

Indução de mutação: ampliação da variabilidade genética para o melhoramento de ornamentais.

Tulmann Neto, Augusto¹; Latado, Rodrigo Rocha²

¹Professor Associado dp, Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP, CP. 96, 13400-970, CEP 13400-970 Piracicaba-SP, fone (19) 3429-4684, email: tulmann@cena.usp.br; ²Pesquisador do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis-SP, email: rodrigo@centrodecitricultura.br

INTRODUÇÃO

As ornamentais têm apresentado um aumento contínuo na sua importância econômica mundial, fato este que também tem ocorrido no Brasil (Flora Brasiliis, 2002), embora ainda não representem contribuição expressiva do valor econômico dos produtos agrícolas Brasileiros, como acontece em outros países, dentre os quais a Holanda é um exemplo marcante.

Diante desta importância econômica, os melhoristas têm trabalhado com diferentes métodos para a liberação de cultivares, mas no presente trabalho procurar-se-á destacar o papel da indução de mutações como técnica para ampliação da variabilidade genética, que pode ser utilizada para a obtenção de novas cultivares.

Dados revelam que entre as 2252 cultivares liberadas direta ou indiretamente pelo uso de mutagênicos, cerca de 25,0% foram obtidas em ornamentais, o que demonstra a importância desta técnica (Maluszynski et al., 2000). Dentre as razões apontadas para esse sucesso, citam-se: facilidade para reconhecimento de mutantes; tratamento de materiais altamente heterozigotos; possibilidade de uso de métodos *in vivo* e *in vitro*, sendo que este último possibilita a obtenção de mutantes periclinais ou sólidos num curto espaço de tempo; dificuldades de aplicação dos métodos de melhoramento denominados tradicionais.

Em ornamentais, a observação das características mutadas, na lista de cultivares liberadas aos agricultores revela que, ao contrário do que se poderia esperar, não apenas foram induzidos mutantes para coloração de flores ou de folhas, mas também mutantes com outras características agrônômicas de importância, tais como: maior tamanho de flores, maior número de flores por planta, hábito compacto, hábito ereto, florescimento precoce, maior comprimento da haste, maior adaptabilidade às condições ambientais e etc... (Schum & Preil, 1998; Maluszynski et al., 2000).

PRINCÍPIOS BÁSICOS DO USO DE INDUÇÃO DE MUTAÇÃO NO MELHORAMENTO

Serão descritos alguns princípios básicos sobre a metodologia apropriada quando um produtor ou pesquisador decidir por utilizar a indução de mutação no melhoramento de ornamentais, mais detalhes podem ser vistos em revisões e ou publicações específicas (IAEA, 1995; Broertjes & Van Harten, 1978 e 1998, Tulmann Neto et al., 1998).

Os agentes responsáveis pela indução de mutação, os mutagênicos, podem ser divididos em físicos e químicos. Na primeira categoria estão incluídos os diferentes tipos de radiações, tais como raios-X, gama, nêutrons, luz ultravioleta e etc... Atualmente os mais empregados são os raios-X, obtidos de aparelhos de raios-X e os raios-gama, obtidos a partir de radioisótopos tais como ⁶⁰Co (existente nos dois irradiadores do CENA/USP, um dos quais obtido em 1999 com auxílio da FAPESP) e ¹³⁷Cs. Com exceção da luz ultravioleta, os demais têm grande penetrabilidade em todos os tipos de materiais a serem tratados. Em geral, após o tratamento, os materiais tratados podem ser manipulados imediatamente, sem riscos ambientais e para a saúde. Os mutagênicos químicos compreendem uma série de produtos químicos que, ao contrário dos anteriores, podem apresentar baixa penetrabilidade nos tecidos e exigem maiores cuidados na sua manipulação, tanto durante, como após os tratamentos. Dentre os mutagênicos químicos, os

alquilantes tem sido os mais utilizados, destacando-se entre eles o metanossulfonato de etila (EMS). O uso de mutagênicos químicos em associação com a cultura de tecidos tem possibilitado o aumento do emprego de tais tipo de mutagênicos pois, adicionado ao meio de cultivo, o mutagênico químico pode ter a sua penetrabilidade aumentada.

Os mutagênicos podem ser utilizados para tratamentos *in vivo* (sementes, borbulhas, rizomas, bulbos, plantas, folhas e etc...) ou *in vitro* (folhas, suspensões celulares, protoplastos, meristemas, plantas e etc...). Pode-se também fazer combinações entre esses métodos quando, por exemplo, após a irradiação de uma planta, pode-se utilizar o meristema apical que é cultivado *in vitro*, nas fases posteriores da pesquisa. No caso de irradiação de sementes, denomina-se de M_1 a planta obtida após o tratamento mutagênico e de M_2 , M_3 , e etc... as plantas descendentes da planta M_1 . Quando materiais de propagação vegetativa são irradiados, denomina-se de V_1M_1 a planta ou ramo derivado do tecido ou órgão irradiado e de V_2M_1 , V_3M_1 e etc... as plantas originadas a partir da multiplicação vegetativa desta.

