

MELHORAMENTO DE CRISÂNTEMO (*DENDRATHERMA GRANDIFOLIA* TZVELEV.) CV. REPIN ROSA, ATRAVÉS DA INDUÇÃO DE MUTAÇÃO *IN VITRO*¹

RODRIGO ROCHA LATADO², AUGUSTO TULMANN NETO³ e BEATRIZ M.J. MENDES⁴

RESUMO - Objetivou-se adaptar e utilizar o método de indução de mutação *in vitro* no melhoramento de crisântemo, mediante a irradiação de pedicelos de botões florais imaturos da cultivar Repin rosa, com raios-gama. Após a determinação do melhor meio de cultura para a regeneração e enraizamento dos pedicelos, e a determinação da sensibilidade, realizou-se a irradiação com 8 Gy de raios-gama. As plantas regeneradas foram avaliadas no campo, durante a época de florescimento. No controle não apareceram mutantes, e nas plantas provenientes do tratamento foram selecionados 46 mutantes de coloração da inflorescência (cores bronze, champanhe, rosa-escuro e rosa mais claro que o controle) e um mutante com folhas variegadas. Todos os mutantes de coloração apresentaram um único tipo de cor de inflorescência, o que evidencia que o método é eficiente para a produção de mutantes periclinais ou sólidos, em crisântemo.

Termos para indexação: pedicelos, mutantes, cultura de tecidos, irradiação.

IN VITRO MUTATION BREEDING OF CHRYSANTHEMUM (*DENDRATHERMA GRANDIFOLIA* TZVELEV.) CV. PINK REPIN

ABSTRACT - This study aimed to adapt and utilize *in vitro* mutagenesis technology for genetic improvement of chrysanthemum. Pedicels were obtained from immature floral buds of chrysanthemum cv. pink Repin, and sensitivity to gamma radiation was determined. Pedicels were then irradiated at a dose of 8 Gy of gamma-rays. The irradiated and non-irradiated control pedicels were cultured under previously determined organogenesis culture medium. Plants regenerated were grown in the greenhouse and the evaluation was done during the flowering period. Forty six mutants for flower colour were selected from the irradiated pedicels (colours: bronze, champagne, dark pink and pale pink), and another mutant showed variegated leaves. Each colour mutant developed inflorescences with a single colour, indicating that the method is efficient for the obtention of periclinal or solid mutants, in chrysanthemum.

Index terms: tissue culture, irradiation, mutagenesis, mutant, pedicels.

INTRODUÇÃO

Dentre as plantas ornamentais, as cultivares de crisântemo (*Dendratherma grandifolia* Tzvelev.) se

apresentam com uma porcentagem expressiva na demanda mundial de flores de corte, importância esta também constatada no Brasil (Kampf et al., 1990).

As técnicas de mutagênese induzida, nesta espécie, têm possibilitado a ampliação do número de cultivares disponíveis ao consumidor. Segundo Micke et al. (1990), das 409 novas cultivares de plantas ornamentais obtidas por indução de mutações, 169 (41,3%) eram de crisântemo, o que demonstra a utilidade deste método no melhoramento desta cultura. De fato, métodos de indução de mutações já são rotineiramente aplicados nesta planta ornamental em diversos países, e uma das razões para isto é que a detecção dos mutantes pode ser facilmente visualizada em caracteres tais como cor, forma e tamanho da inflorescência.

¹ Aceito para publicação em 9 de maio de 1996.

Extraído da Dissertação apresentada pelo primeiro autor para obtenção do grau de Mestre em Agronomia. ESALQ/USP, Piracicaba. Projeto desenvolvido com recursos parciais da FAPESP.

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

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

⁴ Eng. Agr., Dr., Seção de Radiogenética, CENA/USP.

A cultura de tecidos pode ser vantajosamente associada à indução de mutações em plantas ornamentais, como tem sido verificado em vários exemplos (Tulmann Neto et al., 1990). No caso de crisântemo, uma das vantagens é a possibilidade de regeneração de mutantes sólidos, através de gemas adventícias *in vitro*, evitando, assim, a formação de setores quiméricos nos meristemas multicelulares, após a irradiação. Além disto, mutantes com novas colorações de inflorescência podem ser obtidos num tempo relativamente curto, através de seleção no primeiro ciclo de florescimento (Broertjes et al., 1976; Broertjes, 1982).

