificadas em duas categorias; assim denominou-se as plantas com pequenos setores mutados nas pétalas e plantas com botões mutados como mutantes de duas ou mais cores. Plantas apresentando todas as flores com a cor mutante, foram denominadas de mutantes de uma única cor.

A Tabela 13 mostra a freqüência de mutantes com duas ou mais cores e de mutantes com uma única cor, com relação ao total de plantas mutantes observadas. Observa-se nesta Tabela que a maior freqüência de mutantes de duas ou mais cores foi encontrada na geração M_1V_1 -meristema apical onde o total de mutantes observados correspondeu apenas à esta categoria; a menor freqüência foi observada na geração M_1V_3 (35,7%). No total de mutantes observados 74,1% corresponderam a mutantes de duas ou mais cores.

Tabela 13. Freqüência de mutantes de uma e mais de uma coloração, em relação ao total de plantas mutantes obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com 20 Gy de raios-gama *in vivo*.

Geração	Mutantes com duas ou mais cores	Mutantes com uma única cor	Total de mutantes
M_1V_1 -meristema apical	126 (100%)	0 (0%)	126 (100%)
M_1V_1 -gema axilar	34 (79,1%)	9 (20,9%)	43 (100%)
M_1V_2	50 (64,1%)	28 (35,9%)	78 (100%)
M_1V_3	25 (35,7%)	45 (64,3%)	70 (100%)
Total	235 (74,1%)	82 (25,9%)	317 (100%)

Para a categoria de mutantes com uma única cor, a menor freqüência foi observada na geração M_1V_1 -meristema apical, na qual

nenhum mutante deste tipo foi observado; a maior freqüência (64,3%) foi observada na geração M_1V_3 .

A Tabela 14 mostra a freqüência de mutantes com duas ou mais de uma cor e de mutantes com uma única cor, com relação ao total de plantas avaliadas em cada geração.

Tabela 14. Número e freqüência de mutantes de uma e mais de uma coloração, em relação ao total de plantas avaliadas obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com 20 Gy de raios-gama *in vivo*.

Geração	Mutantes com duas ou mais cores	Mutantes com uma única cor	Total de plantas avaliadas
M_1V_1 -meristema apical	126 (26,2%)	0 (0%)	480
M_1V_1 -gema axilar	34 (3,4%)	9 (1%)	993
M_1V_2	50 (3,4%)	28 (1,9%)	1478
M_1V_3	25 (1,7%)	45 (3%)	1500
Total	235 (5,3%)	82 (1,8%)	4451

As freqüências de mutantes completos (mutantes com uma única cor) observados em cada geração com relação ao número total de plantas avaliadas, visualizados na Tabela 13, mostra um incremento contínuo com o avanço das gerações. As freqüências de mutantes com duas ou mais de uma cor, por sua vez mostraram uma redução continua com o avanço das gerações. Se considerarmos os mutantes com duas ou mais cores como sendo quimeras mericlinais e setoriais pode-se concluir que houve uma ampliação do setor mutado com o avanço das gerações *in vivo*, de tal modo que quimeras periclinais fossem obtidas.

As frequências observadas de mutantes de uma única cor e mutantes com duas ou mais cores são mostradas graficamente na Figura 12.

Tulmann Neto & Latado (1997), baseando-se no mesmo método utilizado neste trabalho, avançaram até a geração M_1V_6 observando uma frequência de mutantes de 5,8% para a coloração das flores em plantas de crisântemo do cultivar 'Repin Rosa'. Igualmente eles observaram um aumento no número de quimeras periclinais à medida que acontecia o avanço das gerações.

Broertjes (1966), irradiou plantas crisântemo *in vivo* e realizou a poda para promover o surgimento das ramificações laterais e observou um incremento na frequência de mutantes a medida que aumentava a dose de irradiação, encontrando frequência de 15, 22 e 26% quando utilizou doses de 15, 20 e 25 Gy de raios-X, respectivamente. Ele observou tanto mutantes de cor como de forma e tamanho da flor.

O mutante bronze, variegado e chá-rosa foram selecionados neste experimento para testes posteriores quanto à durabilidade, altura, peso e estabilidade das cores; para isto, as ramificações selecionadas contendo a flor com a cor mutante foram multiplicadas.

A diferença da metodologia *in vitro*, a indução de mutações *in vivo* em crisântemo é mais simplificada, isto porque as mudas enraizadas após a irradiação são imediatamente plantas no campo para avaliação no florescimento.

Neste trabalho foi empregado um período de tempo aproximado de 200 dias desde a irradiação das mudas até a avaliação da última geração, isto é, a geração M_1V_3 .

Figura 12 - Frequência de mutantes de uma e mais de uma coloração, em relação ao total de plantas avaliadas obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas com 20 Gy de raios-gama *in vivo*.

4.4 Comparações das metodologias de indução de mutação *in vitro* e *in vivo*

Em contraste com a metodologia *in vitro*, no experimento *in vivo* observou-se que uma maior porcentagem de plantas inicialmente enraizadas e plantadas foram avaliadas, apesar de ter-se iniciado com um maior número de plantas (500), o que pode representar uma primeira vantagem quanto ao método *in vitro*, houve maior número de plantas que não sobreviveram.

Observa-se na Tabela 15 que a frequência de mutantes *in vivo* foi de 7,1% do experimento em geral, sendo uma porcentagem menor que a observada no experimento *in vitro* (13,3%). Quando se analisa geração por geração veremos que em quase todas elas, a frequência de mutantes foi maior no experimento *in vitro*, com exceção da geração M₁V₁-

meristema apical *in vivo* que apresentou maior frequência (26,2% contra 14,6%).

Tabela 15. Frequência de mutantes nas distintas gerações obtidas por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas *in vivo* e *in vitro*.

