

INDUÇÃO DE MUTAÇÃO *IN VIVO*, NO MELHORAMENTO DE CRISÂNTEMO (*DENDRANTHEMA GRANDIFLORA* TZVELEV) CV. REPIN ROSA¹

AUGUSTO TULMANN NETO² e RODRIGO ROCHA LATADO³

RESUMO - Objetivou-se adaptar e utilizar o método de indução de mutação por irradiação no melhoramento de crisântemo, para a obtenção de mutantes na coloração de pétalas da cultivar Repin Rosa. Mudanças obtidas a partir de estacas enraizadas foram submetidas a irradiação com 20 Gy de raios-gama, aplicando-se a seguir o método de podas repetidas para avanço das gerações, antes da seleção dos mutantes. Observou-se uma frequência de 5,80% de mutantes para coloração de pétalas. Dentre as várias colorações obtidas, os mutantes de cor branca e rosa-escuro foram selecionados, considerando-se a preferência do mercado consumidor, e incluídos em ensaios de produção e avaliação pós-colheita. Os resultados indicaram que, com exceção da altura de planta do mutante de cor branca, que foi menor, as demais características agrônômicas foram semelhantes às da cultivar original. Estes mutantes foram multiplicados e lançados no comércio; o de cor branca foi denominado Cristiane, e o de cor rosa-escuro, Ingrid. Trata-se do primeiro exemplo de plantas ornamentais obtidas por indução de mutação no Brasil.

Termos para indexação: irradiação sobre mudas, raios-gama, mutantes.

INDUCTION OF *IN VIVO* MUTATION IN CHRYSANTHEMUM (*DENDRANTHEMA GRANDIFLORA* TZVELEV) CV. PINK REPIN BREEDING

ABSTRACT - Mutation induction was used with the objective of obtaining mutants for flower colour of chrysanthemum, cv. Repin (pink colour). Rooted cuttings were irradiated with 20 Gy of gamma rays and before the selection the cutting back method was used to advance the generations. The frequency of colour mutants observed was 5.8%. Among the mutants obtained the white and dark-pink-coloured ones were evaluated in yield trial and post-harvest. The results indicated that these mutants maintained the same agronomical characteristics showed by the control, with the exception of plant height in the white mutant that was shorter. Due to commercial interest of the producers, these mutants were multiplied and released as new cultivars. The white flower colour mutant was named Cristiane and the dark-pink, Ingrid. This was the first example of cultivars from an ornamental plant released by mutation breeding in Brazil.

Index terms: plant breeding, irradiation of rooted cuttings, gamma-rays, mutants.

¹ Aceito para publicação em 21 de julho de 1997.

Extraído da Dissertação apresentada pelo segundo autor para obtenção do grau de Mestre em Agronomia. ESALQ/USP, Piracicaba. Financiada parcialmente pela FAPESP.

² Eng. Agr., Dr., Seção de Radiogenética, CENA/USP, Caixa Postal 96, CEP 13400-970 Piracicaba, SP. Bolsista do CNPq.

³ Eng. Agr., M.Sc., Seção de Radiogenética, CENA/USP. Bolsista do CNPq.

INTRODUÇÃO

O crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) é uma planta ornamental de destacada posição no comércio mundial (Kampf et al., 1990) e o Brasil participou com significativo volume de exportações – em torno de US\$ 6 milhões – em 1986 (Cacex, 1987).

A obtenção de novas cultivares através de mutações somáticas possibilita uma ampliação na oferta de cores e formatos das flores colocadas à disposição do mercado.

A literatura revela que o crisântemo é a espécie em que se obteve o maior número de cultivares mediante mutagenese induzida (169), e que esta técnica é comumente utilizada por melhoristas em vários países (Mickey et al., 1990). Segundo Broertjes & Van Harten (1988), quando se usa mutação induzida, a melhor estratégia é obter variedades por cruzamentos, e, a partir destas, produzir uma família de mutantes de cor, forma ou tamanho de inflorescência. As cultivares de crisântemo de cor rosa são as que têm produzido as maiores frequências de mutantes para outras colorações. Os resultados indicam que se pode modificar a coloração da inflorescência destas cultivares sem alterar substancialmente outras características agrônômicas (Broertjes, 1966).