No Brasil, não existem ainda exemplos de mutantes induzidos em plantas ornamentais.

Diante da importância do crisântemo e do sucesso desta técnica, resolveu-se realizar este trabalho, com o objetivo de adaptar e otimizar o método de indução de mutações *in vitro*, para o melhoramento da cor da inflorescência de crisântemo cv. Repin rosa, para que possa ser utilizada pelos floricultores.

MATERIAL E MÉTODOS

A cultivar Repin apresenta cor de inflorescência rosa-claro e foi escolhida pela sua excelente aceitação comercial e por apresentar boas características agrônômicas (produtividade, conservação pós-colheita, etc.). Tal cultivar, entretanto, apresenta um limitado espectro de coloração de inflorescência (rosa, bronze e champanhe), sendo, portanto, de interesse a obtenção de outras colorações. Para o cultivo *in vitro*, foram escolhidos, como explantes, pedicelos de botões florais imaturos, e como agente mutagênico, raios-gama da fonte de Cobalto (^{60}Co) do CENA. Vários experimentos foram realizados com vistas a determinar as condições para a regeneração dos pedicelos, a sensibilidade a raios-gama, e a irradiação dos pedicelos para seleção de mutantes.

Regeneração de pedicelos

Utilizou-se o pedicelo floral, pois tem sido relatado como o explante de maior facilidade de regeneração *in vitro* e que permite a organogênese somática direta em crisântemo (Roest & Bokelmann, 1975). Os pedicelos de flores jovens (botões florais cheios mas sem formação de cor) foram retirados de plantas cultivadas sob condições de fotoperíodo curto (nove horas de luz/quinze horas de escuro), na Fazenda Holambra (Jaguariúna, SP).

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

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

Os meios de cultivo testados eram formados por sais minerais e vitaminas do meio MS (Murashigue & Skoog, 1962) adicionado de 1 g/l de caseína hidrolisada, 30 g/l de sacarose e suplementado com reguladores de crescimento em diferentes concentrações. Foram testadas todas as combinações de 0,1; 0,5; 1,0 mg/l de ácido indol acético (AIA) e 1,0; 2,0; 3,0 mg/l de 6-benzil aminopurina (BAP), totalizando nove meios de cultura diferentes, além do meio sem reguladores de crescimento.

Os meios tiveram o seu pH ajustados para 5,7 e depois foram solidificados com a adição de 7 g/l de ágar. A esterilização foi realizada em autoclave a 120°C por 15 minutos. Utilizou-se, para subcultivo, o tempo médio de duas semanas. As plantas foram mantidas em fotoperíodo de dezesseis horas de luz, intensidade luminosa de 16 W/m², e temperatura média de 27°C.

O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado, com dez tratamentos e vinte repetições, sendo, cada repetição, composta por um tubo de ensaio contendo um pedicelo.

A avaliação do melhor meio de cultivo foi realizada aos trinta dias da inoculação, em função do número médio de plantas regeneradas transferíveis (com tamanho mínimo de 0,4 cm) no total de pedicelos avaliados.

Enraizamento e desenvolvimento das plantas *in vitro*

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

O meio utilizado para este teste foi composto de sais minerais e vitaminas do meio MS, adicionado de 1 g/l de caseína hidrolisada, 30 g/l de sacarose, e suplementado com a auxina AIA nos níveis de 0; 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/l.

Os meios tiveram o pH ajustado para 5,7 e depois foram solidificados com a adição de 7 g/l de ágar. A esterilização foi realizada em autoclave a 120°C, por 15 minutos.

As plantas foram mantidas em fotoperíodo de dezesseis horas de luz, intensidade luminosa de 27 W/m², e temperatura média de 27°C.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quinze repetições, sendo, cada repetição, composta por um tubo de ensaio contendo uma planta.

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

Para a análise estatística, os dados da variável porcentagem de sobrevivência foram transformados pela equação arco seno da raiz quadrada de (X/100). Os dados das variáveis altura de planta e peso fresco não sofreram transformação.

