

# INDUÇÃO E SELEÇÃO DE MUTANTES EM LARANJA 'PÊRA' MEDIANTE O EMPREGO DE RADIAÇÃO GAMA<sup>1</sup>

AUGUSTO TULMANN NETO<sup>2</sup>, JOSÉ O. MACHADO MENTEN<sup>3</sup>,  
AKIHIKO ANDO<sup>2</sup>, JORGINO POMPEU JUNIOR, JOSÉ ORLANDO FIGUEIREDO<sup>4</sup>,  
LEONARDO CERAVOLO<sup>5</sup>, TAKAO NAMEKATA e ANTONIO C. ROSSI<sup>6</sup>

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi avaliar a metodologia de indução de mutação e de seleção de mutantes de interesse em laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osb.) mediante a irradiação de borbulhas com 4,0 kR de raios gama. O método das podas repetidas foi aplicado nos ramos V1M1, originados após a irradiação, usando-se as seis primeiras borbulhas ao longo destes ramos para a obtenção da geração V2M1. Borbulhas de V2M1 foram enxertadas para a obtenção da geração V3M1. A seleção foi feita nos quadrantes Norte, Sul, Leste e Oeste das plantas sobreviventes. Foram selecionadas 127 plantas que diferiam do controle com relação a características agrônomicas, tais como altura da copa, número de sementes por fruto, produtividade, tipo de fruto, morfologia de folha e fruto, etc. Pela maior frequência de mutantes morfológicos observada nas folhas e nos frutos, concluiu-se que a quinta e sexta borbulhas ao longo de V1M1 devem ser as preferidas, no caso de uso da presente metodologia. O sistema de dividir as plantas em quadrantes para a seleção mostrou-se eficiente, pois, apesar de se aplicar o método das podas repetidas, as plantas ainda mostravam quimerismo. Os clones selecionados estão sendo avaliados no campo para a confirmação da natureza e da estabilidade genética das modificações.

Termos para indexação: *Citrus sinensis*, borbulhas.

## MUTANT SELECTION AND INDUCTION IN 'PERA' SWEET ORANGE USING GAMMA-RAYS

ABSTRACT - The objective of the present research was to evaluate the methodology to select mutants of interest in the 'Pera' sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.), using bud gamma irradiation with 4,0 kR. The cutting back method was applied to the V1M1 branches originated after irradiation, and the six first buds from these branches were used to obtain V2M1 generation. Buds from these V2M1 branches were grafted to get the V3M1 generation. Selection was made in the quadrants (North, South, East and West) of the surviving plants, and 127 were selected. These plants differed from the controls in relation to agronomic characteristics such as canopy height, seed number in the fruits, yield, fruit shape, leave morphology, etc. The higher frequency of morphological changes observed in the leaves and fruits leads to conclude that the fifth and sixth buds along the V1M1 branch should be used when the present methodology is applied. The system of dividing the selecting plants into quadrants proved to be efficient because, despite the cutting back method used, the plants still showed chimerism. The selected clones are under evaluation in field condition in order to confirm the nature and the genetic stability of changes.

Index terms: *Citrus sinensis*, buds.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de laranja e exportador de suco cítrico concentrado do mundo. As cultivares mais utilizadas no Brasil apresentam vários problemas (Moreira & Pio, 1991) que podem ser resolvidos pelo melhoramento genético, o que auxiliaria a citricultura a manter a sua importância em nosso País. Várias são as dificuldades existentes na aplicação dos métodos tradicionais no melhoramento dos citros e, por isto, várias cultivares de grande

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 20 de junho de 1996.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Caixa Postal 96, CEP 13400-970 Piracicaba, SP.

<sup>3</sup> Eng. Agr., ESALQ, Caixa Postal 9, CEP 13400-970 Piracicaba, SP.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Instituto Agrônomo de Campinas, Estação Experimental Sylvio Moreira, Caixa Postal 4, CEP 13490-000 Cordeirópolis, SP.

<sup>5</sup> Eng. Agr., Instituto Biológico de São Paulo, Caixa Postal 7119, CEP 04014-002 São Paulo, SP.

<sup>6</sup> Eng. Agr., Instituto Biológico, Estação Experimental de Presidente Prudente, Caixa Postal 298, CEP 19100-000 Presidente Prudente, SP.

importância mundial resultaram de mutações somáticas espontâneas, como tem sido relatado por autores de vários países (Bono et al., 1981; Hensz, 1981; Iwamasa & Nishiura, 1981; Mendel, 1981; Russo, 1981). Como discutido por alguns destes autores (Mendel, 1981), não são todas as mutações somáticas espontâneas que resultam em bons fenótipos ou em cultivares. Por isto, visando a aumentar a frequência de mutações e as possibilidades de sua utilização comercial, tem sido sugerido o uso de mutagênese no melhoramento dos citros, e algumas cultivares já foram obtidas por esse processo (Spiegel-Roy, 1990), dotadas de características relacionadas à coloração da polpa e à ausência de sementes.