Após o tratamento com o mutagênico, dois tipos de efeitos podem ser observados: fisiológicos e genéticos. Os fisiológicos, em geral, são prejudiciais, pois causam redução no vigor, altura da planta, diminuição na sobrevivência e etc..., entretanto não causam preocupação pois são restritos as gerações de plantas M_1 ou V_1M_1 . Estes efeitos fisiológicos têm importância na fase de determinação da dose a ser utilizada para o trabalho pois são baseados neles que se faz a seleção da dose, procurando-se eleger uma ou mais doses que não causem efeitos fisiológicos excessivos nos materiais tratados. Em geral têm sido escolhidas doses que causam redução de 30 a 50% na altura (GR_{30} ou GR_{50}) ou sobrevivência (LD_{30} ou LD_{50}) das plantas M_1 ou V_1M_1 . Os efeitos genéticos, as mutações, já podem ser observados a partir das plantas M_2 ou V_2M_1 e os mutantes selecionados devem ser propagados para posteriores observações e avaliações nas gerações M_3 , M_4 ... ou V_3M_1 , V_4M_1 .

Dentre os princípios básicos deve-se citar que a mutação é um evento unicelular e que ocorre ao acaso, isto é, não é possível direcionar-se o tratamento para a obtenção de um determinado tipo de mutante. A seleção é que deve ser dirigida para a busca do mutante procurado, de acordo com o objetivo do trabalho. Se um produtor deseja, por exemplo, um determinado tipo de coloração de flor, durante a seleção dos mutantes, a atenção deve ser dirigida prioritariamente para essa característica.

A escolha do material (órgão ou propágulo da planta) a ser tratado é de grande importância para a futura seleção de mutantes. Se a parte da planta a ser tratada for composta por várias células, como a mutação é um evento unicelular, podem ocorrer mutação em uma ou em várias células e não em outras, o que resultará na existência de uma planta quimérica, isto é, uma planta contendo tecidos com células mutadas e células não-mutadas. Nesse caso, quando sementes são tratadas, se ocorrer mutação há o quimerismo na geração M_1 . Então, para se obter o mutante desejado, a seleção deve ser iniciada a partir da geração M_2 na qual ocorre segregação, após a meiose nas plantas M_1 .

No caso de plantas de propagação vegetativa ainda não está definido para todas as espécies o número de multiplicações vegetativas necessárias até se obter plantas mutantes estáveis, entretanto tem sido verificada a necessidade de, no mínimo, três multiplicações antes da estabilização. Como exemplo, se bulbos ou rizomas forem tratados, deve-se avançar as gerações de propagação vegetativa até que se obtenha a geração V_3M_1 (três multiplicações) ou V_4M_1 (quatro multiplicações), para a realização da seleção de mutantes.

Um dos métodos usados para ampliar setores quiméricos é denominado de podas repetidas, o qual consiste na realização de várias podas a partir da geração V_1M_1 antes da realização da seleção. Assim, o avanço rápido das gerações de propagação vegetativa possibilita a ampliação dos setores quiméricos mutados até a sua estabilização.

Em certos casos, é possível evitar-se o quimerismo quando a planta ou nova brotação se origina de uma única célula, a partir do tecido ou da planta tratada com mutagênico. Nesse caso, se a célula sofrer mutação e por mitoses posteriores originar uma planta, todas as suas células terão o mesmo genótipo mutado. Tal situação pode ocorrer, por exemplo, se protoplastos forem tratados (Tulmann Neto et al., 1998) ou se a planta

originar-se de gemas adventícias unicelulares, como pode ocorrer em várias ornamentais (Broertjes et al., 1968).

ALGUNS RESULTADOS OBTIDOS EM INDUÇÃO DE MUTAÇÃO EM ORNAMENTAIS

Para ilustrar o que se relatou anteriormente serão descritos alguns exemplos de resultados obtidos com indução de mutação em outros países, usando diferentes tipos de ornamentais e diversas metodologias, baseando-se nas revisões de Broertjes & Van Harten, (1978 e 1998). Mutantes de interesse foram obtidos em ornamentais propagadas por tubérculos e bulbos (*Dahlia variabilis*, *Gladiolus*, *Lilium*, *Tulipa* e etc...), flores de vaso (*Anthurium*, *Begonia*, *Saintpaulia* e etc...), folhagens (*Ficus*, *Cyperus* e etc...) e flores para corte (*Alstroemeria*, crisântemo e etc...). Deve-se dizer que a maioria dessas ornamentais é de propagação vegetativa e que, portanto, as técnicas para a indução de mutações devem ser apropriadas para essa situação.