Teste de radiosensitividade de pedicelos

Este teste foi realizado com o objetivo de se determinar a sensibilidade, *in vitro*, dos pedicelos da cultivar Repin rosa à radiação gama, visando escolher a melhor dose para a etapa seguinte da pesquisa.

O experimento foi instalado num delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e trinta repetições, com cada repetição constituída de um tubo de vidro contendo um pedicelo de, aproximadamente, 0,5 cm de comprimento e dividido longitudinalmente em duas partes iguais.

As doses escolhidas para este teste foram de 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 Gy de raios-gama, com taxa de dose de 170 Gy/h. Os pedicelos sofreram assepsia de maneira semelhante à descrita no experimento de regeneração. A seguir, porções dos pedicelos foram extraídas e inoculadas no meio em que se obteve o melhor resultado no experimento realizado com este objetivo (composto por sais e vitaminas de MS acrescido de 1,0 g/l de caseína hidrolisada, 30 g/l de sacarose e 7 g/l de ágar, e suplementado com 0,5 mg/l de AIA e 2,0 mg/l de BAP).

Após quinze dias de inoculação dos pedicelos, foi realizada a troca de meio de cultura, utilizando-se o mesmo meio.

A avaliação foi realizada aos trinta dias após a irradiação e inoculação, com a contagem do número médio de plantas regeneradas transferíveis (com tamanho mínimo de 0,4 cm) no total de pedicelos avaliados.

Irradiação de pedicelos visando à seleção de mutantes

Este experimento foi realizado com o objetivo de selecionar mutantes de cor de inflorescência de crisântemo, obtidos através da irradiação de pedicelos com raios-gama, seguido de cultivo *in vitro*.

O experimento foi composto por 200 pedicelos florais jovens, irradiados com a dose de 8 Gy de raios-gama (taxa de dose entre 170 e 210 Gy/h), além de 20 pedicelos não-irradiados, na forma de quatro repetições, perfazendo um total de 800 pedicelos irradiados e 80 pedicelos não-irradiados (controle).

O experimento foi dividido em quatro repetições, com o objetivo de reduzir o tempo entre a irradiação e a inoculação dos pedicelos, e assim, evitar o aumento das perdas por desidratação ou pela ação da radiação no explante. A manipulação, num curto período de tempo, de um grande número de explantes vindos do campo, ocasionava também uma elevação nos níveis de contaminação.

Os métodos de desinfecção, inoculação e cultivo *in vitro* dos pedicelos foram semelhantes aos descritos no experimento anterior. Aos trinta dias da inoculação, as mudas que apresentavam o tamanho mínimo de 0,4 cm foram individualizadas e colocadas em meio para enraizamento e desenvolvimento.

O meio utilizado foi o que apresentou melhores resultados no teste de enraizamento e desenvolvimento, sendo composto por sais minerais e vitaminas do meio MS adicionado de 1 g/l de caseína hidrolisada, 30 g/l de sacarose, 7 g/l de ágar e sem a presença de reguladores de crescimento.

As plantas foram mantidas em fotoperíodo de dezesseis horas de luz, intensidade luminosa de 27 W/m² e a uma temperatura média de 27°C.

Após trinta dias, as plantas se desenvolveram suficientemente para passar pela fase de readaptação ao ambiente externo e ao solo (tamanho mínimo de 4 cm).

A adaptação ao solo foi realizada com a utilização de bandejas de isopor e solo autoclavado (estéril).

As plantas foram retiradas dos tubos de ensaio e tiveram suas raízes lavadas, para se retirar o excesso de meio de cultura. O plantio foi realizado com o colo da planta na mesma altura do solo. As bandejas foram mantidas numa estufa, com a presença de um umidificador de ambientes. Após trinta dias, as plantas foram levadas para uma estufa bem sombreada, com o objetivo de completar a fase de readaptação.

As plantas foram transplantadas no solo, em estufas, sob condições de fotoperíodo longo (dezesseis horas de luz/oito horas de escuro), para realizar o crescimento vegetativo. Quando as plantas apresentavam um tamanho médio de 30 cm de altura, modificou-se a estufa para a condição de fotoperíodo curto (nove horas de luz/quinze horas de escuro), com o objetivo de induzir ao florescimento.