Geração	Frequência de mutantes (%)	
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
M ₁ V ₁ -meristema apical	26,2	14,6
M ₁ V ₁ -gema axilar	4,3	27,9
M ₁ V ₂	5,3	11,7
M ₁ V ₃	4,7	9,8
Total	7,1	13,3

A Figura 13 ilustra graficamente o comportamento dos dados quanto a frequência de mutantes em cada geração em ambos experimentos.

Em ambos experimentos, a cor bronze foi observada com maior frequência, sendo *in vivo* a frequência de 35,6% e *in vitro* 33,3%. À diferença do experimento *in vitro*, no experimento *in vivo* não foram observadas as cores vermelha e listrada, no entanto apareceram as cores rosa escuro, creme e variegada. As cores bronze e chá-rosa foram as únicas cores mutantes observadas em todas as gerações em ambos experimentos.

No experimento *in vivo* todos os mutantes observados foram com relação à cor da flor; nenhum mutante para a forma e tamanho da flor foi observado, à diferença do experimento *in vitro*.

Figura 13 - Frequência de mutantes em relação ao total de plantas avaliadas obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas *in vivo* e *in vitro*.

A frequência de mutantes de uma e mais de uma coloração, em relação ao total de plantas mutantes obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas *in vivo* e *in vitro* são mostradas na Tabela 16.

Como se observa na Tabela 16, uma maior frequência de mutantes com duas ou mais cores foi observada no experimento *in vivo* do que *in vitro*, no entanto a maior frequência de mutantes com uma única cor foi observada no experimento *in vitro*, isto quando se relaciona os tipos de mutantes com o total de mutantes observados.

A frequência de mutantes de uma e de duas ou mais cores, em relação ao total de plantas avaliadas por geração, obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas *in vivo* e *in vitro* são mostradas na Tabela 17.

Tabela 16. Frequência de mutantes de uma e mais de uma coloração, em relação ao total de plantas mutantes obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas *in vivo* e *in vitro*.

Geração	Frequência de mutantes com duas ou mais cores (%)		Frequência de mutantes com uma única cor (%)	
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
M ₁ V ₁ -meristema apical	100	61,5	0,0	38,5
M ₁ V ₁ -gema axilar	79,1	88,5	20,9	11,5
M ₁ V ₂	64,1	63,2	35,9	36,8
M ₁ V ₃	35,7	31,4	64,3	68,6
Total	74,1	58,1	25,9	41,9

Tabela 17. Frequência de mutantes de uma e mais de uma coloração, em relação ao total de plantas avaliadas obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas *in vivo* e *in vitro*.

Geração	Frequência de mutantes com duas ou mais cores (%)		Frequência de mutantes com uma única cor (%)	
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
M ₁ V ₁ -meristema apical	26,2	9,0	0,0	5,6
M ₁ V ₁ -gema axilar	3,4	24,7	1,0	3,2
M ₁ V ₂	3,4	7,4	1,9	4,3
M ₁ V ₃	1,7	3,1	3,0	6,7
Total	5,3	7,7	1,8	5,6

Pelos dados da Tabela 17 observa-se que em todas as gerações a frequência de mutantes com uma única cor foi maior no experimento *in vitro* do que *in vivo*. A frequência de mutantes de duas ou mais cores e mutantes de uma única cor, em todo o experimento, foi maior *in vitro* do que *in vivo*. Em ambos os experimentos a maior frequência de mutantes de uma única cor foram observados na geração M_1V_3 .

A Figura 14 mostra graficamente o comportamento dos dados quanto à frequência de mutantes de uma única cor *in vivo* e *in vitro*.

Figura 14 - Frequência de mutantes de uma única cor, em relação ao total de plantas avaliadas obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas *in vivo* e *in vitro*.

Um menor período de tempo foi empregado na aplicação da metodologia de indução de mutação *in vivo* (200 dias) do que *in vitro* (270 dias), o que constitui uma vantagem para o método *in vivo* quando ambos métodos são comparados.

A Figura 15 mostra graficamente a freqüência de mutantes com duas ou mais cores *in vivo* e *in vitro*.

Figura 15 - Freqüência de mutantes de duas ou mais de uma coloração, em relação ao total de plantas avaliadas obtidas nas distintas gerações por meio do método das podas repetidas em plantas irradiadas *in vivo* e *in vitro*.

Diante do que foi exposto, cabe ao melhorista, de acordo com as facilidades que dispõe, o uso de uma ou outra metodologia. Deve-se entretanto ter o cuidado com a extrapolação destes resultados pois eles podem estar na dependência dos genótipos utilizados para o tratamento.

4.5 Determinação da frequência de mutantes em plantas da geração M_1V_2 obtidas de gemas axilares de distintas posições ao longo de plantas da geração M_1V_1 originadas da irradiação de plantas. *in vivo*

O experimento consistiu na irradiação de mudas enraizadas com dose de 20 Gy e taxa de dose de 238 Gy/h. Plantadas no campo, as plantas podadas a diferentes alturas das folhas ao longo do caule principal, foram conduzidas objetivando-se o desenvolvimento da ramificação correspondente à gema axilar imediatamente inferior à altura da poda. Para isto, desbastes periódicos foram realizados para evitar que outras ramificações se desenvolvessem.

O tratamento T1 consistiu na população de plantas podadas acima da folha inicialmente marcada; o tratamento T2, na população de plantas podadas na altura da segunda gema axilar (T2) (primeira folha acima da folha marcada). Assim sucessivamente até completar o último grupo onde foi feita a poda na altura da sexta gema axilar (T6), isto é, cinco folhas acima da folha marcada.

Baseados na hipótese de Donini & Micke (1984) com relação ao número de células mutadas e o correspondente tamanho do setor mutado dos distintos primórdios de gemas axilares no caule principal, o experimento de podas a diferentes alturas da planta (da primeira folha até a sexta folha), constitui-se numa variante ao método de podas repetidas e visa facilitar a expressão e ampliação dos setores mutados para o isolamento de mutações somáticas.