Os tratamentos mutagênicos, em geral, envolvem o uso de radiações, podendo ser feitas *in vivo* ou *in vitro*, em várias partes da planta, tais como calos, nucelos, borbulhas, plântulas decapitadas, etc. (Broertjes & Van Harten, 1988). Etapas de importância nestes trabalhos referem-se à escolha da dose e à maneira de isolar o mutante após o tratamento mutagênico (Spiegel-Roy, 1990). Quando estruturas multicelulares, como borbulhas, são utilizadas, a ocorrência de mutação leva ao quimerismo, havendo a necessidade de isolar a mutação nas borbulhas do ramo VIM1, originado após o tratamento. De acordo com a posição das borbulhas ao longo do ramo VIM1, pode variar a frequência das mutações e, por isto, em algumas frutíferas, tais como maçã (Lapins, 1973) e cereja (Donini, 1976), existem indicações sobre quais as melhores posições das borbulhas a serem utilizadas para aumentar o sucesso da técnica. Em *Citrus*, o método das podas repetidas tem sido utilizado no isolamento de mutações somáticas, verificando-se que em alguns foram utilizadas as nove primeiras borbulhas de VIM1 (Russo et al., 1981). Há também recomendações de utilização das borbulhas denominadas de 3 a 15 a partir da base do novo ramo (Spiegel-Roy et al., 1985). Não se encontrou na literatura disponível uma clara referência sobre qual a melhor ou as melhores posições das borbulhas ao longo de VIM1 em *Citrus*. Esta seria uma informação de interesse, pois poderia facilitar e baratear o trabalho do melhorista ao reduzir o número de árvores a serem plantadas na etapa de seleção. Existem poucas informações e poucos trabalhos com indução de mutação no

melhoramento de frutíferas no Brasil (Tulmann Neto et al., 1990), reconhecendo-se que há a necessidade de pesquisas básicas e aplicações práticas que possibilitem sua maior utilização pelos melhoristas.

Diante do que se discutiu anteriormente, iniciou-se em 1983 este trabalho objetivando a indução de mutação pelo emprego de radiação gama em borbulhas da cultivar Pêra. Além da seleção de mutantes quanto a caracteres de importância agrônômica, tais como porte da planta, número de sementes, época de colheita, resistência ao cancro-cítrico, etc., o presente estudo pode permitir o esclarecimento de certos aspectos metodológicos relacionados à indução de mutação, mediante a irradiação de borbulhas e as podas repetidas em *Citrus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

A cultivar Pêra foi utilizada por ser a mais importante da citricultura brasileira e também uma das preferidas pela indústria de suco. Ramos novos, recém-colhidos do Banco Ativo de Germoplasma da Estação Experimental Sylvio Moreira, em Cordeirópolis, SP, foram levados para o Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), para os tratamentos com raios gama.

### Determinação da sensibilidade a raios gama

Na escolha da dose definitiva a ser utilizada no trabalho, realizou-se um experimento preliminar. Os ramos com borbulhas foram levados para a fonte de  $^{60}\text{Co}$  do CENA e a irradiação foi feita com as fontes pares usando-se a taxa de dose de 113,7 kR/hora, com os diâmetros dos tubos na fonte de 60 cm. As doses utilizadas foram de 3,0 ; 4,5 ; 6,0 ; 7,5 e 9,0 kR, com 50 borbulhas por tratamento. As borbulhas irradiadas e as testemunhas foram enxertadas em limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) (duas em cada porta-enxerto) na Estação Experimental, em Cordeirópolis. A avaliação dos efeitos primários dos tratamentos foi feita nos ramos provenientes das borbulhas tratadas, denominados de VIM1. Além de observações visuais, anotou-se a percentagem de pegamento e a altura destes ramos, aos 104 dias após a enxertia.

### Aplicação do método das podas repetidas para a obtenção de mudas e seleção de mutantes

Na formação de mudas para o plantio no campo, 120 ramos com borbulhas foram irradiados com raios gama na dose de 4,0 kR, determinada segundo o ensaio anterior.

or. O total de 2.297 borbulhas irradiadas e 103 do controle foram enxertadas em 1.000 porta-enxertos de limão 'Cravo'. Nos ramos VIM1 foram feitas observações, tais como altura aos 125 dias e contagem do número de pegamento dos enxertos. Nestes ramos VIM1, aplicou-se o método das podas repetidas para avanço das gerações, visando à seleção de mutantes. Também com o objetivo de determinar qual a melhor posição das borbulhas para isolar estes mutantes, resolveu-se aplicar estas podas de modo que três tratamentos fossem obtidos. No primeiro, os ramos VIM1 foram podados, deixando-se as duas primeiras borbulhas, a partir da base do ramo. No segundo, a poda foi feita abaixo da quinta borbulha, eliminando-se as borbulhas 1 e 2, e no terceiro, abaixo da sétima borbulha, eliminando-se as borbulhas 1, 2, 3 e 4. Portanto, os ramos V2M1 foram obtidos respectivamente das borbulhas 1 e 2 (tratamento I); 3 e 4 (tratamento II); 5 e 6 (tratamento III). Ao contrário dos trabalhos citados anteriormente, no presente estudo resolveu-se usar apenas até a sexta borbulha ao longo de VIM1, pois observou-se que seis borbulhas consecutivas cobriam toda a circunferência do ramo e deveriam, portanto, incluir todos os possíveis mutantes setoriais induzidos. Em trabalho com maçã, Lapins (1973), baseando-se na filotaxia, recomendou a utilização de cinco borbulhas consecutivas ao longo de VIM1.

Posteriormente, as seis primeiras borbulhas das ramificações V2M1 do tratamento I, as quatro primeiras do tratamento II e as duas do tratamento III foram coletadas e enxertadas em limão 'Cravo'. Este procedimento foi adotado baseando-se em experiências de outros autores com indução de mutações em frutíferas e em estudos sobre a ocorrência de mutações somáticas em primórdios de borbulhas axilares de diferentes tamanhos (Donini & Micke, 1984). Na Fig. 1 ilustra-se todo o sistema utilizado neste trabalho.