A avaliação dos mutantes foi feita no período do florescimento, com a contagem das plantas mutantes com

setores de uma única cor, mutantes com setores de mais de uma cor, e mutantes de forma da inflorescência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Regeneração de pedicelos

Como se observa na Tabela 1, com exceção do controle, todos os meios utilizados permitiram a regeneração de plantas através de pedicelos. A regeneração se deu por forma direta, sem passar pela fase de calos.

Roest & Bokelmann (1975) usaram o meio básico de MS, ligeiramente modificado, e adicionado de reguladores de crescimento, obtendo organogênese direta em várias cultivares. Para a cultivar Super yellow, o melhor nível de reguladores foi de 1,0 mg/l de BAP e 0,01 mg/l de AIA, e para a cultivar Bravo, o melhor nível foi de 1,0 mg/l de BAP e 1,0 mg/l de AIA. No primeiro caso, obtiveram, em média, 11,3 mudas por pedicelo inoculado, e no segundo, 2,6 mudas; a avaliação foi efetuada aos 80 dias. Já Broertjes et al. (1976), utilizando a cultivar Bravo, obtiveram médias maiores,

TABELA 1. Efeitos de diferentes níveis de 6-benzil aminopurina (BAP) e ácido indol acético (AIA), na regeneração de plantas (mudas maiores que 0,4 cm) da cv. Repin rosa, a partir do cultivo *in vitro* de pedicelos florais. Avaliação efetuada aos 30 dias após a inoculação.

Tratamento (mg/l)	Número médio de mudas por pedicelo ¹
BAP 0,0 + AIA 0,0	0,00 b
BAP 1,0 + AIA 0,1	0,30 ab
BAP 2,0 + AIA 0,1	0,44 ab
BAP 3,0 + AIA 0,1	0,21 ab
BAP 1,0 + AIA 0,5	0,37 ab
BAP 2,0 + AIA 0,5	1,22 a
BAP 3,0 + AIA 0,5	0,68 ab
BAP 1,0 + AIA 1,0	0,70 ab
BAP 2,0 + AIA 1,0	0,42 ab
BAP 3,0 + AIA 1,0	0,42 ab
F	2,34 *
CV(%)	39,50

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

em torno de 30,5 mudas em cada pedicelo que apresentava regeneração, com avaliação aos sessenta e noventa dias. Estes trabalhos indicaram que além do meio de cultura, a regeneração depende do genótipo utilizado, existindo genótipos que não se regeneram.

Levando-se em conta os dados observados na Tabela 1 e os objetivos desta pesquisa, considerou-se que o meio composto por 2,0 mg/l de BAP e 0,5 mg/l de AIA, que possibilitou a obtenção de 1,22 mudas por pedicelo, poderia ser utilizado para a continuação desta pesquisa. O número médio de mudas obtidas foi bem menor do que nos trabalhos citados, mas deve-se levar em conta que naqueles casos as avaliações foram efetuadas entre sessenta e noventa dias após a inoculação e não apenas com trinta dias como neste experimento.

Enraizamento e desenvolvimento de plantas *in vitro*

Os resultados obtidos com a utilização de cinco níveis da auxina AIA, no enraizamento de mudas, de acordo com o método descrito anteriormente, encontram-se na Tabela 2. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os diferentes meios de cultura no tocante aos dois parâmetros utilizados.

Na literatura, existem relatos (Roest & Bokelmann, 1975; De Jong & Custers, 1986) em que o uso de AIA produziu um bom enraizamento

TABELA 2. Efeito de diferentes níveis de ácido indol acético (AIA), na altura e peso fresco de plantas *in vitro*, da cv. Repin rosa, a partir do subcultivo de mudas de 0,4 cm de altura. Avaliação efetuada aos 30 dias após a inoculação.

Tratamento (mg/l)	Altura de plantas (cm)	Peso fresco de plantas (g)
AIA 0,0	3,42	1,15
AIA 0,1	3,74	0,93
AIA 0,5	3,84	1,24
AIA 1,0	3,58	1,30
AIA 1,5	3,50	1,33
F	0,10ns	1,31ns
CV(%)	56,45	45,40

em crisântemo. Entretanto, no presente trabalho, apesar da ausência de diferenças para os parâmetros utilizados, notou-se que o tratamento controle (sem presença de AIA) foi o que apresentou plantas de melhor aspecto visual. Tais plantas apresentavam menor número de raízes, com maior vigor. Os tratamentos com os níveis mais elevados de AIA apresentavam plantas raquíticas, com elevado número de raízes pequenas e finas que se originavam de uma calosidade na base da planta. Esta calosidade possivelmente foi o fator responsável pelo peso fresco semelhante ao das plantas-controle.