Em todas as três repetições do experimento, e nas distintas posições dos ramos conduzidos, foram observados setores mutados, isto é, flores com mais de uma cor dentro da mesma flor, as vezes uma mesma pétala apresentando mais de uma cor. Observaram-se também plantas que apresentaram flores inteiras de cor diferente da cor do cultivar original, sendo estas denominadas de botões mutantes. Ambas

constituem setores mutados e para efeitos de compreensão e análise dos dados foram classificadas em mesmo grupo.

As cores mutantes e o número de vezes observadas nas distintas ramificações M_1V_2 ao longo do caule principal, são observadas na Tabela 18.

Tabela 18. Espectro de mutação para a coloração das flores observada nas ramificações M_1V_2 , obtidas por meio de podas em distintas posições ao longo de plantas da geração M_1V_1 .

Cores mutantes	Altura da poda de acordo com a posição da gema axilar						Total
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
bronze	15	30	17	26	20	19	129
rosa claro	10	13	13	24	21	28	109
chá rosa	27	11	18	15	10	18	99
variegado	4	2	3	5	1	7	22
amarelo	2	2	3	1	3	2	13
branco	2	3	0	2	4	0	9
rosa escuro	2	2	2	2	0	0	8
vinho	0	1	1	1	0	1	4
creme	0	0	1	0	1	1	3
bege	1	0	0	0	0	0	1

T1 = população de plantas podadas acima da primeira gema axilar da geração M_1V_1 .

T2 = população de plantas podadas acima da segunda gema axilar da geração M_1V_1 .

T3 = população de plantas podadas acima da terceira gema axilar da geração M_1V_1 .

T4 = população de plantas podadas acima da quarta gema axilar da geração M_1V_1 .

T5 = população de plantas podadas acima da quinta gema axilar da geração M_1V_1 .

T6 = população de plantas podadas acima da sexta gema axilar da geração M_1V_1 .

O uso da técnica mostrou um amplo espectro de mutação; mutantes de cor bronze, chá rosa, rosa claro, rosa escuro, branco, vinho, amarelo, variegado, bege e creme, foram observados, sendo que a cor bronze e rosa claro foram as que se expressaram em maior número de vezes e repetidamente em todas as repetições.

A Tabela 19 mostra o número total de plantas avaliadas, o número de mutantes observados e a frequência de mutantes

Tabela 19. Frequência de mutantes em ramos M_1V_2 originados de distintas posições da gema axilar ao longo de plantas da geração M_1V_1 .

	Controle	Altura da poda de acordo com a posição da gema axilar						Total	%
		T1	T2	T3	T4	T5	T6		
Plantas com cor normal ⁽¹⁾	399	187	214	247	253	214	280	1395	77,8
Plantas com cor mutante	0	63	64	58	76	60	76	397	22,1
Plantas totais avaliadas	399	250	278	305	329	274	356	1792	100
Frequência de mutantes (%)	0	25,2	23,0	19,0	23,1	21,9	21,3	22,1	

⁽¹⁾ cor rosa escuro da variedade mutante 'Ingrid'.

T1 = população de plantas podadas acima da primeira gema axilar da geração M_1V_1 .

T2 = população de plantas podadas acima da segunda gema axilar da geração M_1V_1 .

T3 = população de plantas podadas acima da terceira gema axilar da geração M_1V_1 .

T4 = população de plantas podadas acima da quarta gema axilar da geração M_1V_1 .

T5 = população de plantas podadas acima da quinta gema axilar da geração M_1V_1 .

T6 = população de plantas podadas acima da sexta gema axilar da geração M_1V_1 .

De 3200 plantas irradiadas, um total de 1792 foram avaliadas, correspondendo a 56%. Esta redução deve-se aos efeitos fisiológicos causados pela irradiação e visualizados no desenvolvimento vegetativo, o que provoca uma floração pouco uniforme. As plantas foram avaliadas quando a maior parte delas apresentavam as flores abertas.

A Tabela 20 mostra a freqüência de mutantes para as diversas categorias estudadas (setor, botão e planta) com relação ao total de plantas mutantes em cada tratamento. Com relação ao total de plantas avaliadas, o número de setores mutados observados (207) correspondeu a 11,5%; o número de botões (183) correspondeu a 10,2%; e plantas mutadas (7) a 0,4%.

Tabela 20. Freqüência (%) de setores, botões e mutantes completos observados em ramos M_1V_2 originados de distintas posições da gema axilar ao longo de plantas da geração M_1V_1 .

Tratamento (altura da poda)	Setores mutados	Botões mutados	Planta mutada	Total de mutantes
T1	31 (49,2%)	32 (58,8%)	0 (0%)	63
T2	34 (53,1%)	29 (45,3%)	1 (1,5%)	64
T3	32 (55,2%)	25 (43,1%)	1 (1,7%)	58
T4	38 (50%)	36 (47,4%)	2 (2,6%)	76
T5	34 (56,7%)	26 (43,3%)	0 (0%)	60
T6	38 (50%)	35 (46%)	3 (3,9%)	76
Total	207 (52,1%)	183 (46,1%)	7 (1,8%)	397

T1 = população de plantas podadas acima da primeira gema axilar da geração M_1V_1 .

T2 = população de plantas podadas acima da segunda gema axilar da geração M_1V_1 .

T3 = população de plantas podadas acima da terceira gema axilar da geração M_1V_1 .

T4 = população de plantas podadas acima da quarta gema axilar da geração M_1V_1 .

T5 = população de plantas podadas acima da quinta gema axilar da geração M_1V_1 .

T6 = população de plantas podadas acima da sexta gema axilar da geração M_1V_1 .

Mutações somáticas podem ser isoladas com maior facilidade a partir de plantas com botões mutados, uma vez que as ramificações contendo estes botões e com, pelo menos, uma gema axilar, podem ser multiplicados via propagação vegetativa.