No caso de ornamentais propagadas por bulbos e tubérculos (caso da *Dahlia variabilis*, *Gladiolus*, *Lilium* e *Tulipa*), estes apresentam meristema multicelular. Então, quando são tratados com mutagênicos, um dos problemas para a seleção de mutantes refere-se à baixa taxa de propagação obtida por meio destes bulbos ou tubérculos, o que traz dificuldades para o isolamento de setores quiméricos mutados (Broertjes & Van Harten, 1988). Por isto, para se evitar o quimerismo é importante realizar o tratamento mutagênico no momento certo ou então, se for possível, obter plantas via uso de gemas adventícias, usando métodos *in vitro* para se auxiliar o processo.

Em *Dahlia variabilis* a indução de mutação é de interesse devido a alta heterozigosidade e a presença de grande número de genes que controlam a cor de pétala, por isto uma grande variabilidade para coloração de flor já foi obtida por meio da indução de mutantes (Broertjes & Van Harten, 1988). Uma estratégia que pode ser interessante é a indução de mutantes visando a alteração de poucas características, utilizando-se como material inicial uma cultivar elite, que é o tipo de material indicado para ser tratado. Para trabalhos cujo objetivo é a alteração na coloração de flor por meio de mutagênese induzida, não se recomenda utilizar cultivares de cor branca como material inicial. Entretanto, um mutante espontâneo de coloração rosada foi relatado a partir de um cultivar com coloração branca. Em Dália, a irradiação deve ser feita logo após a colheita dos tubérculos quando as gemas que irão originar os brotos apresentam o menor desenvolvimento e ainda não estão visíveis. Em geral são tratados lotes de 50 tubérculos dormentes, com doses de 20 a 30 Gy de raios-X ou gama. Após o tratamento e plantio, algumas centenas de mudas derivadas do tratamento devem ser observadas visando-se a seleção de mutantes. Utilizando este método foram obtidos cultivares mutantes na Holanda, França e Índia, que apresentavam diferentes tipos de coloração, ampliação no período de florescimento e maior comprimento do talo. Foram observadas plantas completamente mutadas ou não mutadas, em alguns casos, metade da planta apresentava a mutação e noutros casos, apenas parte da planta era mutada, o que indica a eficiência do método. Em geral, as características mutadas são transferidas via tubérculos para a próxima geração vegetativa, mas pode haver perdas da característica mutada, se o setor mutado não tomar parte da formação do novo tubérculo. Neste caso, métodos *in vitro* podem ser usados para que evitar que o setor mutante seja perdido e para que ele se manifeste nas plantas regeneradas.

Em ornamentais comercializadas para vaso e flores de corte existem dezenas de mutantes liberados para o comércio (Broertjes & Van Harten, 1988). Para o primeiro caso, em *Saintpaulia* (violeta), por exemplo, a indução de mutação é facilitada pois existe a possibilidade de propagação *in vivo* por meio de folhas destacadas. Depois do enraizamento, tais folhas originam várias plantas novas na base do pecíolo, o interessante neste caso é que estas plantas são derivadas de uma única célula da epiderme do pecíolo e se desenvolvem por meio de gemas adventícias. Deste modo, após o tratamento com o mutagênico, mutantes sólidos (todas as camadas celulares com um único genótipo) podem ser obtidos, abreviando-se o período de seleção, que pode ser longo quando existe a ocorrência do quimerismo. Em violeta, a metodologia indicada é o tratamento mutagênico de

folhas destacadas (contendo o pecíolo) com radiação gama ou X, usando cultivares com boas características agronômicas. As doses variam entre 30 e 60 Gy de raios-X ou gama. A seguir as folhas são postas para o enraizamento. Com o desenvolvimento de gemas adventícias na base do pecíolo, novas plantas serão formadas. Estas devem ser destacadas, plantadas e inicia-se o processo de seleção de mutantes. Utilizando-se este método, partindo-se de um cultivar de coloração de flor azul, obteve-se na Holanda a liberação de um mutante de cor púrpura. Ensaios de avaliação do mutante revelaram que apenas houve mudança na coloração da flor, mantendo-se as demais características inalteradas no cultivar original.

No caso de flores de corte tais como o cravo (*Dianthus*), um método *in vivo* bastante utilizado é o da irradiação de mudas com dose de 80 Gy de raios-gama. Deve-se fazer a proteção da base (2-3 cm) das mudas para que os efeitos fisiológicos do tratamento mutagênico não causem nenhum dano as raízes. Os mutantes são selecionados nas novas plantas obtidas a partir destas mudas irradiadas. Por este método foi obtida na Holanda uma família de seis mutantes de cores, as quais variaram de branca a vermelha, a partir do cultivar original Kortina (flor com cor púrpura).