Levando-se em conta o melhor aspecto visual das plantas do controle com raízes de maior vigor e ausência de calosidades, resolveu-se utilizar o meio sem a presença de reguladores de crescimento para o enraizamento das mudas regeneradas.

Após trinta dias, as plantas que se desenvolveram com altura mínima de 4 cm, foram selecionadas para a aclimação. As mudas enraizadas foram mantidas em casa de vegetação por uma semana, na presença de um umidificador de ambientes, e depois foram colocadas em condições de sombreamento, obtendo-se uma porcentagem de sobrevivência de 80%.

Teste de radiosensibilidade de pedicelos

Os dados da sensibilidade dos pedicelos a raios-gama, baseados no número médio de mudas obtidas, por pedicelo, estão apresentados na Tabela 3. Observa-se uma tendência geral de redução no número de mudas obtidas e no número de pedicelos que regeneram em função do aumento das doses. Pode-se notar, por exemplo, que a dose de 10 Gy reduziu em 81,5% o número de mudas produzidas por pedicelo, em relação ao controle. A radiação ocasionou também a perda da capacidade de regeneração em alguns pedicelos; a mesma dose de 10 Gy, por exemplo, reduziu em 45% o número de pedicelos com capacidade de organogênese.

O critério utilizado para a escolha da dose foi o da redução, em torno de 50%, do número de mudas regeneradas, por pedicelo, escolhendo-se, então, de acordo com os resultados da Tabela 3, a dose de 8 Gy de raios-gama.

Broertjes (1982) e De Jong & Custers (1986) usaram dose semelhante à recomendada neste trabalho,

em torno de 8 Gy de raios-gama, mas com raios-X como mutagênico. Ahloowalia (1992) relatou ter usado uma dose bem maior, em torno de 20 Gy de raios-gama na irradiação de meristemas *in vitro*, numa série de cultivares, obtendo um grande número de mutantes.

Irradiação de pedicelos visando a seleção de mutantes

A Tabela 4 foi obtida com os dados das quatro repetições, e foi montada com o objetivo de monitorar este experimento, comparando-o ao experimento anterior, de radiosensibilidade.

Os dados demonstram, portanto, que a repetibilidade foi apenas parcialmente alcançada. O número médio de mudas obtidas pelo controle neste experimento foi de 2,22 mudas por pedicelo inoculado, bem abaixo do obtido no experimento inicial de radiosensibilidade, que foi de 7,52 mudas por

TABELA 3. Efeito da radiação gama na regeneração *in vitro*, de plantas da cv. Repin rosa, obtidas através do cultivo de pedicelos florais. Avaliação efetuada 30 dias após a inoculação.

Doses (Gy)	Número médio de mudas por pedicelo ¹		Pedicelos com regeneração (%)
	Observada	(%)	
0	7,52 a	(100)	100,0
6,0	6,00 ab	(79,8)	91,1
8,0	4,16 bc	(55,3)	82,3
10,0	1,39 d	(18,5)	55,5
12,0	3,09 c	(41,1)	82,0
F	24,96 **		
CV(%)	35,21		

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

TABELA 4. Regeneração *in vitro*, de plantas da cv. Repin rosa, obtidas através da irradiação de pedicelos florais, com 8 Gy de raios-gama. Avaliação efetuada 30 dias após a inoculação, médias de 4 repetições.

Tratamento	Número médio de mudas por pedicelo	
	Observada	(%)
Controle	2,22	(100)
8 Gy	1,21	(54,5)

pedicelo inoculado (Tabela 3). Este resultado pode ser explicado, em parte, pelas dificuldades de se trabalhar com uma grande quantidade de materiais, num curto período de tempo.

O tratamento de 8 Gy de raios-gama também apresentou situação semelhante com apenas 1,21 muda obtida por pedicelo, em comparação com a média de 4,16 mudas, no experimento de radiosensibilidade.