Apesar da alta porcentagem de mutantes observada nas distintas posições dos ramos (média de 22,1%), mais de 50% destas ou 207 (52,1%) correspondem a setores mutados, os quais como foi dito, são de pouco valor devido à dificuldade de se isolar tais mutações somáticas. Do total de plantas mutantes, 183 (46,1%) corresponderam a botões mutados. Apenas foram observados sete mutantes completos (quimeras periclinais) o que corresponde a 1,8% do total de plantas mutantes.

Uma outra análise foi realizada classificando os setores e botões mutados observados como mutantes de mais de uma cor e os mutantes completos como mutantes de uma única cor. Para efeito de análise dos dados, as categorias consideradas como plantas com mais de uma cor correspondem a plantas que apresentaram desde pequenos setores com a cor mutante até plantas com mais de uma flor com a cor mutante (botão mutado) e foram considerados como plantas mutantes, apesar da condição quimérica. Plantas com estas características são denominadas geralmente de quimeras mericlinais. Plantas com todas as flores apresentando uma cor mutante, foram classificadas como plantas de uma única cor. Estas plantas correspondem a quimeras periclinais ou mutantes completos.

Na Tabela 21 pode-se observar a frequência de mutantes com uma única cor e a frequência de mutantes com duas ou mais de uma cor com relação ao total de plantas avaliadas.

Observaram-se valores baixos de mutantes periclinais (plantas completamente mutadas), no entanto admite-se que a irradiação de estruturas multicelulares, como mudas enraizadas, traz como consequência a maior ocorrência de quimeras setoriais e mericlinais.

Tabela 21. Análise da variância e freqüência de mutantes de uma única cor e de duas ou mais cores em ramos M_1V_2 originados de distintas posições da gema axilar ao longo de plantas da geração M_1V_1 , com relação ao número total de plantas avaliadas e por tratamento.

Tratamento (altura da poda)	Mutantes com uma única cor	Mutantes com mais de uma cor	Total de plantas avaliadas
T1	0 (0%)	63 (25,2%)	250
T2	1 (0,4%)	63 (22,7%)	278
T3	1 (0,3%)	57 (18,7%)	305
T4	2 (0,6%)	74 (22,5%)	329
T5	0 (0%)	60 (21,9%)	274
T6	3 (0,8%)	73 (20,5%)	356
Total	7 (0,4%)	390 (21,7%)	1792
F	1,63 ns	0,69 ns	
C.V. (%)	30,6	13,4	

T1 = população de plantas podadas acima da primeira gema axilar da geração M_1V_1 .

T2 = população de plantas podadas acima da segunda gema axilar da geração M_1V_1 .

T3 = população de plantas podadas acima da terceira gema axilar da geração M_1V_1 .

T4 = população de plantas podadas acima da quarta gema axilar da geração M_1V_1 .

T5 = população de plantas podadas acima da quinta gema axilar da geração M_1V_1 .

T6 = população de plantas podadas acima da sexta gema axilar da geração M_1V_1 .

A pesar do baixo número de mutantes periclinais, o maior número destas plantas foi observado nas ramificações que surgiram dos primórdios superiores (T4 = 2, T6 = 3).

Para a análise de variância da freqüência de mutantes de duas ou mais cores e os mutantes de uma única cor nas distintas posições das gemas axilares, os dados foram transformados pela

equação $(x + 0,5)^{0,5}$. A análise apresentada na Tabela 21 mostra que os diferentes tipos de mutantes obtidos não diferem significativamente, o que indica que os valores médios de mutantes de mais de uma cor e os mutantes de uma única cor observados, não variaram significativamente nos ramos podados a diferentes alturas. Assim, a poda nas posições testadas, não alterou a frequência de mutantes observada para as categorias analisadas.

As mutações observadas corresponderam unicamente a mutações de cor das flores; nenhuma mutação para o tamanho e forma das flores foi observada.

A Figura 16 ilustra graficamente a frequência de mutantes de uma e mais de uma coloração em ramos M_1V_2 originados de distintas posições da gema axilar ao longo de plantas da geração M_1V_1 .

Do presente experimento foi observado o mutante de cor vinho, o qual foi selecionado a partir de plantas mutantes que apresentavam somente alguns botões com a cor mutada. As ramificações que continham tais flores foram propagadas, obtendo-se plantas que no florescimento apresentaram todas as flores com a cor mutante.

Figura 16 - Freqüência de mutantes de uma e mais de uma coloração em ramos M_1V_2 originados de distintas posições da gema axilar ao longo de plantas da geração M_1V_1 .

4.6 Ensaio de produção e estabilidade da cor dos mutantes selecionados.

Os valores médios das três variáveis nas quatro repetições em que foi conduzido o ensaio estão apresentados na Tabela 22. O peso médio das plantas, dado em kg, e o número de flores corresponde ao peso e número de dez plantas reunidas em maço, devido a ser esta a forma de comercialização do crisântemo de corte. Dados quanto a análise da variância também estão apresentados nesta Tabela.

O mutante variegado não mostrou a estabilidade esperada; a situação de quimerismo foi amplamente observada na população testada, indicando uma reversão da cor mutante ainda após a propagação vegetativa dos setores, por isto ele não foi considerado para

a análise dos diversos caracteres; porém, algumas plantas apresentando a cor mutante em todas as flores visualizadas (quimeras periclinais) foram observadas, sendo que estas continuam na etapa de propagação para observar a sua estabilidade, isto devido ao interesse despertado para a comercialização.

Tabela 22. Altura média, peso e número de flores dos mutantes obtidos por indução de mutação *in vivo* a partir do cultivar 'Ingrid'.

