

AVALIAÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CULTIVARES DE AVEIA (*Avena sativa* L.)

SOMATIC EMBRYOGENESIS EVALUATION IN OAT (*Avena sativa* L.) GENOTYPES

Fernanda Bered¹ Maria Jane Cruz de Melo Sereno² Fernando Irajá Félix de Carvalho³
Luiz Carlos Federizzi³ Ana Lúcia Cunha Dornelles⁴ Cláudia Erna Lange⁵
Cristine Luise Handel⁶

RESUMO

Nove genótipos de aveia foram cultivados *in vitro* com o objetivo de formação de calos e posterior avaliação de embriogênese somática. Os calos foram testados em três protocolos (meio MS- MURASHIGE & SKOOG (1962) com diferentes dosagens de hormônios). Após um mês em meio de subcultivo, os calos foram avaliados quanto à porcentagem de embriogênese somática. Os protocolos testados revelaram respostas diferentes na indução de embrióides, proporcionando a escolha do que fosse mais adequado para esta função. No primeiro experimento não foi obtida diferença entre os genótipos, por outro lado, no experimento 2, a UFRGS 7 e UFRGS 8 possuíram médias significativamente maiores. A análise de covariância realizada com o objetivo de verificar se o tamanho de embrião estava envolvido na indução de embriogênese evidenciou que para alguns genótipos esta medida é importante.

Palavras-chave: embrião imaturo, indução de calos, cultura de tecidos, aveia hexaplóide.

SUMMARY

Nine oat genotypes were cultivated *in vitro* to evaluate callus initiation and subsequent somatic embryogenesis. The immature embryo were submitted to different protocols (MURASHIGE & SKOOG (1962) medium with different hormones dosages). The protocols tested caused differences in somatic embryogenesis, and the best of them was selected to continue the research. After a month in subculture medium the calli were evaluated concerning embryoid percentage, and showed differences according to genotype in experiment 2, UFRGS 7 and UFRGS 8 presented superior means. The covariance analysis revealed that in some genotypes this parameter is important.

¹ Bióloga, aluna de Doutorado, Curso de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Bolsista do CNPq, Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, Caixa Postal 776, 95001-970, Porto Alegre, RS. (Autor para correspondência).

² Bióloga, Dr., Professora Pesquisadora do CNPq. Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS.

³ Engenheiro Agrônomo, PhD., Professor Pesquisador do CNPq. Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS.

⁴ Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Adjunto, Departamento de Horticultura, Faculdade de Agronomia, UFRGS.

⁵ Engenheiro Agrônomo, MsC, Pesquisador da FUNDACEP, Cruz Alta, RS.

⁶ Engenheiro Agrônomo, aluna de mestrado do Curso de Fitotecnia, Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS.

Key words: *immature embryo, callus induction, tissue culture, hexaploid oat.*

INTRODUÇÃO

A produção de grãos de cereais tem aumentado de forma intensa no último século. Além da otimização visível do manejo das culturas, a utilização de cultivares superiores obtidas através de melhoramento genético é um dos fatores que tem contribuído em grande parte para o progresso obtido (FEIL, 1992). Por outro lado, os melhoristas buscam continuamente novas técnicas que venham a incrementar a variabilidade existente nas espécies cultivadas, ou que possam auxiliar como ferramenta no melhoramento de plantas, permitindo seleção de classes genotípicas desejadas. Nas últimas décadas a cultura de tecidos tem sido empregada com diferentes propósitos, proporcionando a manipulação de grande número de plantas a nível celular. A regeneração de plantas a partir de células em cultura é o elo essencial entre a manipulação *in vitro* e o melhoramento a campo. Desta forma, é necessário regenerar grande número de plantas férteis para que as mesmas possam ser selecionadas e utilizadas em testes a campo (CUMMINGS *et al.*, 1976).

Tecidos em cultura podem regenerar plantas de duas formas: via organogênese ou embriogênese somática. A embriogênese somática, ou produção de estruturas bipolares a partir de células somáticas em cultura, é desejável por exibir rápida taxa de crescimento, friabilidade e altos níveis de regeneração de plantas (BREGITZER *et al.*, 1995). Devido a estas características desejáveis, esforços têm sido feitos no sentido de maximizar a embriogênese somática no cultivo *in vitro* de diversos cereais.