A mutagênese induzida *in vivo* em crisântemo consiste no tratamento mutagênico de mudas obtidas de estacas enraizadas, estacas sem raízes ou até em plantas envasadas. A irradiação sobre meristemas multicelulares apicais e axilares pode causar o aparecimento de setores mutados, como, por exemplo quimeras mericlinais. A técnica de podas repetidas em plantas submetidas a irradiação tem como objetivo resgatar ou ampliar estes setores quiméricos até o momento em que a planta se mostre uniforme quanto à característica mutada, como no caso de uma quimera periclinal (Broertjes et al., 1980, 1983; Datta, 1987).

O crisântemo é de grande importância para o Brasil, e o sucesso observado em outros países com trabalhos de indução de mutação nesta espécie foi notável.

Realizou-se este trabalho objetivando a obtenção de mutantes de cor da inflorescência de crisântemo 'Repin Rosa', por meio de raios-gama.

MATERIAL E MÉTODOS

A cultivar Repin Rosa, de cor rosa claro, foi escolhida por ter ótimas qualidades agronômicas, como: grande durabilidade pós-colheita, alta produtividade, resistência a doenças, e possuir grande aceitação comercial no mercado brasileiro. No entanto, o espectro de cor desta cultivar é muito pequeno, ou seja: encontram-se apenas colorações rosa-claro, bronze e champanhe. A obtenção de mutantes com outras colorações seria de grande interesse, desde que fossem mantidas as outras características agronômicas típicas da cultivar.

Radiossensibilidade em mudas à raios-gama

Mudas obtidas de estacas enraizadas, com 10 cm de altura, contendo cerca de seis gemas axilares cada, foram submetidas a raios-gama na fonte de ^{60}Co do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, SP, com as doses de 0; 12,5; 17,5; 22,5 e 27,5 Gy (taxa de dose de 200 Gy/h). As bases das mudas foram protegidas dos efeitos da radiação com cilindros de ferro.

O experimento foi instalado em canteiros, dentro de estufas comerciais de produção de ornamentais, em Holambra, SP, com delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições e cada parcela composta por 25 plantas. As plantas foram colocadas sob condições de fotoperíodo longo (dezesseis horas de luz/oito horas de escuro), para estimular o crescimento vegetativo. A avaliação da radiossensibilidade foi feita 30 dias após o plantio, pela porcentagem de sobreviventes, pelo número de ramos por planta e pela altura das plantas.

Para efeito de análise estatística, os dados da porcentagem de sobrevivência e do número de ramos foram transformados, a saber: no primeiro caso, a equação utilizada foi o arco seno da raiz quadrada de $X/100$; e no segundo caso, a raiz quadrada de $(X + 0,5)$. Os dados da variável altura da planta não sofreram transformação. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Irradiação sobre plantas-matrizes, seguida da técnica de podas repetidas para avanço de gerações

Após a determinação da sensibilidade, foi realizada a irradiação sobre 500 mudas, com 10 cm de altura e dose de 20 Gy de raios-gama, de modo semelhante ao acima descrito, mantendo-se 100 mudas não-irradiadas como controle. As mudas foram plantadas em solo sob condições de fotoperíodo longo. Estas plantas foram utilizadas somente para a produção de mudas, e denominadas plantas-matrizes.

Quando as plantas-matrizes apresentavam altura média de 30 cm, foi feita a aplicação do método das podas repetidas. A primeira poda foi realizada com a retirada da parte apical, e causou a quebra de dominância apical na planta-matriz. Em cada matriz foi permitido o desenvolvimento de três gemas axilares de posição inferior na planta. Estas gemas axilares, até então dormentes, se desenvolveram, formando três ramos, denominados M1V1.