Nas ramificações V2M1 e nos controles foram anotadas as modificações fenotípicas que ocorreram nas folhas e hastes. Assim que as ramificações V3M1 foram obtidas, as 7.597 plântulas resultantes foram transplantadas para o campo na Estação Experimental de Presidente Prudente, do Instituto Biológico, SP. A partir deste estádio, as mudas foram conduzidas da maneira tradicional para a formação de um pomar, utilizando-se também os mesmos tratamentos culturais na sua manutenção. Este plantio foi intercalado com plantas da cultivar Baianinha, altamente suscetível ao cancro-cítrico, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *citri*; estas plantas receberam inóculos da suspensão bacteriana para facilitar a dispersão da doença.

Apesar das podas utilizadas, ainda se poderia esperar a ocorrência de quimerismo; por isto, na época de seleção de mutantes, cada planta foi examinada independentemente por quatro pessoas nos quadrantes Norte, Sul, Leste e

Oeste. Foram avaliados, de 1988 a 1991, os seguintes caracteres: ocorrência de cancro-cítrico nas folhas e nos frutos; altura da planta; número de sementes e sabor do fruto; época de maturação; e estimativa da produtividade. A altura da copa foi avaliada visualmente, segundo duas categorias: 1) altura normal; e 2) altura baixa, tomando-se como referência a altura normal da cultivar Pêra (controle). Quanto ao número de sementes por fruto, tomou-se ao acaso um fruto por quadrante, contando-se o número de sementes que foi classificado de normal (igual ou maior que seis sementes por fruto, que é o número típico de sementes da cultivar Pêra) ou baixo (menor que seis sementes por fruto). Este mesmo fruto foi avaliado quanto ao sabor, considerando-se as classificações: sabor normal (típico da cultivar Pêra) ou sabor diferente. Também foram catalogadas variações no tipo de fruto (tamanho, formato, presença de estrias) e no formato e na coloração das folhas, sempre tomando-se como padrão as características da cultivar Pêra original.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Determinação da sensibilidade a raios gama

Na Tabela 1 observa-se que, como esperado dos efeitos primários da radiação, quanto maior a dose de raios gama maior o decréscimo no pegamento da enxertia e na altura média de VIM1, sendo letal a dose de 9,0 kR.

Em trabalhos com indução de mutação, uma das filosofias existentes é a que se devem evitar doses muito elevadas, que poderiam levar à ocorrência de mutações múltiplas, especialmente indesejáveis em plantas de propagação vegetativa (Broertjes & Van Harten, 1988). Em frutíferas têm sido utilizadas (Donini, 1977) doses ao redor da LD50 (que causam 50% de letalidade). Em *Citrus*, quando se usam borbulhas, as doses têm variado de 2 a 8 kR (Russo et al., 1981; Wu et al., 1986), evidenciando esta grande variação que se deve utilizar em teste com a cultivar da espécie em estudo. Spiegel-Roy & Kochba (1973), em trabalhos com radiosensibilidade de borbulhas em *Citrus sinensis*, utilizaram doses de 2,5, 5,0 e 7,5 kR, concluindo que apenas as duas últimas afetavam a percentagem de pegamento dos enxertos e que a LD50 situava-se ao redor de 5,0 kR. No presente trabalho, a LD50 estaria situada entre 4,5 e 6,0 kR; portanto, dentro da faixa verificada por este último autor. Entretanto, como se observa pelos resultados na Tabela 1, se esta dose fosse utilizada iria produzir uma grande redução no crescimento do ramo VIM1. Optou-se, então, por

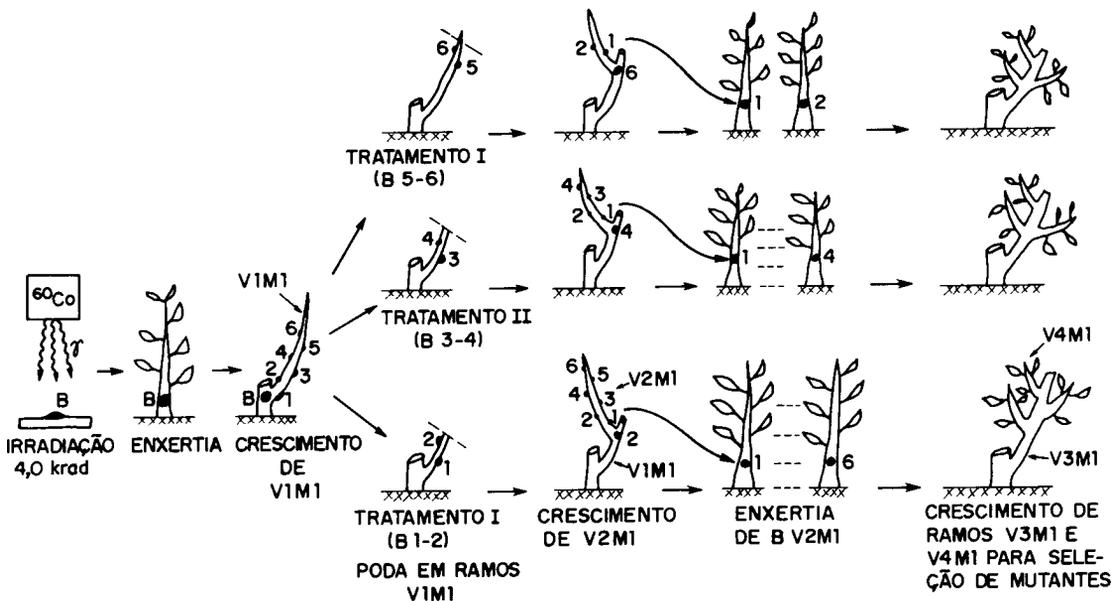


FIG. 1. Esquema utilizado no isolamento de mutações em laranja 'Pêra' a partir de borbulhas (B na figura) irradiadas com raios gama.