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

O esperado, portanto, é que, independentemente da capacidade de regeneração do explante, a dose de 8 Gy de raios-gama tenha a capacidade de reduzir em torno 45%, o número médio de mudas regeneradas *in vitro* de plantas da cultivar Repin rosa.

Foram avaliadas, no campo, 690 plantas, obtidas a partir da regeneração *in vitro* de pedicelos irradiados, além de 105 plantas do controle. Na Tabela 5 estão apresentados os dados do número e frequência de mutantes observados nas 795 plantas avaliadas. O tratamento com 8 Gy de raios-gama apresentou uma frequência de 6,52% de mutantes de cor, e 0,14% de mutantes de clorofila, no total de plantas avaliadas. Portanto, a porcentagem de mutantes de cor ficou em torno de 97,7% do total de mutantes observados.

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

Broertjes et al. (1976), trabalhando com a cultivar Bravo, obtiveram frequência de 21% de mutantes de cor de inflorescência, irradiando pedicelos florais com dose de 8 Gy de raios-X. Destes, aproximadamente 90% eram aparentemente mutantes sólidos (com flores de apenas uma cor).

De Jong & Custers (1986) obtiveram frequências de mutação de cor bem menores, entre 0 e 7,2%

TABELA 5. Número e frequência de mutantes em plantas da cv. Repin rosa, provenientes da regeneração *in vitro* de pedicelos irradiados, com 8 Gy de raios-gama. Avaliação efetuada no florescimento.

Tratamento	Plantas avaliadas	Mutantes observados quanto à				Total de mutantes	
		cor da flor		clorofila			
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
Controle	105	0	0	0	0	0	0
8 Gy	690	45	6,52	1 ¹	0,14	46	6,67

¹ Planta com folhas variegadas.

de mutantes, trabalhando com dose de 8 Gy de raios-X na cultivar Spider branco, que, pela cor inicial, possui maior dificuldade de produzir mutantes de cor.

A Tabela 6 apresenta a frequência e os tipos de mutantes de cor para a inflorescência. O mutante de cor bronze foi o que apareceu com maior frequência, em torno de 64,4% do total. Segundo Stewart & Dermen (1970), partindo de uma cultivar rosa e supondo a ocorrência da mutação na camada LI da planta, o mutante de cor bronze é o mais fácil de ser obtido. O mutante de cor rosa-escuro somente apareceu nas repetições de número 2 e 3, enquanto o mutante de cor rosa-claro (mais claro que a cultivar original), somente na repetição número 2.

O fato de ter sido necessário subdividir os pedicelos em grupo de 200 serviu também para reafirmar que em trabalhos com indução de mutação sempre se deve recomendar o uso de grandes populações. No presente trabalho, o uso de 800 pedicelos iniciais possibilitou a seleção de 46 mutantes, com quatro tipos de cor, e um, com folha variegada. Se apenas 200 pedicelos tivessem sido utilizados, da repetição número 1 por exemplo, apenas 8 mutantes de cor seriam obtidos. É sempre preferível um número maior de mutantes, da mesma cor, por exemplo, para se avaliar, pois pode-se escolher o melhor dentre eles, supondo-se que tenham origens geneticamente diferentes.

Todas as plantas obtidas, incluindo o mutante variegado, possuíam coloração de flor única, podendo ser consideradas, então, como mutantes periclinais ou sólidos. O mutante de folha variegada apresentou-se com a inflorescência de cor rosa, se-

TABELA 6. Espectro de mutação e freqüência de mutantes na coloração de inflorescência das plantas da cv. Repin rosa, provenientes da regeneração *in vitro* de pedicelos irradiados, com 8 Gy de raios-gama. Avaliação efetuada no florescimento das 4 repetições.

Repetição	Plantas avaliadas	Tipos de colorações e freqüências				Total de mutantes
		Bronze	Champanhe	Rosa escuro	Rosa claro	
1	232	5	3	-	-	8
2	196	6	2	2	4	14
3	122	8	2	2	-	12
4	140	10	1	-	-	11
Total ¹	690	29(64,4)	8(17,7)	4(8,8)	4(8,8)	45(100)

¹ Valores entre parênteses indicam a porcentagem de mutantes em relação ao total de mutantes avaliados.

melhante à cultivar original; entretanto, não pôde ser chamado de mutante periclinal ou sólido.