Broertjes & Van Harten (1988) relatam que, em ornamentais, a indução de mutação pode ser usada para a obtenção de mutantes de forma ou de coloração de folhas, como variegações, por exemplo. Em vários casos (*Acalypha*, *Codiaeum*, *Coleus*, *Ficus*) cita-se que o método usado foi o de irradiação de estacas seguido da aplicação das podas repetidas com o objetivo de permitir o desenvolvimento de gemas axilares e obtenção de novos ramos para a realização de seleção. Em *Ficus benjamina*, o uso de tal método na Bélgica propiciou a liberação de um cultivar com folhas variegadas com margens branco-amareladas.

USO DE INDUÇÃO DE MUTAÇÃO NO MELHORAMENTO DE ORNAMENTAIS NO BRASIL

Ao contrário do que ocorre em vários países, principalmente na Europa, o uso de indução de mutação em ornamentais no Brasil ainda é incipiente. O primeiro trabalho relatado no país foi realizado com crisântemo no CENA/USP em 1993. O sucesso deste trabalho incentivou os pesquisadores e produtores a continuarem trabalhos com esta cultura e o início de trabalhos em outras culturas, tais como: *Calathea*, *Stromanthe*, *Aster* e *Amaryllis*. Como se pretende incentivar e aumentar a utilização deste tipo de trabalho no Brasil, algumas considerações devem ser feitas neste sentido aproveitando-se a experiência já adquirida pela equipe do CENA/USP. nestes trabalhos e os resultados obtidos em outros países.

A semelhança do que ocorre na Europa, considera-se de fundamental importância que a pesquisa inclua uma interação contínua entre os especialistas em indução de mutação e produtores (ou pesquisadores) de ornamentais. Supondo-se que o trabalho seja feito com produtores, reuniões prévias devem ser realizadas para esclarecer bem quais são os objetivos do trabalho, para a escolha da parte da planta e o cultivar a ser tratado, o tipo de mutagênico e a dose a ser utilizada, método de multiplicação *in vivo* ou *in vitro*, os procedimentos pós-tratamento com mutagênico, a seleção e a avaliação dos mutantes. É comum que o especialista em indução de mutação esclareça ao produtor que a probabilidade de sucesso é menor se pequenas populações forem utilizadas e que, mesmo que grandes populações sejam utilizadas, apenas algumas plantas sofrerão mutações. Mas se o trabalho for realizado no campo do produtor, após a etapa de seleção dos mutantes, o produtor poderá comercializar o material não selecionado, sendo, portanto, de baixo custo experimental. Se o produtor não dispuser de grande área para os experimentos, os mesmos poderão ser sub-divididos com a realização em várias épocas durante o ano (ou vários anos), até que se atinja o objetivo almejado. Os tratamentos *in vivo* ou *in vitro*, com mutagênicos químicos ou raios-gama, são feitos no CENA/USP e o material é enviado para o produtor, que deverá seguir a metodologia proposta.

Uma vez que seja selecionado um mutante desejado, este deve ser multiplicado e deverá ser avaliado comparativamente com o cultivar original. Tal avaliação inclui ensaios

com delineamento experimental e várias repetições. O mutante deve ser avaliado de acordo com os padrões estabelecidos que o produtor utiliza para a comercialização da espécie (altura de planta, conservação pós-colheita, ciclo e etc...). Para que se tenha idéia do procedimento descrito, alguns exemplos serão citados em que tal planejamento foi realizado e os experimentos foram executados com sucesso.

Em trabalho feito com crisântemo numa colaboração entre o CENA/USP e uma empresa produtora de ornamentais de Holambra-SP, definiu-se que o objetivo seria a obtenção de mutantes de crisântemo de corte, contendo novas colorações de pétalas. Optou-se por utilizar a cultivar Repin rosa claro, utilizando-se métodos de induções de mutações *in vivo* e *in vitro* (Latado, 1993; Latado et al., 1996; Tulmann Neto & Latado, 1997). Tal cultivar foi escolhido por apresentar boas características agrônômicas, coloração propícia para a obtenção de mutantes e por ser encontrado no mercado em apenas três colorações: rosa claro, bronze e champagne.

Numa primeira etapa do trabalho utilizou-se o método *in vivo*, estacas enraizadas (contendo seis gemas axilares) foram irradiadas e para a seleção da dose foi realizado um ensaio preliminar irradiando-se plantas com doses crescentes de mutagênico. As estacas enraizadas foram levadas para estufas do produtor e 30 dias após, avaliou-se a altura e sobrevivência das plantas V_1M_1 . Baseando-se na redução da altura de plantas escolheu-se a dose de 20 Gy para a continuação do trabalho. No experimento posterior, seiscentas estacas foram irradiadas com esta dose e levadas para a estufa. A irradiação foi feita visando atingir os ápices meristemáticos ou gemas axilares das plantas. Como estes órgãos são multicelulares, o esperado era a ocorrência de quimerismo. Para evitar esta situação e ampliar os setores mutados, aplicou-se nos ramos V_1M_1 obtidos pelo crescimento dos meristemas irradiados, o método das podas repetidas, que consistiu na poda desses ramos para forçamento da brotação das suas gemas axilares, resultando em ramos (geração) V_2M_1 . Tais ramos também foram podados até que se obtivesse as ramificações (geração) V_6M_1 . Os ápices podados nas diversas gerações foram enraizados e levados ao campo para seleção de mutantes. No total, foram avaliadas 7764 plantas, obtendo-se 5,90% de mutantes de coloração e 0,18% mutantes de formato da inflorescência. Os mutantes apresentaram cores tais como: bronze, champanhe, rosa escuro, creme, branco, amarelo e outras. O produtor mostrou interesse em apenas alguns tipos de coloração (creme, rosa escuro e branco) e assim, estes mutantes foram multiplicados vegetativamente.