utilizar na continuação do experimento a dose de 4,0 kR, com a qual se poderia esperar certa redução na sobrevivência dos enxertos (34%); porém, com a manifestação de efeitos não muito drásticos no crescimento da ramificação V1M1. Em cereja, Lapins (1973), usando doses moderadas de radiação, que produziam redução de 40% na sobrevivência das borbulhas irradiadas, obteve as maiores freqüências de mutações. Lacey & Campbell (1982), em indução de mutações em maçã, discutem que a seleção de doses que causam maiores danos em V1M1 pode levar a maiores freqüências de mutantes em gerações posteriores, mas que também mutações mais severas têm menores probabilidades de serem de interesse comercial. Em trabalho de Spiegel-Roy & Kochba (1973) com *C. sinensis*, as maiores freqüências de mutações foram obtidas com doses de 7,5 kR, que determinaram apenas 10% de sobrevivência nas borbulhas irradiadas; porém, não esclareciam a utilidade prática dos mutantes obtidos.

#### Efeitos da radiação nas ramificações V1M1 e V2M1, provenientes da irradiação de borbulhas com 4 kR

Na Tabela 2 observam-se os efeitos primários da irradiação nos ramos V1M1, provenientes de bor-

bulhas irradiadas com 4 kR de raios gama. Verifica-se que, neste caso, a irradiação produziu um decréscimo de 10,1% no pegamento das borbulhas e uma diminuição de 25,0% no crescimento. Estes efeitos foram, portanto, menos severos do que os observados no teste preliminar de sensibilidade (Tabela 1), mas se mantiveram dentro do critério adotado nesta pesquisa, em que se procurou evitar o uso de doses muito elevadas, que poderiam acarretar percentagem maior de mutações, porém alterando de maneira muito drástica as características originais da cultivar Pêra.

As freqüências e os tipos de alterações fenotípicas avaliadas nos ramos V2M1 provenientes de borbulhas irradiadas com 4,0 kR, nos três tratamentos utilizados, encontram-se nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Verifica-se, na Tabela 3, que, à medida que se analisam as borbulhas mais distanciadas da base do ramo, há uma tendência de aumento no número de alterações. Deve-se reconhecer que a maioria destas alterações não deve ser causada por mutações e sim pelos efeitos primários da radiação. Entretanto, estes tipos de alteração têm servido como parâmetros úteis na indução de mutação em plantas de propagação vegetativa. Assim é que, baseando-se neste

**TABELA 1. Efeitos da radiação gama no pegamento de enxertia e altura média dos ramos V1M1 originados após o tratamento de borbulhas da cultivar Pêra com 4,0 kR. Estação Experimental Sylvio Moreira, do Instituto Agronômico, Cordeirópolis, SP, 1982<sup>1</sup>.**

Dose (kR)	Pegamento da enxertia		Altura média do V1M1	
	Real (%)	Em relação ao controle	Real (cm)	Em relação ao controle
0,0	43	100,0	77,1	100,0
3,0	32	66,0	58,2	75,5
4,5	32	66,0	30,8	40,0
6,0	13	30,2	18,2	23,6
7,5	5	11,6	7,5	9,7
9,0	0	0,0	0,0	0,0

<sup>1</sup> Avaliações feitas 104 dias após a enxertia.

**TABELA 2. Efeitos primários da radiação gama em ramos V1M1 provenientes de borbulhas da cultivar Pêra irradiadas com 4,0 kR de raios gama. Estação Experimental Sylvio Moreira, do Instituto Agronômico, Cordeirópolis, SP, 1983<sup>1</sup>.**

Dose (kR)	Pegamento da enxertia em % em relação ao número de borbulhas enxertadas	Altura Média do V1M1	
		Real (cm)	Em relação ao controle (%)
0,0	100,0	65,8	100,0
4,0	89,9	49,7	75,0

<sup>1</sup> Avaliações realizadas 125 dias após a enxertia.