Tratamento	Altura de plantas (cm) ⁽¹⁾	Peso (kg) ⁽²⁾	Número de flores ⁽³⁾
Testemunha	104,75 b	0,782 ab	50,75 a
Chá-rosa	114,25 a	0,853 a	47,5 a
Vinho	112,25 a	0,727 b	46,25 a
Bronze	94,75 c	0,877 a	66,0 b
F	46,30**	10,78**	7,60**
C.V. (%)	2,47	5,11	12,57

⁽¹⁾ altura média de plantas, as médias com as mesmas letras não diferem ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

⁽²⁾ peso de dez plantas (maço), as médias com as mesmas letras não diferem ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

⁽³⁾ número de flores abertas de dez plantas (maço), as médias com as mesmas letras não diferem ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

** valor do F significativo ao nível de 1 % de probabilidade.

Dados quanto ao ciclo de cultivo também foram observados. Neste aspecto todos os mutantes, a exceção do mutante bronze, apresentaram o mesmo ciclo, medido desde o plantio das mudas até o

pleno florescimento. A testemunha atingiu o ponto de colheita aos 99 dias, de igual forma os mutantes chá-rosa e vinho. O mutante bronze mostrou-se mais precoce, atingindo o ponto de colheita aos 92 dias, no entanto este caráter não foi analisado estatisticamente, de modo que diferenças significativas não puderam ser determinadas.

Para o caráter altura da planta, tanto os mutantes chá-rosa e vinho apresentaram uma altura média superior ao material controle. O mutante bronze, em contrapartida, apresentou uma altura média significativamente inferior à testemunha.

Quanto ao peso, houve diferenças significativas entre as médias dos mutantes, no entanto nenhum deles variou significativamente em relação ao material controle.

Finalmente com relação ao número de flores abertas, o mutante bronze mostrou um valor médio significativamente superior aos outros mutantes, incluindo a testemunha.

Todos os mutante mostraram uma durabilidade de 12 dias, igual da testemunha.

A Figura 17 mostra os mutantes selecionados e testados neste experimento.

Dos mutantes selecionados e testados, três deles, vinho, bronze e variegado estão sendo multiplicados para futura utilização como novas cultivares mutantes, dado o interesse demonstrado pelo produtor.

Figura 17 - Mutantes de cor vinho (A), variegado (B), chá-rosa (C) e bronze (D), obtidos por indução de mutação com raios-gama.

5 CONCLUSÕES

Nas condições em que foram conduzidos os experimentos sobre indução de mutação *in vivo* e *in vitro* no melhoramento de crisântemo, os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- a) Devido à alta frequência de mutantes obtidos após o tratamento, a redução de 50% no número de plantas regeneradas por pedicelo cultivados *in vitro* pode ser indicada como um dos parâmetros para a escolha da concentração do mutagênico químico EMS em trabalhos com indução de mutação nesta ornamental.
- b) O tratamento de pedicelos de botões florais imaturos com EMS na concentração de 0,075 M uma hora e quarenta e cinco minutos horas, associado à indução de gemas adventícias *in vitro*, produziu uma alta frequência de mutantes sólidos (11,8%) para a coloração da inflorescência, indicando a vantagem desta metodologia para indução de mutação.
- c) O uso do método das podas repetidas após a irradiação de plantas *in vivo* e *in vitro* com raios-gama resultou na obtenção de uma alta frequência de mutantes para a cor da inflorescência, concluindo-se que a frequência de mutantes foi maior *in vitro* (13,8%) do que *in vivo* (7,1%).
- d) Após o avanço das gerações usando-se o método das podas repetidas, a indução de mutação *in vitro* proporcionou uma maior frequência de mutantes periclinais do que o método *in vivo*, mas em

ambos os casos a maior freqüência de mutantes periclinais ocorreu na geração M_1V_3 .

- e) No experimento com EMS a cor mutante chá-rosa foi a mais freqüente nas inflorescências, enquanto que nos experimentos *in vivo* e *in vitro*, com raios-gama, a cor mutante mais freqüente foi a bronze.
- f) Não foram encontradas diferenças quanto a freqüência de mutantes na geração M_1V_2 originada de 6 diferentes gemas axilares subsequentes ao longo da geração M_1V_1 proveniente de mudas irradiadas com raios-gama.
- g) A técnica de cultura de tecidos associada a mutagênese foi vantajosa permitindo o avanço de gerações *in vitro* por meio do cultivo de internódios, o tratamento de pedicelos com mutagênico químico e a regeneração de plantas por meio de gemas adventícias originadas de pedicelos de botões florais imaturos.
- h) Resultados do ensaio de produção com mutantes de cor de inflorescência vinho e bronze, obtidos com o uso de raios-gama, indicaram potencial de liberação como novos cultivares, devido ao interesse por estas novas colorações e porque os mutantes não apresentaram alterações indesejáveis nas outras características básicas necessárias para comercialização, quando comparados com o cultivar original.
- i) Um mutante variegado mostrou instabilidade na coloração das pétalas e, devido a isto, está sofrendo nova seleção para posterior avaliação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIRO, B.D. Effect of gamma - radiation dose rate and total dose on stem growth of *Pinus banksiana* (jack pine) seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v.26, n.3, p.253-257, 1986.

ANDERSON, N.O . Reclassifications of the genus *Chrysanthemum* L. **Hortscience**, v.22, n.2, p.313, 1987.

BANERJI, B.K.; DATTA, S.K. Induction of somatic mutation in *Chrysanthemum* cultivar 'Anupam'. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v.19, p.252-256, 1990.

BANERJI, B.K.; DATTA, S.K. Gamma ray induced shape mutation in *Chrysanthemum* cv. 'Java'. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v.21, n.2, p.73-79, 1992.

BANERJI, B.K.; DATTA, S.K. Improvement garden *Chrysanthemum* by ionizing radiation. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v.23, n.3, p.181, 1994.

BANERJI, B.K.; DATTA, S.K.; SHARMA, S.C. Gamma irradiation studies on *Gladiolus* cv. White Friendship. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v.23, n.3, p.127-133, 1994.