A seguir, realizou-se um experimento de competição dos mutantes com o cultivar original. Por este experimento concluiu-se que as características básicas do cultivar original foram mantidas e o produtor decidiu-se pela comercialização do mutante de cor rosa escuro (denominado Ingrid) e de cor branca (denominado Cristiane). Estes dois mutantes foram comercializados com sucesso durante um período indeterminado de tempo.

Num experimento adicional, utilizou-se um método de induções de mutações *in vitro*. Neste, pedicelos florais foram destacados de botões florais imaturos e, a seguir, irradiados. Assim como no experimento *in vivo*, houve a necessidade de determinar a melhor dose de mutagênico a ser utilizada. Após a seleção da dose de raios-gama (8 Gy), seiscentos e noventa pedicelos florais imaturos foram irradiados e cultivados *in vitro* no CENA/USP, em meio apropriado para a regeneração das plantas. Após o cultivo *in vitro* e a aclimatização das plantas ao meio ambiente, as mesmas foram levadas para o campo do produtor para serem avaliadas durante o florescimento. Como resultados foram selecionados 6,52% de mutantes de coloração e 0,14% de mutantes de formato da inflorescência. Todos com coloração única. A diferença básica deste método *in vitro*, em comparação com o método *in vivo* é que as plantas regeneradas *in vitro* a partir de pedicelos, originam-se de apenas uma única célula da epiderme. Deste modo, assim como seria esperado, somente foram obtidos mutantes sólidos (com apenas uma coloração), dispensando-se o método das podas repetidas.

O trabalho com crisântemo teve continuidade, com a realização de novos experimentos, passando-se a utilizar como material inicial plantas do mutante denominado Ingrid (cor rosa escuro). Optou-se pelo uso de dois métodos, que consistiram na irradiação de plantas jovens (método *in vivo*) e uso do mutagênico químico metanossulfonato de etila

(EMS), para tratamento de pedicelos (método *in vitro*). Com a irradiação de mudas *in vivo* foram selecionados vários tipos de mutantes de coloração. Dentre eles, quatro mutantes (os de cor vinho, chá-rosa, bronze escuro e variegado) foram avaliados em experimento comparativo com o cultivar controle e despertaram o interesse do produtor para a sua comercialização (Adames, 1998).

É importante ressaltar que o tratamento mutagênico de um clone mutante pode dar origem a uma família de mutantes de interesse comercial, assim como já foi relatado em trabalhos em outros países (Broertjes et al., 1980). No presente caso, a irradiação do mutante de cor rosa escuro, obtido a partir do cultivar original de cor rosa claro, propiciou a obtenção de um mutante de cor bronze escuro, distinto do que era anteriormente cultivado e assim sucessivamente. Esta estratégia pode dar bons resultados e propiciar ao produtor, uma série de novos cultivares que apenas ele dispõe no mercado.

O experimento de indução de mutações com mutagênico químico EMS iniciou-se com um teste preliminar de sensibilidade dos pedicelos ao mutagênico. Neste selecionou-se a concentração de EMS e o tempo de tratamento (0,075M, 1 hora e 45 minutos de tratamento) a ser realizado. As fases seguintes foram: o tratamento mutagênico de um maior número de pedicelos, regeneração de plantas *in vitro*, aclimatização das plantas ao meio ambiente, plantio no campo e seleção de plantas mutantes no florescimento. Como resultado obteve-se vários mutantes para coloração. Neste caso também, a maioria dos mutantes apresentou uma única coloração, indicando que a origem das gemas adventícias de crisântemo *in vitro*, se dá a partir de uma ou poucas células da epiderme (Adames, 1998).