**TABELA 3. Frequência de alterações morfológicas em ramos V2M1 originados de borbulhas ao longo de ramos V1M1 provenientes de borbulhas de laranja 'Pêra' irradiadas com 4,0 kR de raios gama e dos controles. Estação Experimental Sylvio Moreira, do Instituto Agronômico, Cordeirópolis, SP, 1983.**

Ramos V2M1 provenientes de borbulhas ao longo do ramo V1M1	Número de ramos analisados	Alterações morfológicas	
		Número	%
Controles	175	8	4,57
Tratamento I (Borbulhas 1 e 2)	1.125	106	8,42
Tratamento II (Borbulhas 3 e 4)	1.107	221	20,00
Tratamento III (Borbulhas 5 e 6)	1.071	248	23,20

**TABELA 4. Frequência dos vários tipos de alterações fenotípicas em ramos V2M1 originários de borbulhas ao longo de ramos V1M1, provenientes de borbulhas de laranja 'Pêra' irradiadas com 4,0 kR de raios gama. Estação Experimental Sylvio Moreira, do Instituto Agronômico, Cordeirópolis, SP, 1983.**

Tipos de alterações fenotípicas em ramos V2M1 <sup>1</sup>	Porcentagem em relação ao total de alterações morfológicas		
	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
Folha disforme	55,1	50,6	62,8
Folha alongada	7,6	13,1	8,0
Folha espessa	2,5	18,8	0,0
Folha larga	6,8	3,7	1,0
Coloração da folha	4,2	1,1	1,0
Folha retorcida	1,7	1,1	1,0
Folha dupla	0,0	0,4	0,0
Haste retorcida	6,8	6,0	18,6
Haste bifurcada	11,9	3,0	2,6
Haste dupla	1,7	0,0	0,0
Internódio curto	1,7	2,2	4,8
Espinho longo	0,0	0,0	0,6

<sup>1</sup> Nos ramos V2M0 do controle observou-se apenas o aparecimento de folhas disformes.

tipo de informação, recomenda-se em maçã o uso de borbulhas situadas entre a sexta e décima posição ao longo de V1M1 (Lapins, 1973). Em cereja sugere-se o uso de borbulhas situadas entre a quinta e décima posição, obtendo-se a mais alta frequência de mutantes de internódio curto e mais grosso com a quinta e a sexta borbulhas (Donini, 1976).

Como se discutiu anteriormente, nos vários trabalhos na literatura com *Citrus*, verificam-se referências sobre o uso das nove primeiras (Russo et al., 1981) e da terceira à décima-segunda ou décima-quinta borbulha ao longo do V1M1 (Spiegel-Roy et al., 1985; Spiegel-Roy & Vardi, 1989), mas os autores não chegaram a esclarecer quais as borbulhas que deveriam ser recomendadas, visando a maior frequência de mutantes. Baseando-se nos dados do presente trabalho, a indicação é pelo uso da quinta e sexta borbulhas.

Pela Tabela 4 verifica-se que, independentemente do tratamento, como também observado no trabalho de Spiegel-Roy & Kochba (1973), o tipo mais frequente de modificação foi folhas disformes, observando-se igualmente grande frequência de folhas mais alongadas e haste retorcida. Vale salientar que,

nos três tratamentos, verificou-se a ocorrência de certa percentagem de ramos com internódios curtos, que poderiam estar associados a mutantes de porte compacto e, deste modo, ter grande interesse no sentido de facilitar a colheita.

### Seleção de mutantes

As seleções foram feitas no campo durante quatro anos de observações a partir de 6.400 plantas sobreviventes, sendo 519 relacionadas aos controles, 3.296 ao tratamento I, 1.804 ao tratamento II e 781 ao tratamento III.

Com relação ao cancro-cítrico, observou-se que, apesar das inoculações feitas em 'Baianinha', as condições ambientais em certos anos não favoreceram a ocorrência uniforme da doença no pomar, verificando-se grande número de escapes. Na Tabela 5 ilustra-se a avaliação de cancro-cítrico em três plantas de cada um dos três tratamentos originados das borbulhas irradiadas. Tanto nesses tratamentos como nos controles, observou-se grande número de quadrantes com sintomas ausentes ou fracos (notas 0 e 1, Tabela 5) da doença, devendo-se esclarecer que nos controles a nota 1 era a predominante. Embora a previsão de que a irradiação pudesse aumentar a variabilidade genética e permitir a seleção de plantas com menor intensidade de sintomas, não se admite que o número destas plantas seja tão elevado, como ocorreu. Decidiu-se então não dar destaque para este tipo de seleção, pois seria impraticável trabalhar com um número elevado de plantas. Utilizou-se em cancro-cítrico um outro enfoque, que será relatado posteriormente.

Em relação aos outros caracteres agrônomicos, foram observadas variações em produtividade, altura da copa, número de sementes, maturação, formato e sabor dos frutos, presença de estrias na casca dos frutos, cor da polpa e modificações no formato e na clorofila das folhas. Estes tipos de modificação são comumente relatados em trabalhos com indução de mutação em frutíferas, originando dos mutantes selecionados cultivares que diferem das originais pelo porte compacto, ciclo mais precoce, melhor coloração do fruto, ausência de sementes, etc. (Lacey & Campbell, 1982; Lapins, 1983; Spiegel-Roy et al, 1985; Wu et al., 1986; Spiegel-Roy, 1990; Hensz, 1991).

**TABELA 5. Exemplos da avaliação quanto a cancro-cítrico nos quadrantes Norte (N), Sul (S), Leste (L) e Oeste (O) em algumas plantas dos três tratamentos. Estação Experimental do Instituto Biológico, em Presidente Prudente, SP, maio de 1988.**

Tratamento	Planta	Ocorrência de cancro cítrico							
		Folhas <sup>1</sup>				Frutos <sup>2</sup>			
		N	S	L	O	N	S	L	O
Controle	1	0	0	1	0	0	0	0	0
	2	1	1	1	2	1	1	1	1
	3	1	1	3	3	1	0	2	1
I	1	0	1	1	0	0	0	0	0
	2	1	3	3	1	1	1	3	1
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
II	1	2	2	2	3	3	1	2	2
	2	1	2	1	2	0	1	1	0
	3	1	1	1	1	1	2	1	0
III	1	3	2	3	2	2	2	0	2
	2	1	1	1	1	1	0	1	0
	3	1	1	1	1	0	0	0	0

<sup>1</sup> Ocorrência nas folhas: 0 = ausência de sintomas; 1 = fraca (< 10%); 2 = média (10-20%); 3 = alta (> 20%).