- BANERJI, B.K.; DWIVEDI, A.K.; DATTA, S.K. Irradiation studies on rose and chrysanthemum. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v.25, n.2, p.63-67, 1996.
- BEN-JAACOV, J.; LANGHANS, R.W. Rapid multiplication of chrysanthemum, by stem-stip proliferation. **Hortiscience**, v.7, n.3, p.289-290, 1972.
- BINNS, A.N. Developmental variation in plant tissue culture. **Environmental and Experimental Botany**, v.21, n.3, p.325-332, 1981.
- BOWEN, H.J.M. Mutations in horticultural chrysanthemums. **Radiation Botany**, v.5, p.695-700, 1965. Supplement.
- BREWBAKER, J.L. Genética na agricultura. São Paulo: Polígono, 1969. cap.7, p.157-180: Mutação.
- BROCK, R.D. When to use mutations in plant breeding. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Manual Mutation Breeding**. Vienna: IAEA, 1977. p.213-219.
- BROERTJES, C. Mutation breeding of chrysanthemums. **Euphytica**, v.15, p.156-162, 1966.
- BROERTJES, C. Significance of *in vitro* adventitious bud techniques for mutation breeding of vegetatively propagated crops. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Induced mutation in vegetatively propagated plants**, II. Vienna: IAEA, 1982. p.1-10.

- BROERTJES, C.; HACCIUS, B.; WEIDLICH, S. Adventitious bud formation on isolated leaves and its significance for mutation breeding. *Euphytica*, v.17, p.321-344, 1968.
- BROERTJES, C.; KEEN, A. Adventitious shoots: do they develop from one cell ?. *Euphytica*, v.29, p.73-87, 1980.
- 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*, v.29, p.525-530, 1980.
- BROERTJES, C.; ROEST, S.; BOKELMANN, G.S. Mutation breeding of *Chrysanthemum morifolium* Ram. Using *in vivo* and *in vitro* adventitious bud techniques. *Euphytica*, v.25, p.11-19, 1976.
- BROERTJES, C.; VAN HARTEN, A.M. **Applied of mutation breeding for vegetatively propagated crops: developments in crop science.** Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing, 1988. v.12. 345p.
- BUSH, S.R.; EARLE, E.D.; LANGHANS, R.W. Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* 'Indianapolis'. *American Journal Botany*, v.63, n.6, p.729-737, 1976.
- CASTRO, C.E.F. **Manual de floricultura.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1992. 280p.
- CATHARINO, E.L.M.; ROCHELLE, L.A.; MANTOVANI, W.; RODRIGUES, R.R. **Apontamentos de Botânica.** Piracicaba: ESALQ, 1984. 118p.

- CONSTANTIN, M.J. Potential of *in vitro* mutation breeding for the improvement of vegetatively propagated crop plants. In: REGIONAL SEMINAR ON THE UTILIZATION OF INDUCED MUTATIONS FOR CROP IMPROVEMENT FOR COUTRIES IN LATIN AMERICA, 1, Lima. 1982. **Induced Mutations for Crop Improvement in Latin America**. VIENNA: IAEA, 1984. p.59-76.
- CUQUEL, F.L. Fisiologia da produção do crisântemo (*Dendranthema grandiflora*). Piracicaba: ESALQ, Dep. de Horticultura, 1997. 44p.
- DATTA, S.K. Gamma ray induced mutant of a mutant of chrysanthemum. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v.14, p.131-132, 1985.
- DATTA, S.K. 'Man Bhawan' - new chrysanthemum cultivar induced by gamma irradiation. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v.16, p.217-218, 1987.
- DATTA, S.K. Gamma irradiation studies on *Dendranthema grandiflora* Tzvelev chrysanthemum cultivar induced by gamma irradiation. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v.21, p.80-83, 1992.
- DATTA, S.K.; BANERJI, B.K. Gamma ray induced somatic mutation in chrysanthemum cv. 'Kalyani Mauve'. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v.22, n.1, p.19-27, 1993.
- DATTA, S.K.; BANERJI, B.K.; GUPTA, M.N. 'Tulika' - a new chrysanthemum cultivar evolved by gamma irradiation. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v.14, p.160, 1985.

DATTA, S.K.; GUPTA, M.N. Somatic flower colour in chrysanthemum cv. 'D-5'. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v.12, p.22-23, 1983.

DATTA, S.K.; GUPTA, M.N. 'Cosmounaut' - a new chrysanthemum cultivar evolved by gamma irradiation. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v.13, p.140, 1984.

DAYTON, D.F. Genetic heterogeneity in the histogenic layers of apple. **Journal American of the Society Horticultural Science**, v.94, n.6, p.592-595, 1969.

DERMEN, H. The pattern of tetraploidy: in the flower and fruit of a cytochimera apple. **Journal Heredity**, v.40, p.30-39, 1953.

DERMEN, H. Nature of Plant Sports. **The American Horticultural Magazine**. v.39, n.3, p.123-173, 1960.

DOMINGUEZ, E.T. Cultura de tecidos visando o melhoramento de bananeira (*Musa spp.*) através de indução de mutação. Piracicaba, 1992.199p. Dissertação(Mestrado)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

DONINI, B. Mutagenesis applied to improve fruit trees. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Induced mutation in vegetatively propagated plants**, II. Vienna: IAEA, 1982. p.29-36.