Após o período de 15 dias, a aplicação de podas nestes ramos (M1V1) possibilitou o desenvolvimento de ramos M1V2, e apenas a um ramo M1V2 originado de cada ramo M1V1 foi permitido desenvolver-se. A eliminação dos ramos foi feita ao acaso. A planta-matriz foi sempre conduzida com o total de três hastes, e o procedimento foi repetido até a geração M1V6.

Os ramos das diversas gerações, retirados com a poda, constituíram-se em estacas para a obtenção de novas mudas; as plantas obtidas com o plantio destas mudas é que foram avaliadas para a seleção de mutantes.

Após o enraizamento das estacas, as mudas obtidas das diferentes gerações foram plantadas em estufas, com canteiros de 1,20 m de largura e espaçamento de 10 cm entre plantas, sob condições de fotoperíodo longo, até o tamanho de aproximadamente 30 cm de altura. Logo após, o fotoperíodo da estufa foi modificado para fotoperíodo curto (nove horas de luz/quinze horas de escuro), para induzir o florescimento, utilizando-se cobertura de plástico preto para escurecer o ambiente da estufa.

A avaliação foi feita no período de florescimento, com a contagem do número de mutantes de coloração e formato da inflorescência.

Estabilidade da coloração das flores e ensaio de produtividade de mutantes de interesse

Após a seleção de mutantes com interesse comercial, testou-se a estabilidade da coloração das flores, a produtividade, o ciclo de cultivo e a conservação pós-colheita. Para isto, foram multiplicados os mutantes selecionados, por meio da subdivisão dos ramos das plantas em estacas que continham uma ou mais gemas axilares. Estas foram colocadas em substrato de enraizamento (casca de arroz calcinado e esterilizado por vapor) por 15 dias, e mantidas sob condições de fotoperíodo longo, para favorecer o crescimento vegetativo, e obtiveram-se mudas para o ensaio de produtividade.

O ensaio foi instalado em canteiros dentro de estufas, em blocos ao acaso, com quatro repetições e três tratamentos ('Repin rosa' como controle e mutantes de cor branca e rosa-escuro), e cada parcela era constituída de 50 plantas.

As mudas foram plantadas e mantidas sob condições de fotoperíodo longo, até o tamanho de 30 cm de altura, e o fotoperíodo da estufa foi modificado para nove horas de luz/quinze horas de escuro, para induzir o florescimento das plantas. As medidas tomadas por ocasião do florescimento foram: altura média das plantas, número de dias do ciclo, produtividade expressa em peso fresco de dez plantas, e número de flores abertas por planta.

Para avaliar se os mutantes obtidos mantiveram as características da cultivar original, quanto à conservação pós-colheita, utilizou-se o sistema empregado pelo agricultor em cujo terreno foi realizada esta pesquisa. Foram colhidos cinco ramalhetes de flores dos três materiais em avaliação, e cada ramalhete, formado por 20 hastes com altura média de 80 cm. Foram retiradas as folhas dos primeiros 10 cm da parte basal das hastes, e os ramalhetes foram colocados em recipiente com água, que foi trocada a cada três dias, até o início da senescência. A durabilidade pós-colheita foi avaliada pela contagem do número de dias decorridos entre o corte das hastes e o início da senescência.

A estabilidade da coloração dos mutantes selecionados foi avaliada pelo seu cotejo com a coloração das flores da variedade inicial e com a coloração individual das pétalas de todas as suas inflorescências. Considerou-se que o mutante apresentava estabilidade quando mantinha a mesma coloração e não havia quimerismo nas pétalas, ou seja, todas as pétalas de todas as inflorescências apresentavam um único tipo de coloração (branca ou rosa-escuro).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Radiossensitividade das mudas

Observou-se, como esperado, que as mudas provenientes dos tratamentos com as doses mais elevadas, especialmente com 27,5 Gy, apresentaram os efeitos fisiológicos típicos, tais como redução no crescimento e folhas pequenas e deformadas, que se mostravam quebradiças e com pontos cloróticos.