<sup>2</sup> Ocorrência nos frutos: 0 = ausência de sintomas; 1 = 1-2 frutos com sintomas; 2 = 3-5 frutos com sintomas; 3 = 6 ou mais frutos com sintomas.

Na Tabela 6 exemplifica-se, em algumas plantas do tratamento I, os resultados da avaliação feita em 1988.

Este exemplo, baseado em apenas algumas plantas do tratamento I, reflete bem o que aconteceu nos demais casos avaliados, notando-se variações de interesse e outras indesejáveis. Houve a ocorrência de várias mutações deletérias, como foi o caso da planta 8, completamente estéril, apesar do grande número de flores que apresentava. A planta número 9 também mostrava mutações não desejáveis, notando-se deficiências de clorofila e formato irregular das folhas, com baixa produção de frutos, que apresentavam sabor diferente do normal. Existiram plantas, como a de número 1, em que todas as características foram normais. Em outras plantas, como a de número 4, em todos os quadrantes foram observados frutos com menor número de sementes, enquanto na planta número 7 apenas o quadrante Leste apresentou esta característica. Isto ocorreu com outras características, como observado na Tabela 6. Concluiu-se então que na população poderiam existir mutantes periclinais ou sólidos, representados por

**TABELA 6. Avaliação de características agrônômicas nos quadrantes Norte (N), Sul (S), Leste (L) e Oeste (O) em algumas plantas do Tratamento I. Estação Experimental do Instituto Biológico, em Presidente Prudente, SP, julho de 1988<sup>1</sup>.**

Planta	Altura	Sementes/fruto				Número de frutos				Sabor do fruto				Outras
		N	S	L	O	N	S	L	O	N	S	L	O	
Controle	N	N	N	N	N	17	30	25	16	N	N	N	N	
1	N	N	N	N	N	18	20	17	38	N	N	N	N	
2	B	N	N	N	N	24	11	14	10	N	N	N	N	
3	N	B	N	N	N	20	38	15	37	N	N	N	N	
4	B	B	B	B	B	6	11	8	10	N	N	N	N	
5	N	N	N	N	N	15	10	10	21	D	D	D	D	
6	N	N	N	N	N	20	28	19	30	D	D	D	D	6a
7	N	N	B	B	N	19	20	10	64	N	N	N	N	7b
8	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8c
9	N	-	N	N	N	-	3	7	2	-	D	D	D	9d
10	N	N	N	N	N	9	10	8	7	N	N	N	N	10e

<sup>1</sup> N = altura, número de sementes (maior ou igual a 6) e sabor do fruto, normais, semelhantes ao controle; B = altura de planta e número de sementes (menor do que 6) menor do que o controle; D = sabor diferente de fruto, em relação ao controle; 6a = frutos com tamanho maior que os do controle em todos os quadrantes; 7b = folhas com formato diferente do controle no quadrante norte; 8c = planta de compacto, com grande número de flores na época de floração, porém sem posterior formação de frutos; 9d = folhas com deficiência de clorofila e formato irregular em todos os quadrantes; 10e = frutos com estrias no quadrante leste da planta.

plantas em que em todos os quadrantes havia a característica mutada ou então plantas quiméricas setoriais, que seriam aquelas em que co-existiriam quadrantes sem a mutação e quadrantes com as características mutadas. Este fato indica que o sistema de podas repetidas e o avanço de gerações utilizado não foram suficientes para evitar a ocorrência de plantas quiméricas e que o sistema de divisão da planta em quadrantes, para seleção, mostrou-se adequado e necessário para contornar esta situação.

Nas avaliações seguintes (1989, 1990, 1991), várias plantas não repetiram as características anteriores, que haviam sido selecionadas, principalmente no que se refere ao número de sementes e sabor do fruto. Isto certamente ocorreu porque a avaliação destas características foi baseada na amostragem de apenas um fruto por quadrante. Embora o porte mais baixo da planta fosse mantido na maioria dos casos, isto poderia ter sido causado por má formação da muda ou pelo efeito de solo e não por uma modificação genética. Para se ter idéia do efeito genético da radiação, resolveu-se utilizar o que se denominou de mutações morfológicas, que não tivessem

uma possível influência ambiental ou de amostragem, tais como mutações típicas de clorofila e formato das folhas e frutos com estrias. Estes tipos de mutantes são freqüentes em trabalhos com *Citrus* (Spiegel-Roy & Kochba, 1973; Russo et al, 1981). Na Tabela 7 apresenta-se o número destas modificações. Confirma-se então o que já se havia observado anteriormente (Tabela 3), ou seja, as plantas provenientes das borbulhas 5 e 6, ao longo de VIM1, foram as que apresentaram as maiores freqüências de mutações, podendo-se recomendar estas borbulhas e as duas primeiras do ramo V2M1, delas originados, para futuros trabalhos de indução de mutação com metodologia semelhante à utilizada neste trabalho.