DONINI, B; MICKE, A. Use of mutations in improvement of vegetatively propagated crops. In: REGIONAL SEMINAR ON THE UTILIZATION OF INDUCED MUTATIONS FOR CROP IMPROVEMENT FOR COUTRIES IN LATIN AMERICA, 1, LIMA. 1982. **Induced Mutations**

- for Crop Improvement in Latin America. VIENNA: IAEA, 1984. p.79-98.**
- DOWRICK, G.J. The chromossomes of chrysanthemum I: the species. **Heredity**, v.6, p.365-375, 1952.
- DOWRICK, G.J. The chromossomes of chrysanthemum II: garden varieties. **Heredity**, v.7, p.59-72, 1953.
- DOWRICK, G.J.; EL BAYOUMI. The origin of new forms of the garden chrysanthemum. **Euphytica**, v.15, p.32-38, 1966a.
- DOWRICK, G. J.; EL BAYOUMI. The induction of mutations in chrysanthemum using X and gamma radiation. **Euphytica**, v.15, p.204-210, 1966b.
- EARLE, E.D.; LANGHANS, R.W. Propagation of chrysanthemum *in vitro*: I. Multiple plantlets from shoot tips the establishment of tissue cultures. **Journal American of the Society Horticultural Science**, v.99, n.2, p.128-132, 1974a.
- EARLE, E.D.; LANGHANS, R.W. Propagation of chrysanthemum *in vitro*: II. Production, growth, and flowering of plantlets from tissue cultures. **Journal American of the Society Horticultural Science**, v.99, n.4, p.352-358, 1974b.
- EISENLOHR, H. Dosimetry. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Manual on Mutation Breeding**. Vienna: IAEA, 1977. p.28-32.

FERRI, M.G. **Fisiologia vegetal**. São Paulo: EPU/EDUSP, 1979. v.2, p.1-392.

FUJII, T.; TANO, S. Mutagenic activities of EMS on somatic (M_1) and recessive (M_2) mutations in the soybean test system. **Environmental and Experimental Botany**, v.26, p.191-195, 1986.

GATTI, E.U. A evolução recente do comércio de produtos da floricultura no Brasil. **Agricultura em São Paulo**, v.38, n.3, p.101-117, 1991.

GRIFFITHS, M. **Index of garden plants: the new royal horticultural society dictionary**. 4ed. London: Macmillan, 1987. 1234p.

GUPTA, M.N.; JUGRAN, H.N. Mutation breeding of chrysanthemum ii. dection of gamma ray induce somatic mutation in vM2. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v.24, p.50-54, 1978.

GUZEWSKI, W.; MUSZYNSKI. Mutation induction in chrysanthemums by gamma-rays treatment of rooted cuttings. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v.17, p.117-119, 1988.

HATTORI, K. Inheritance of anthocyanin pigmentation in flower color of chrysanthemum. **Japanese Journal Genetics**, v.67, p.253-258, 1992.

HANDRO, W. Mutagenesis and *in vitro* selection. In: THORPE, T. A. **Plant tissue culture; methods and applications in agriculture**. New York: Academic Express, 1981. p.155-180.

HENRIQUES, P.J.A; QUEROL, B.C. Base molecular das mutações. In: Costa, S.O.P. **Genética Molecular e de microorganismos: os**

- fundamentos da engenharia genética. São Paulo: Manole, 1987. cap.8, p.117-134.
- HILL, G.P. Shoot formation in tissue cultures of chrysanthemum 'Bronze Pride'. *Physiologia Plantarum*, v.21, p.386-389, 1968.
- HORN, W. Treating *in vitro* cultures of floriculture crops with mutagens. *Mutation Breeding Newsletter*, n.24, p.13-15, 1984.
- ICHIKAWA, S.; KANAI, H.; HARADA, H. Somatic mutation in *Tradescantia* stamen hairs treated with aqueous solution of ethyl methanesulfonate and methyl methanesulfonate. *Japanese Journal Genetic*, v.65, p.309-321, 1990.
- ICHIKAWA, S.; YAMAKAWA, K.; SEKIGUCHI, F.; TATSUNO, T. Variation in somatic chromosome number found in radiation - induced mutants of *Chrysanthemum morifolium* Hemsl. cv. 'Yellow Delaware' and 'Delaware'. *Radiation Botany*, v.10, p.557-562, 1970.
- JONG, J.; CUSTERS, J.B.M. Induced changes in growth and flowering of chrysanthemum after irradiation and *in vitro* culture of pedicels and petal epidermis. *Euphytica*, v.35, p.137-148, 1986.
- KAUL, V.; MILLER, R.M.; HUTCHINSON, J.F.; RICHARDS, D. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.21, p.21-30, 1990.
- KHALID, N.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. An assessment of somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium*: the generation of plants of

potential comercial value. **Scientia Horticulturae**, v.38, p.287-294, 1989.

LAZARTE, J.E. Use of *in vitro* propagation for crop improvement. In: REGIONAL SEMINAR ON THE UTILIZATION OF INDUCED MUTATIONS FOR CROP IMPROVEMENT FOR COUTRIES IN LATIN AMERICA, 1, LIMA. 1982. **Induced Mutations for Crop Improvement in Latin America**. VIENNA: IAEA, 1984. p.323-332.

LANGHTON, F.A. Chimerical structure and carotenoid inheritance in *Chrysanthemum morifolium*. **Euphytica**, v.29, p.807-812, 1980.

LATADO, R.R. Indução e uso de mutações *in vivo* e *in vitro* no melhoramento do *Chrysanthemum morifolium* Ram. Piracicaba, 1993. 103p. Dissertação(Mestrado)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

LATADO, R.R.; ADAMES, A.H.; RODRIGUES, B.I.P.; TULMANN NETO, A.; Indução de embriogênese somática em folhas de crisântemo cv. 'Ingrid'. **Revista Brasileira de Genética**, v.20, n.3, p.191, 1997. Suplemento. / Apresentado ao 43. Congresso Nacional de Genética, Goiânia, 1997-Resumo/

LATADO, R.R.; TULMANN NETO, A.; MENDES, B.M.J. Melhoramento de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) cv. 'Repin Rosa', através da indução de mutação *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, n.7, p.489-496, 1996.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. São Paulo: Plantarum, 1995. p.283.