Na Tabela 1 encontram-se os resultados obtidos no tocante a sobrevivência, a número de ramos e a altura das plantas, nas diferentes dosagens de raios-gama. Como pode ser observado, as doses não afetaram a sobrevivência das mudas aos 30 dias. Quanto ao número de ramos por planta, como se verifica pelo teste de Tukey, as doses de 17,5 e 22,5 Gy induziram a um aumento significativo. Isto pode ser explicado por danos que estas doses maiores causaram no meristema apical. Como consequência, houve uma restrição da dominância apical, causando maior brotação das gemas axilares, até então dormentes, e obteve-se maior número de ramos.

Observa-se que o teste F referente a altura das plantas mostrou-se significativo, e o teste de Tukey indica que houve redução na altura a partir de 17,5 Gy.

Com base nestes dados, decidiu-se escolher, para a continuação do trabalho, a dose de 20 Gy. Isto porque, como se observou pela Tabela 1, entre 17,5 e 22,5 Gy situa-se a dose que causa redução média de 50% na altura das plantas aos 30 dias de plantio.

Vários autores descrevem o uso de doses semelhantes, em trabalhos de indução de mutações *in vivo* com crisântemo. Bowen (1965), Gupta & Jugran (1978) e Datta (1987) usaram doses entre 15 e 25 Gy, e obtiveram mutantes de inflorescência. Ichikawa et al. (1970) usaram doses bem mais altas, em torno de 50 a 200 Gy de raios-gama, mas com taxas de dose baixas, e realizaram irradiação por vários dias para alcançar estas doses. Broertjes & Van Harten (1988), numa extensa revisão, relatam que a dose ótima para mudas enraizadas se situa entre 10 e 20 Gy de raios-X ou raios-gama.

TABELA 1. Percentagem de sobrevivência, número médio de ramos por planta e altura média das mudas de crisântemo ‘Repin Rosa’. Avaliação aos 30 dias após a irradiação sobre plantas com raios-gama¹.

Doses (Gy)	Sobrevivência (%)	Nº de ramos	Altura das plantas (cm)
0,0	87,11	0,73b	86,5a
12,5	84,23	0,77b	83,8a
17,5	85,89	0,79b	70,1b
22,5	87,11	1,27a	39,8c
27,5	90,00	1,12a	8,9d
F	0,5ns	23,1**	455,3 **
CV (%)	6,7	10,8	5,4

¹ Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Irradiação sobre plantas-matrizes, seguida da técnica de podas repetidas

A Tabela 2 apresenta os resultados do número e freqüência de mutantes e da cor e forma de inflorescência, obtidos nas gerações produzidas a partir da técnica de podas repetidas da planta matriz. A freqüência total de mutantes nas plantas provenientes de irradiação foi de 5,98%, ao passo que nas plantas do controle não foram observados mutantes. Broertjes (1966) relata a obtenção de freqüência total de mutantes em torno de 22%, referente à dose de 20 Gy de raios-X; isto indica que diferentes variedades podem apresentar respostas distintas para a mesma dosagem de mutagênico. Esta conclusão é cabível, pois apesar de os mutagênicos envolvidos serem diferentes, nos dois trabalhos utilizou-se a mesma unidade (Gy, dose de exposição à radiação) para a especificação das doses.

Foram observadas plantas mutantes nas seguintes colorações: bronze, champanhe, rosa-escuro, creme, amarelo, marrom avermelhado, e rajado, nas cores branco e rosa. Quanto à forma da inflorescência, foram obtidos mutantes com pétalas mais abertas, pétalas tubulares, menor número de pétalas e flores com pétalas disformes, todos sem interesse comercial.

A freqüência total de mutantes obtida pode ser considerada alta, porque nos controles não foram obtidos mutantes, e também porque em ensaios preliminares com cultivares de outras colorações (amarela, branca) foram obtidas freqüências menores de mutantes. Comprovam-se, assim, os resultados de outros autores que afirmam que as cultivares de cor rosa são os melhores materiais iniciais para produzir mutantes de coloração (Broertjes, 1966).