Na última avaliação resolveu-se também introduzir a época de maturação dos frutos como característica adicional na seleção, escolhendo-se plantas (ou quadrantes de plantas) com maturação tardia ou semitardia, que seriam de grande interesse comercial, no caso da cultivar Pêra. Deste modo, como se observa na Tabela 8, dispunha-se, ao final de 1991, de 127 plantas selecionadas dos três tratamentos. Resolveu-se também incluir oito plantas

**TABELA 7. Frequência de mutações morfológicas nas folhas e nos frutos, induzidas nos três tratamentos, em plantas provenientes da irradiação de borbulhas com 4,0 kR de raios gama. Estação Experimental do Instituto Biológico, em Presidente Prudente, SP, 1991.**

Tratamentos	% Mutações morfológicas
Controles	0,00
Tratamento I (Borbulhas 1-2)	0,82
Tratamento II (Borbulhas 2-3)	0,61
Tratamento III (Borbulhas 5-6)	1,41

selecionadas do controle que apresentavam as características típicas da cultivar Pêra. Nesta Tabela pode-se observar que o maior número de plantas selecionadas ocorreu no tratamento III. Embora a natureza genética das seleções efetuadas ainda deva ser confirmada, estes dados reforçam as conclusões anteriores a respeito das vantagens de utilizar a quinta e sexta borbulhas ao longo de V1M1. Em 1992 foram coletadas cinco borbulhas de cada planta selecionada. Se a característica objeto de seleção se manifestava em toda a planta, a coleta era feita em

**TABELA 8. Número de plantas selecionadas da população provenientes de borbulhas da cultivar Pêra irradiadas com 4,0 kR de raios gama. Estação Experimental do Instituto Biológico em Presidente Prudente, SP, 1991.**

Tratamento	Número de plantas		
	Observadas	Selecionadas	%
I	3.296	64	1,9
II	1.804	27	1,5
III	781	36	4,6

ramos de qualquer quadrante. Porém, se a característica aparecia apenas em um dos quadrantes, as borbulhas eram coletadas apenas deste quadrante. A enxertia foi feita em limão 'Cravo', e em fevereiro de 1993 as mudas foram transplantadas para o campo.

Na continuação do trabalho, as plantas selecionadas foram subdivididas em subgrupos, de acordo com a característica agrônômica principal que motivou sua seleção. Na Tabela 9 enumeram-se esses subgrupos, com suas características e com o número de plantas. Observa-se que, nos subgrupos de 1 a 5, as plantas caracterizavam-se por apresentar apenas uma característica agrônômica predomina-

**TABELA 9. Divisão em subgrupos das 135 plantas matrizes de laranja 'Pêra' selecionadas de população proveniente de borbulhas irradiadas com 4,0 kR de raios gama.**

Características do subgrupo	Número de plantas
Alta produtividade	20
Porte baixo de copa	7
Número baixo de sementes por fruto	16
Maturação	10
Maturação semitardia	6
Porte baixo e baixo número de sementes por fruto	15
Porte baixo, baixo número de sementes por fruto e maturação semitardia	5
Maturação semitardia e baixo número de sementes por fruto	22
Menor intensidade de sintomas de cancro-cítrico <sup>1</sup>	12
Mutantes morfológicos <sup>2</sup>	6
Outras características <sup>3</sup>	8
Plantas do controle	8

<sup>1</sup> Dentre as selecionadas e não em relação à população original.

<sup>2</sup> Frutos com estrias ou folhas alongadas ou deformadas, etc.

<sup>3</sup> Tolerância à seca; bom aspecto geral da planta.

te, enquanto nos de 6 a 9 havia uma combinação de várias características na mesma planta.

Como se pode observar, o subgrupo 9, constituído por 12 plantas, foi composto de indivíduos com menor intensidade de cancro-cítrico; porém, esta seleção foi feita em relação às 127 plantas selecionadas e não em relação à população original, devido às restrições citadas anteriormente, relacionadas à desuniformidade da ocorrência desta doença. Na próxima etapa da pesquisa, a ser conduzida por oito anos, visando à avaliação destes clones, estão sendo realizados vários experimentos em blocos casualizados, com uma planta por parcela e cinco repetições. Cada experimento foi composto por um dos subgrupos enumerados na Tabela 9. Como controle foi introduzida em cada experimento a cultivar Pêra original, obtida de fornecedor comercial de mudas. Espera-se confirmar a natureza genética das modificações ocorridas e também a sua estabilidade, antes que se possa pensar em um possível uso pelos citricultores. Como tem sido discutido por Spiegel-Roy (1990), um dos problemas da indução de mutações em frutíferas refere-se ao receio que os fornecedores de mudas e fruticultores têm com relação à possibilidade de instabilidade decorrente do quimerismo. Este autor cita que, em Israel, mutantes sem sementes induzidos de *Citrus* não têm apresentado reversão, mas em outros países isto ocorre, com determinadas porcentagens de frutos apresentando sementes. Em mutação induzida para coloração mais avermelhada da polpa do fruto em *C. paradisi* Macf, o mutante mostrou instabilidade genética nesta característica, sendo necessárias várias multiplicações vegetativas para que este fato deixasse de ocorrer (Hensz, 1991). Existe, portanto, a necessidade de uma cuidadosa análise dos mutantes obtidos, como será feita com os clones selecionados na presente pesquisa, avaliando-se crescimento, produção, ciclo, eficiência da copa e características comerciais dos frutos (número de sementes, cor da polpa, sabor). Espera-se que, do ponto de vista prático, haja confirmação das características dos clones promissores identificados, especialmente os que apresentarem porte baixo de copa e número baixo de sementes, aliados à alta produtividade, ou que, pelo menos, mantenham a produtividade da cultivar original.