Este resultado comprova relatos anteriores, que afirmam que a indução de mutações *in vitro*, mediante gemas adventícias em crisântemo, obtidas a partir de pedicelo floral, produzem somente mutantes com um único tipo de coloração (não quiméricos).

Uma dificuldade observada na aplicação deste método, foi a falta de uniformização no florescimento das plantas obtidas. Recomenda-se, então, para trabalhos futuros, que se faça uma poda no meristema apical de todas as plantas obtidas *in vitro*, duas semanas após o plantio no campo, ou então, que se usem estas plantas como matrizes, retirando-se, destas, mudas para serem avaliadas. Estes procedimentos possibilitarão a uniformização do lote, com relação ao desenvolvimento e data de florescimento.

Uma vantagem que se observou neste método *in vitro* foi em relação ao tempo de duração do experimento. Da irradiação até a seleção dos mutantes no florescimento, o tempo foi de 200 dias, enquanto que se o experimento fosse realizado *in vivo*, com a irradiação de mudas enraizadas e avanço até a geração recomendada para a seleção (geração M1V4), o tempo seria de 280 dias.

Outra vantagem a ser destacada no método *in vitro* está relacionada à melhor utilização de espaço físico no campo, e a uma menor quantidade de tratamentos culturais. Deve-se reconhecer, entretanto, os maiores custos envolvidos em trabalhos em laboratório. Também deve-se dizer que na presente pesquisa, o genótipo utilizado mostrou boa capacidade de regeneração de plantas através de pedicelos, o

que pode não ocorrer com outros genótipos. Todos estes fatores devem ser levados em conta na recomendação (ou não) do método *in vitro*, através de gemas adventícias para a obtenção de mutantes em crisântemo.

CONCLUSÃO

A irradiação com 8 Gy de raios-gama e o cultivo *in vitro* dos pedicelos possibilita a obtenção de 6,52% de mutantes de cor de inflorescência no total de plantas avaliadas, e se obtêm diferentes tipos de mutantes, como: bronze, champanhe, rosa-escuro e rosa mais claro, com maior freqüência para os de cor bronze.

REFERÊNCIAS

- AHLOOWALIA, B.S. *In vitro* radiation induced mutants in *Chrysanthemum*. **Mutation Breeding Newsletter**, Viena, v.39, n.7, p.6, 1992.
- BROERTJES, C. The significance of *in vitro* adventitious bud techniques for mutation breeding of vegetatively propagated crops. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (Viena, Áustria). (Ed.). **Induced mutations in vegetatively propagated plants II**. Viena, 1982. p.1-10.
- BROERTJES, C.; ROEST, S.; BOKELMANN, G.S. Mutation breeding of *Chrysanthemum morifolium* Ram. using *in vivo* and *in vitro* adventitious bud techniques. **Euphytica**, Wageningen, v.25, n.1, p.11-19, 1976.
- DE JONG, J.; CUSTERS, J.B.M. Induced changes in growth and flowering of *Chrysanthemum* after

- irradiation and *in vitro* culture of pedicels and petals epiderms. **Euphytica**, Wageningen, v.35, n.1, p.137-148, 1986.
- KAMPF, E.; BAJAK, E.; JANK, M.S. O Brasil no mercado internacional de flores e plantas ornamentais. **Informe GEP/DESR**, Piracicaba, v.3, n.4, p. 3-11, abr. 1990.
- MICKE, A.; DONINI, B.; MALUSZYNSKI, M. Induced mutations for crop improvement. **Mutation Breeding Review**, Viena, v.7, p.1-41, jun. 1990.
- MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-479, 1962.
- ROEST, S.; BOKELMANN, G.S. Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. *in vitro*. **Science Horticulturae**, Amsterdam, v.3, p.317-330, 1975.
- STEWART, R.N.; DERMEN, H. Somatic genetic analysis of the apical layers of chimeral sports in *Chrysanthemum* by experimental production of adventitious shoots. **American Journal of Botany**, Nova York, v.57, n.9, p.1061-1071, 1970.
- TULMANN NETO, A.; MENDES, B.M.J.; ANDO, A. Indução e uso de mutações *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília:[s.n.], 1990. p.341-378.