Trabalhos mais recentes incluíram crisântemo de vaso e a cooperação da Empresa Dekker de Wit Ltda de Mogi Guaçu-SP (Boersen, 2003; Tulmann Neto et al., 2005; Boersen et al., 2007). Neste caso a estratégia foi a irradiação de estacas não enraizadas (comprimento de 4,5 cm e com 4 a 5 folhas) da cultivar Cherry Dark, que possui pétalas com cor rosa clara. Devido a limitações na área disponível na casa de vegetação, o trabalho foi realizado em sete épocas (sete experimentos). Em cada experimento as estacas foram irradiadas no CENA/USP com várias doses de raios-gama e, a seguir, eram levadas à estufa do produtor, para proceder ao enraizamento. Após, as mudas irradiadas foram plantadas em vasos, adotando-se os procedimentos usuais para a indução de florescimento, tais como realização da eliminação da gema apical (“pinche”), adubações, tratamentos fitossanitários e etc... Em tais plantas foram realizadas medições de altura, sobrevivência e seleção de mutantes morfológicos e de coloração. Um grande número de mutantes de coloração foi obtido, incluindo-se de cor vermelha, a qual não era encontrada na família Cherry. Como seria esperado, no controle sem irradiação não foram encontrados mutantes.

Os mutantes de interesse foram multiplicados e levados para os ensaios de produção. Nestes pôde-se concluir que nenhum dos mutantes apresentava todas as características necessárias a sua liberação para plantio comercial. Apesar disto, a pesquisa serviu para consolidar a metodologia que pode ser aplicada para indução de mutação em crisântemo de vaso. Verificou-se que a dose de raios-gama que causou redução de crescimento de 50% (GR_{50}) nas plantas V_1M_1 foi de 18,17 Gy e que se o objetivo for indução de mutação para coloração de inflorescências, doses ao redor ou menores que a GR_{50} devem ser as recomendadas. Essas doses, além de propiciarem elevadas frequências de mutações e ampla variação nos diferentes tipos de colorações de inflorescência, resultaram em alta % de mutantes periclinais, isto é, com todas as inflorescências mutadas de uma mesma coloração. No entanto, se o objetivo é conseguir induzir mutantes morfológicos (tamanho e número de pétalas), as doses devem ser maiores do que a GR_{50} .

Nestes trabalhos com crisântemo realizados no Brasil ficou constatada a importância da escolha correta do material inicial para o sucesso do programa de melhoramento, principalmente da coloração da inflorescência deste, quando o objetivo for a indução de mutantes de coloração. De fato, Latado & Tulmann Neto (1998), trabalhando com cultivar de cor branca de crisântemo, conseguiram apenas mutantes de cor amarela. Em sua revisão, Schum & Preil (1998) apresentam uma boa discussão sobre este assunto.

Noutra pesquisa, contando com a colaboração de uma empresa de Rio Claro, foram realizados trabalhos visando-se a obtenção de mutantes na folhagem de *Stromanthe* e *Calathea* (Tulmann Neto & Latado, 1996; Latado & Tulmann Neto, 1996). O planejamento utilizado foi o mesmo para o caso do crisântemo. Nestas ornamentais propagadas por rizomas, após a seleção da dose (25 e 30 Gy para *Calathea* e 30 e 40 Gy para *Stromanthe*), rizomas foram irradiados no CENA/USP e enviados ao produtor. O ápice meristemático das plantas foi podado para induzir a brotação lateral, ampliar os possíveis setores mutados e produzir novas mudas, que correspondem às gerações V_2M_1 , V_3M_1 e etc... Após a seleção de mutantes contendo padrões de colorações de folhagens distintos das cultivares originais, tais mutantes foram multiplicados para observação da manutenção da estabilidade da cor mutada. Após estes testes, o produtor se interessou para possível comercialização e iniciou a multiplicação de um mutante de *Calathea* contendo folha variegada e um mutante de *Stromanthe* com a nervura central mais larga, com coloração cinza.

Realizou-se também um trabalho com outra espécie ornamental, o *Aster sp.*, visando-se a obtenção de mutantes com novas colorações em cultivares com boas características agronômicas. Tal pesquisa envolveu duas empresas privadas, ambas situadas em Holambra - SP. Este projeto se constituiu num outro exemplo de interação da pesquisa com o setor produtivo. Plantas *in vitro* de *Aster sp.* foram enviadas ao CENA/USP para irradiação. A seguir, na empresa foram feitas várias multiplicações *in vitro* das plantas objetivando o avanço das gerações (V_2M_1 , V_3M_1). Após a aclimatização ao meio ambiente, as plantas foram enviadas ao campo de produção para proceder à seleção de mutantes. Alguns mutantes com alteração na coloração de pétala e outros, com maior número de pétalas, foram obtidos.

Como já descrito acima no exemplo de trabalho com crisântemo, em ornamentais trabalhos de associação de cultura de tecidos com indução de mutação podem ser de interesse. Em *Heliconia bihai*, Rodrigues et al. (2005) determinaram que a dose a ser utilizada para indução de mutação *in vitro* se situa entre 30 e 40 Gy de raios-gama. O primeiro autor relata (Rodrigues, comunicação pessoal, 2007) que utilizando raios-gama e avançando quatro gerações *in vitro*, obteve em *Heliconia* mutantes com florescimento mais precoce e de porte menor. Diante disto a metodologia será utilizada para a obtenção dos mesmos tipos de mutantes em *Heliconia bihai* cv. chocolate.