- MALUSZYNSKI, M; AHLOOWALIA, B.S.; SIGURBJÖRNSSON, B. Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. **Euphytica**, v.85, p.303-315, 1995.
- MATSUNAGA, M. Floricultura como alternativa econômica na agricultura. **Informações Econômicas**, v.25, n.11, p.94-98, 1995.
- MICKE, A.; DONINI, B.; MALUSZYNSKI, M. Induced mutations for crop improvement. **Mutation Breeding Review**, v.7, p.1-41, 1990.
- MIRANDA, M.C.; MATSUNAGA, M.; OKUYAMA, A.R. Sistema de cultivo e custo operacional de produção de crisântemos. **Agricultura em São Paulo**, v.41, n.1, p.103-124, 1994.
- NABORS, M.W. Using spontaneously occurring and agriculturally useful plants. **BioScience**, v.26, n.12, p.761-768, 1976.
- OLIVETTI, M.P.A.; TAKAES, M.; MATSUNAGA, M. Perfil da produção das principais flores de corte no estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, v.24, n.7, p.31-54, 1994.
- PARODI, P.C.P. La inducción de mutaciones: herramienta en el mejoramiento genético del trigo (*Triticum* sp.) In: REGIONAL SEMINAR ON THE UTILIZATION OF INDUCED MUTATIONS FOR CROP IMPROVEMENT FOR COUTRIES IN LATIN AMERICA, 1, Lima. 1982. **Induced Mutations for Crop Improvement in Latin America**. VIENNA: IAEA, 1984. p.79-98.
- POPHAM, R.A.; CHAN, A.P. Zonation in the vegetative stem tip of *Chrysanthemum morifolium* Bailey. **American Journal of Botany**, v.37, p.476-484, 1950.

PURDOM, C.E. **Genetic effects of radiations.** New York: Academic Express, 1963. 173p.

RENDLE, A.B. **The classification of flowering plants: dicotyledons.** Cambridge: Macmillan, 1938. 2v., 640p.

REVISTA NATUREZA. Compostas: a maior das famílias. São Paulo, v.68, set. 1993. 88p.

ROCHELLE, L.A.; RODRIGUES, R.R.; CAPELLARI, L.J. **Família de plantas fanerogâmicas de interesse econômico.** Piracicaba: ESALQ, Dep. Botânica, 1991. 51p.

ROEST, S.; BOKELMANN, G.S. Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.3, p.317-330, 1975.

ROGERO, R.J; NASCIMENTO, N. do. Atenuação da toxicidade de venenos ofídicos por meio da radiação ionizante. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, n.2, p.24-26, 1997.

SHARMA, D.K.; MAJUMDER, P.K.; SINGH, R.N. Induction of mutation in mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, v.12, p.14-17, 1983.

SATINA, S.; BLAKESLEE, A.F. Periclinal chimeras in *Datura stramonium* in relation to development of leaf and flower. **American Journal of Botany**, v.28, p.862-871, 1941.

- SMILANSKY, Z.; UMIEL, N.; ZIESLIN, N. Mutagenesis in roses (cv. 'Mercedes'). **Environmental and Experimental Botany**, v.26, p.279-283, 1986.
- SOUZA, H.M. Crisântemos: clássicas plantas ornamentais. **O Estado de São Paulo. Suplemento Agrícola**, São Paulo, 18 set. 1957. p.1
- SPARROW, A.H.; ROGERS, A.F.; SCHWEMMER, S.S. Radiosensitivity studies with woody plants-I. Acute gamma irradiation survival data for 28 species and predictions for 190 species. **Radiation Botany**, v.8, p.149-185, 1968.
- STEWART, R.N.; DERMEN, H. Determination of number and mitotic activity of shoot apical initial cells by analysis of mericlinal chimeras. **American Journal Botany**, v.57, p.816-826, 1970a.
- STEWART, R.N.; DERMEN, H. Somatic genetic analysis of the apical layers of chimera sports in chrysanthemum by experimental production of adventitious shoots. **American Journal Botany**, v.57, p.1061-1071, 1970b.
- STEWART, R.N.; DERMEN, H. Ontogeny in monocotyledons as revealed by studies of the developmental anatomy of periclinal chloroplast chimeras. **American Journal Botany**, v.66, n.1, p.47-58, 1979.
- STRASBURGER, E.; NOLL, F.; SCHENCK, H.; SCHIMPER, A.F.W. **Tratado de botânica**. Barcelona: Omega, 1988. p.486-914: Evolução e sistemática.

TULMANN NETO, A.; ANDO, A.; MENDES, B.M.J. Ampliação da variabilidade genética em algumas frutíferas através da indução de *mutações in vivo e in vitro*. In: SIMPÓSIO LATINOAMERICANO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS DE ESPÉCIES HORTÍCOLAS I, Campinas, 1989. *Anais*. Campinas: Cargill, 1990. p.148-169.

TULMANN NETO, A.; LATADO, R.R. 'Cristiane' and 'Ingrid': First chrysanthemum cultivars obtained by mutation induction in Brazil. *Mutation Breeding Newsletter*, v.42, p.18, 1996.

TULMANN NETO, A.; LATADO, R.R. Indução de mutação *in vivo*, no melhoramento de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) cv. 'Repin Rosa'. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.32, n.11, p.1153-1158, 1997.

TULMANN NETO, A.; MENDES, B.M.J.; ANDO, A. Indução e uso de mutação *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPH, 1990. p.341-378.

VAN HARTEN, A.M. Mutation breeding in vegetatively propagated crops with emphasis on contributions from the Netherlands. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE MUTATION AND POLYPLOIDY OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR RESEARCH OF PLANT BREEDING, Wageningen, 1981. **Induced Variability in Plants Breeding**. Netherlands: Pudoc, , 1982. p.22-30.

WASSCHER, J. The importance of sports in some florist's flowers. *Euphytica*, v.5, p.163-170, 1956.

WEAVER, G.M. The effect of cesium 137 gamma radiation on plant growth flower color of greenhouse chrysanthemum varieties. **Canadian Journal Genetics and Cytological**, v.5, p.73-82, 1963.

YAMAGUCHI, H. **Fundamentos de indução de mutação no melhoramento de plantas.** Piracicaba: ESALQ, 1980. 2v.