As mutações de cor em ‘Repin Rosa’ foram responsáveis por 97% do total de mutantes obtidos; apenas 3% dos mutantes possuíam a inflorescência com o formato diferente. Broertjes (1966) encontrou freqüência de mutantes na morfologia entre 12 e 15% do total, usando doses entre 15 e 25 Gy de raios-X. Ichikawa et al. (1970) encontraram três mutantes de forma de inflorescência em doze plantas irradiadas com a dose de 200 Gy de raios-gama; em doses menores (50 e 100 Gy) não foram obtidos mutantes de formato. Esses autores concluem que altas doses devem ser usadas com o objetivo de produção de mutantes de forma de inflorescência, enquanto baixas doses devem ser preferidas para a indução de mutações da cor da inflorescência. Deste modo, a dose utilizada na presente pesquisa, na qual se objetivava apenas a obtenção de mutantes de cor, demonstrou ser adequada para a cultivar Repin Rosa.

Observou-se que, à medida que avançaram as gerações por meio das podas repetidas até a M1V6, ocorreu uma diminuição do quimerismo nas cores das pétalas de plantas oriundas de uma mesma planta matriz, o que concorda com as afirmações de Latado (1993).

TABELA 2. Número e frequência de mutantes de cor e forma das inflorescências da cultivar Repin Rosa, avaliados no florescimento das diversas gerações obtidas pelo método de podas repetidas, após a irradiação das plantas com 20 Gy de raios-gama.

Dose (Gy)	Nº de plantas	Nº de mutantes observados na inflorescência			
		Cor	(%)	Forma	(%)
0	1609	0	0	0	0
20	7764	450	5,80	14	0,18

Estabilidade da coloração das flores e produtividade dos mutantes selecionados

Dos mutantes de cor de pétalas, foram selecionados, em vista de maior interesse comercial, os de cor branca e rosa-escuro, que foram avaliados em ensaio de produção juntamente com a cultivar Repin Rosa.

Os dados obtidos com a avaliação dos parâmetros ciclo, número de flores abertas por planta, altura média da planta, peso fresco de dez plantas e avaliação da conservação pós-colheita, estão expressos na Tabela 3. Pode-se observar que quase não houve diferenças com relação ao ciclo, notando-se apenas certa precocidade do mutante de cor branca (três dias), com florescimento aos 91 dias do plantio.

O número de flores abertas por planta também não foi alterado nos mutantes, e as médias observadas ficaram em torno de sete flores por planta.

Na altura das plantas, observou-se a existência de diferença significativa entre o mutante de cor branca e o controle, ou seja: o de cor branca era de altura menor. O mutante rosa-escuro não apresentou diferença significativa em relação ao controle.

Os dados demonstram não haver diferenças significativas entre a cultivar original e os mutantes, quanto ao parâmetro peso fresco de dez plantas, apesar da tendência de os mutantes apresentarem peso fresco menor.

A importância da avaliação da produtividade pelo parâmetro peso fresco de dez plantas está no fato de a espécie ser bastante comercializada na forma de maços de 0,5 kg de peso fresco; então, quanto menor o peso de cada planta, maior o número de plantas por maço, o que constitui característica indesejável.

Com relação à conservação pós-colheita, observa-se, pelos resultados, que todos os materiais em avaliação demoraram em torno de dez dias para a senescência das flores. Isto demonstra que houve a manutenção desta característica nos mutantes, fato este de importância para a sua comercialização.

Os dois mutantes apresentaram estabilidade para a coloração selecionada, isto é, as pétalas das inflorescências de todas as plantas apresentaram um único tipo de coloração (branca ou rosa-escuro), e tal coloração foi semelhante à obtida quando da seleção dos mutantes.

O produtor que acompanhou a pesquisa fez várias multiplicações dos dois mutantes, verificando o seu comportamento em diferentes épocas de cultivo. Com base nos resultados do ensaio de produção e nas observações que foram sendo acumuladas, considerou-se que os dois mutantes poderiam ser liberados para o comércio: o de cor branca foi denominado Cristiane, e o de cor rosa-escuro, Ingrid. Estas novas cultivares foram comercializadas tanto para venda de flores cortadas, como na forma de mudas para outros produtores de crisântemo. Trata-se do primeiro exemplo, no Brasil, de uma planta ornamental em que foram obtidas cultivares por mutação induzida.