Uma questão adicional é que trabalhos de mutagênese induzida envolvendo a cultura de tecidos podem propiciar uma fonte de variabilidade genética adicional, devido a possibilidade da ocorrência de variação somaclonal, por causa da cultura de tecidos. No Brasil já existem algumas referências sobre o assunto, como por exemplo: o trabalho de abacaxi ornamental (Rodrigues et al., 2007) e na revisão de Schum & Preil (1998) em que os autores citam alguns exemplos de novas cultivares de ornamentais, obtidas por meio da variação somaclonal e já liberadas para cultivo comercial.

Em certos casos, todo o procedimento (indução, seleção, multiplicação) pode ser realizado *in vitro*. Como exemplo pode-se citar um trabalho iniciado com a PROCLONE, envolvendo a mini-rosa, variedade que é comercializada em tubos de ensaio. A cultivar em questão apresenta cor vermelha e plantas *in vitro* foram irradiadas com várias doses de raios-gama, objetivando-se a seleção, a ser realizada também *in vitro*, de mutantes de outra coloração. Uma vez obtido o mutante, gemas axilares podem ser retiradas dessas plantas e multiplicadas *in vitro*. Evidentemente que este é um caso extremo pois, em geral, a cultura de tecidos é utilizada em uma ou poucas fases experimentais, tais como: para o avanço de geração após o tratamento mutagênico ou para a seleção *in vitro*.

Recentemente um outro projeto de pesquisa foi iniciado em que se visa a indução de mutantes em *Amaryllis sp.* e *Gladiolus*, em colaboração com outra empresa de Holambra - SP e a UNESP, Ilha Solteira-SP. Tais ornamentais são propagadas por bulbos e sendo assim, para a obtenção de mutantes estáveis será necessário após a irradiação dos bulbos, avançar as gerações de propagação vegetativa. Para *Amaryllis*, um dos métodos que se pretende usar será semelhante ao descrito por Broertjes & Van Harten (1988), na Holanda, que relataram que os melhores resultados foram obtidos com a irradiação de bulbos, seguido da multiplicação vegetativa pelo método de corte desses bulbos em escamas e

germinação em substrato apropriado. Plantas serão obtidas a partir das escamas e estas serão conduzidas até o florescimento, período apropriado para a seleção de mutantes. Uma outra possibilidade seria a irradiação de bulbos, plantio e obtenção de novos bulbos a partir desses, para permitir uma ampliação de possíveis setores mutados. Neste caso, experimentos preliminares já indicaram que a dose a ser utilizada em bulbos pequenos (de primeiro ciclo) estaria ao redor de 8,0 Gy de raios-gama (Pereira et al., 2007).

CONCLUSÕES

Como ocorreu em outros países, também no Brasil verifica-se um aumento da importância das ornamentais. As ornamentais, por uma série de razões, apresentam certas dificuldades na aplicação dos chamados métodos tradicionais de melhoramento. Por outro lado, em vários países, por meio de mutações induzidas têm sido liberadas centenas de novos cultivares envolvendo distintos tipos de ornamentais.

No Brasil, ainda é reduzido o número de trabalhos envolvendo os chamados métodos tradicionais de melhoramento de plantas ornamentais assim como reduzidos também são os trabalhos envolvendo indução de mutações.

O Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), por meio de financiamentos obtidos da FAPESP e com a colaboração de produtores, tem obtido sucessos em trabalhos com indução de mutações *in vivo* e *in vitro*, envolvendo plantas ornamentais. Em 1999, com auxílio da FAPESP, o Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP adquiriu um novo irradiador de raios-gama, que tem tido grande utilidade nestes trabalhos. Este equipamento tem sido colocado à disposição, sem nenhum ônus, para os pesquisadores, produtores e instituições públicas ou privadas de vários Estados Brasileiros. Portanto, espera-se que haja no Brasil uma utilização mais intensa das facilidades existentes nesta área e que um maior número de projetos de pesquisa sejam iniciados visando a indução de mutações em ornamentais, quer seja para a ampliação da variabilidade genética ou para a obtenção de novas cultivares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMES, A. H. **Metodologia in vivo e in vitro na mutagênese de crisântemo com o uso de raios-gama e metanossulfonato de etila (EMS) visando o melhoramento.** 1998.

129f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1998.

BOERSEN, M.A.; SANTOS, P.C. **Indução de mutação por raios-gama a partir de mudas de crisântemo de vaso visando-se a obtenção de novas cultivares.** 2003. 152f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Piracicaba: Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2003.