## CONCLUSÕES

1. O aumento da dose de raios gama promove uma diminuição no pegamento dos enxertos e na altura dos ramos V1M1.
2. A quinta e sexta borbulhas de V1M1 e as duas primeiras borbulhas dos ramos V2M1 originados relacionam-se às maiores frequências de mutações.
3. A divisão da copa das árvores em quadrantes é eficiente e necessária na seleção de mutantes.

## REFERÊNCIAS

- BONO, R.; CRODOVA, L.; SOLER, J. Arrutina, Esbal and Guillermina, three clementine mandarin mutations recently discovered in Spain. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 1981, Tokyo. **Proceedings...** [S.l.]: International Society of Citriculture, 1981. p.94-96.
- BROERTJES, C.; VAN HARTEN, A.M. Mutagenic treatments. In: BROERTJES, C.; VAN HARTEN, N.A. (Eds.). **Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops**. New York: Elsevier, 1988. p.15-23.
- DONINI, B. The use of radiation to induce useful mutations in fruit trees. In: IMPROVEMENT OF VEGETATIVELY PROPAGATED CROPS THROUGH INDUCED MUTATIONS, 1976, Wageningen. **Proceedings...** Vienna: IAEA, 1976. p.56-67.
- DONINI, B. The use of radiation to induce useful mutations in fruit trees. In: WORKSHOP EUR. COMM., 1977, Israel. **Proceedings...** Israel: Association EUROTOM/ITAL, 1977. p.453-478.
- DONINI, B.; MICKE, A. Use of induced mutations in improvement of vegetatively propagated crops. In: INDUCED MUTATIONS FOR CROP IMPROVEMENT IN LATIN AMERICA, 1982, Lima, Peru. **Proceedings...** Vienna: IAEA, 1984. p.79-98. (IAEA-TECDOC-305).
- HENSZ, R.A. Bud mutations in citrus cultivars in Texas. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 1981, Tokyo. [S.l.] **Proceedings...** International Society of Citriculture, 1981. p.89-91.
- HENSZ, R.A. Mutation breeding of grapefruit. In: PLANT MUTATION BREEDING FOR CROP IMPROVEMENT, 1990, Vienna. **Proceedings...** Vienna: International Atomic Energy Agency, 1991. p.533-536.

- IWAMASA, M; NISHIURA, M. Recent citrus mutant selection in Japan. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 1981, Tokyo. **Proceedings...** [S.l.]: International Society of Citriculture, 1981. p.96-99.
- LACEY, C.N.D.; CAMPBELL, A.I. Progress in mutation breeding of apples (*Malus pumilla* Mill.) at Long Ashton Research Station Bristol, United Kingdom. In: INDUCED MUTATIONS IN VEGETATIVELY PROPAGATED PLANTS, 2., 1980, Coimbatore. **Proceedings...** Vienna: IAEA, 1982. p.11-28.
- LAPINS, K.O. Induced mutations in fruit trees. In: INDUCED MUTATIONS IN VEGETATIVELY PROPAGATED PLANTS, 1972, Vienna. **Proceedings...** Vienna: IAEA, 1973. p.1-40.
- LAPINS, K.O. Mutation breeding. In: MOORE, J. N.; JANICK, J. (Eds.). **Methods in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1983. p.74-99.
- MENDEL, K. Bud mutations in citriculture and their potential commercial value. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 1981. **Proceedings...** [S.l.]: International Society of Citriculture, 1981. p.86-89.
- MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUES, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. (Eds.). **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p.116-151.
- RUSSO, F. Bud variations in citrus cultivars in Italy. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 1981, Tokyo. **Proceedings...** [S.l.]: 1981. p.91-94.
- RUSSO, F.; DONINI, B.; STARRANTINO, A. Mutagenesis applied for *Citrus* improvement. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 1981, Tokyo. **Proceedings...** [S.l.]: International Society of Citriculture, 1981. p.68-70.
- SPIEGEL-ROY, P. Economic and agricultural impact of mutation breeding in fruit trees. **Mutation Breeding Review**, v.5, 1990. 26p.
- SPIEGEL-ROY, P.; KOCHBA, J. Mutation breeding in *Citrus*. In: INDUCED MUTATIONS IN VEGETATIVELY PROPAGATED PLANTS, 1972, Vienna. **Proceedings...** Vienna: IAEA, 1973. p.91-103.
- SPIEGEL-ROY, P.; VARDI, A. Induced mutations in *Citrus*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF SABRAO, 6., 1989. **Proceedings...** [S.l.:s.n.], 1989. p.773-776.
- SPIEGEL-ROY, P.; VARDI, A.; ELHANATI, A. Seedless induced mutant in lemon (*Citrus lemon*). **Mutation Breeding Newsletter**, v.26, p.1, 1985.
- TULMANN NETO, A.; ANDO, A.; MENDES, B.M.J. Ampliação da variabilidade genética em frutíferas através da indução de mutações. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS DE ESPÉCIES HORTÍCOLAS, 1., 1990, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1990. p.148-169.
- WU, S.; LIANG, J.; LIN, Z.; TANG, X.; ZENG, S. Using gamma rays to induce mutations for seedlessness in *Citrus*. **Mutation Breeding Newsletter**, v.27, p.14, 1986.