TABELA 3. Ciclo, número de flores abertas por planta, altura média das plantas, peso fresco de dez plantas e número de dias para senescência das flores dos mutantes de cor branca e rosa-escuro, originados da cultivar Repin Rosa¹.

Material	Ciclo (dias)	Nº flores/planta	Altura das plantas (cm)	Peso fresco 10 plantas (g)
Repin	94	7,20	123,0a	615,83
Rosa-escuro	94	7,16	119,9a	542,50
Branca	91	7,02	98,5b	535,42
F		1,99ns	36,18**	1,63ns
CV (%)		38,72	3,30	17,67

¹ Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

1. Com a aplicação de 20 Gy de raios-gama, seguida de podas repetidas, pode-se obter 5,80% de mutantes na coloração e 0,18% na forma da inflorescência.

2. O ciclo, número de flores por planta, altura, peso fresco e conservação pós-colheita dos mutantes de cor branca e rosa-escuro são semelhantes aos da cultivar original, com exceção da altura da planta do mutante de cor branca, que é menor.

3. É efetivo o método de podas repetidas para ampliar o setor mutado, no tocante à coloração das pétalas.

REFERÊNCIAS

- BOWEN, H.J.M. Mutation in horticultural chrysanthemums. **Radiation botany**, v.5, p.695-700, 1965.
- BROERTJES, C. Mutation breeding of chrysanthemum. **Euphytica**, Wageningen, v.15, p.156-162, 1966.
- BROERTJES, C.; VAN HARTEN, A. **Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops**. Amsterdam: Elsevier Sci., 1988. 345p.
- BROERTJES, C.; KOENE, P.; VAN VEEN, J.W.H. A mutant of a mutant of a mutant of a ...: Irradiation of progressive radiation-induced mutants in a mutation breeding programme with *Chrysanthemum morifolium* Ram. **Euphytica**, Wageningen, v.29, p.525-530, 1980.
- BROERTJES, C.; KOENE, P.; PRONK, T. Radiation-induced low-temperature tolerant cultivars of *Chrysanthemum morifolium* Ram. **Euphytica**, Wageningen, v.32, p.97-101, 1983.
- CACEX. Mercado das flores. **Informativo Semanal da Cacex (Banco do Brasil)**, Rio de Janeiro, v.22, p.4-13, 1987.
- DATTA, S.K. 'Man Bhawan' new chrysanthemum cultivar induced by gamma irradiation. **Journal of Nuclear Agriculture Biology**, v.16, p.217-218, 1987.
- GUPTA, M.N.; JUGRAN, H.M. Mutation breeding of chrysanthemum II. Detection of gamma ray induced somatic mutations in vM2. **Journal of Nuclear Agriculture Biology**, v.7, p.50-54, 1978.
- ICHIKAWA, S.; YAMAKAWA, K.; SEKIGUCHI, F.; TATSUNO, T. Variation in somatic chromosome number found in radiation induced mutants in *Chrysanthemum morifolium* cv. Yellow delaware and Delaware. **Radiation Botany**, v.10, p.557-562, 1970.
- KAMPF, E.; BAJAK, E.; JANK, M.S. O Brasil no mercado internacional de flores e plantas ornamentais. **Informe GEP/DESR**, Piracicaba, v.3, p.3-11, 1990.
- LATADO, R.R. **Indução e uso de mutações "in vivo" e "in vitro" no melhoramento do *Chrysanthemum morifolium* Ram**. Piracicaba: ESALQ-USP, 1993. 103p. Tese de Mestrado.

MICKE, A.; DONINI, B.; MALUSZYNSKI, M. Induced mutations for crop improvement. **Mutation Breeding Review**, v.7, p.1-41, 1990.