BOERSEN, M.A.; TULMANN NETO, A.; LATADO, R. R.; SANTOS, P.C. Efeitos de doses de raios-gama na obtenção de mutantes de coloração de inflorescência de crisântemo (*Dendranthema grandiflorum*). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental.** v.12, n. 2, p.126-123, 2007.

BROERTJES, C.; HACCIUS, B.; WEIDLICH, S. Adventitious bud formation on isolated leaves and its significance for mutation breeding. **Euphytica**, Wageningen, v.17, p.321-44, 1968.

BROERTJES, C.; VAN HARTEN, A. M. **Application of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops; an interpretative literature review.** New York: Elsevier Scientific Publishing Company, 1978. 316p.

BROERTJES, C.; KOENE, P.; VAN VEEN, J. W. H. A mutant of a mutant. Irradiation of progressive radiation-induced mutants in a mutation breeding programme with *Chrysanthemum morifolium* Ram. **Euphytica**, Wageningen, v.29, n.3, p.525-30, 1980.

BROERTJES, C.; VAN HARTEN, A. M. **Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops**. New York: Elsevier Scientific Publishing Company, 1988. 313p.

FLORA BRASILIS. **Relatório do diagnóstico da produção de flores e plantas ornamentais**. Campinas: IBRAFLORES/APEX, 2002.CD-Rom

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Manual on mutation breeding**. 2.ed. Vienna: IAEA, 1995. 288p.

KAMPF, A. N. A floricultura brasileira em números. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.3, n.2, p.1-7, 1997.

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

LATADO, R. R.; TULMANN NETO, A. Use of gamma rays in mutation breeding of *Calathea louisae* cv Albertii. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.19, n.3, p.197, 1996. Suplemento. /Apresentado ao 42. Congresso Nacional de Genética, Caxambu, 1996 – Resumo/

LATADO, R. R.; TULMANN NETO, A.; MENDES, B. M. J. Melhoramento de crisântemo CV Repin Rosa através de indução de mutação *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.10, p.743-52, 1996.

LATADO, R. R.; TULMANN NETO, A. Use of gamma-rays to induce color mutations in chrysanthemum cv. White Tinsel. **Multiciência**, São Carlos, v. 3, n.1, p.142-7, 1998.

MALUSZYNSKI, M.; VAN ZANTEN, L.; ASHRI, A.; BRUNNER, H.; AHLOOWALIA, B.; ZAPATA, F. J.; WECK, E. Mutation techniques in plant breeding. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Induced mutation and molecular techniques for crop improvement**. Vienna: IAEA, 1995. p. 489-504.

MALUSZYNSKI, M.; NICHTERLEIN, L.; VAN ZANTEN, L.; AHLOOWALIA, B. Officially released mutant varieties –The FAO/IAEA database. **Mutation Breeding Review**, Vienna, v.12, 2000. 84p.

RODRIGUES, P.H.V.R.; TULMANN NETO; DUTRA, M.F.B. Gamma Radiation LD50 determination in *Heliconia bihai* (Heliconiaceae) explants. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. v.11, n.1, p.78-81, 2005.

RODRIGUES, P.H.V.R.; DUTRA, M.F.B.; FARIA, O. A.; LIMA, A.M.P. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental, *Ananas bracteus* Schultes var. *striata* (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. v.12, n.2, p.122-125, 2007.

SCHUM, A.; PREIL, W. Induced mutation in ornamental plants. In MOHAN JAIN, S.; BRAR, D.S.; AHLOOWALIA, B. (Eds.). **Somaclonal variation and induced mutations for crop improvement**. Kluwer Academic Publishers, 1998, p.333-366.

TULMANN NETO, A.; ANDO, A.; MENDES, B. M. J. Ampliação da variabilidade genética em algumas frutíferas através da indução de mutação. In: 1., SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS DE ESPÉCIES HORTÍCOLAS, Campinas, 1989. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1990. p.148-67.

TULMANN NETO, A.; LATADO, R. R. Mutation breeding in *Stromantha sanguinea* by gamma radiation. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.19, n.3, p.197, 1996. Suplemento. /Apresentado ao 42. Congresso Nacional de Genética, Caxambu, 1996 – Resumo/

TULMANN NETO, A.; LATADO, R. R. Indução de mutação *in vivo* no melhoramento de crisântemo CV. Repin Rosa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.11, p.1153-1158, 1997.

TULMANN NETO, A.; MENDES, B. M. J.; ANDO, A. Progressos e uso de mutações *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, S. L.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação**, 1998, p.459-506.

TULMANN NETO, A.; BOERSEN, M.A.; LATADO, R. R.; SANTOS, P.C. Efeitos de doses de raios-gama na obtenção de mutantes de coloração e morfológicos na inflorescência de crisântemo de vaso (*Dendranthema grandiflorum*). 3., Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, **Anais...** Gramado, 2005.

PALAVRAS CHAVE:

Ornamentais, melhoramento, indução de mutação