EAPEN & RAO (1985) estudando regeneração de trigo, centeio e triticales concluíram que em cereais os calos podem ser parcialmente embriogênicos, sendo que os embrióides somáticos geralmente são escassos. Por outro lado, resultados diferentes tem sido obtidos no cultivo *in vitro* de trigo e triticales no Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética (LCTC) do Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia na UFRGS (DORNELLES *et al.*, 1996; LANGE *et al.*, 1995; MILACH *et al.*, 1991). HEYSER & NABORS (1982) detectaram em média 20% de regiões embriogênicas nos calos de aveia analisados e, segundo BREGITZER *et al.* (1989), o calo embriogênico de aveia é estabelecido em duas etapas: em seu estágio inicial consiste de células vacuoladas não regeneráveis e, em uma segunda oportunidade os setores embriogênicos são selecio-

nados e subcultivados, a fim de obter embriogênese integral. A inicialização da embriogênese ocorre a partir de estruturas globulares chamadas pré-embrióides, os quais, após subcultivo são transformados em embrióides somáticos.

A avaliação de embriogênese somática pode ser feita de diferentes formas. A mais usual delas é a determinação de embriogênese a partir de uma escala subjetiva, onde escores são atribuídos aos diferentes calos. BREGITZER *et al.* (1989) utilizaram a escala de 1 a 5 onde "1" correspondia a calos não friáveis e não embriogênicos e "5" a calos agregados e embriogênicos. IMMONEN (1992) avaliando embriogênese em triticales considerou a escala linear de 1 a 10 adequada para avaliação. O número "1" correspondia a um embrióide e o "10" a mais de 45 embrióides.

Por outro lado, a capacidade de produzir embrióides somáticos a partir de cultivo *in vitro* varia expressivamente com o genótipo, meio de cultura e tipo de explante, o que torna necessária a adequação do cultivo às necessidades da instituição de trabalho. IMMONEN (1992), testou diferentes genótipos de triticales em dois meios de cultura, verificando que o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) promoveu um significativo aumento na embriogênese somática. Por outro lado, TOMES & SMITH (1985) verificaram respostas diferenciadas de produção de calos embriogênicos em diferentes germoplasmas elite de milho. LANGE *et al.* (1995) investigaram o controle genético da embriogênese *in vitro* de trigo, após verificarem diferentes respostas entre genótipos brasileiros para este caráter. Além disto, o embrião imaturo parece ser um consenso como o explante mais adequado para a promoção de calogênese e embriogênese somática de cereais (BREGITZER *et al.*, 1989; MILACH *et al.*, 1991; CUMMINGS *et al.*, 1976; LANGE *et al.*, 1995; IMMONEN, 1992).

Os objetivos deste trabalho foram: testar nove genótipos de aveia quanto a sua capacidade de formação de embrióides somáticos; verificar qual o protocolo de cultura mais adequado para indução de embriogênese somática; verificar se o tamanho de embrião imaturo (explante) está relacionado com a embriogênese.

MATERIAIS E MÉTODOS

Nove genótipos de aveia (*Avena sativa* L.) foram cultivados *in vitro*: UFRGS 7, UFRGS 8, UFRGS 9, UFRGS 10, UFRGS 11 e UFRGS 12 (programa de melhoramento genético de aveia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul); UPF 7 e UPF 12 (Universidade de Passo Fundo) e

GAF/PARK (Universidade de Minnessota - U.S.A). O trabalho de cultivo e manutenção de calos foi realizado no LCTC utilizando embriões imaturos como explante. Três protocolos (A, B e C) foram empregados em todos os genótipos, cada um com dois meios contendo diferentes dosagens de reguladores de crescimento (Tabela 1). O meio básico utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 30g/l de sacarose, 7g/l de ágar e 0,1g/l de mio-inositol.

Tabela 1. Protocolos testados para indução de embriogênese somática em aveia.

| Meios | Protocolos | | |
|------------------|-----------------|---------------|---------------------------------|
| | A | B | C |
| Indução de calos | MS+2mg/l 2,4D | MS+4mg/l 2,4D | MS+0,2mg/l 2,4D +0,2mg/l BAP |
| Subcultivo | MS+0,5mg/l 2,4D | MS+2mg/l 2,4D | MS+2mg/l 2,4D |

Para cada protocolo foram empregadas dez placas de cada genótipo, cada uma com dez embriões. As condições de cultura foram de luz difusa e 25°C de temperatura. Após um mês em cultivo no meio indutor de embriogênese (subcultivo), os calos foram avaliados quanto à embriogênese somática.

Com a obtenção dos resultados, os mesmos genótipos foram testados no protocolo eleito como melhor indutor de embriogênese para confirmação da ordenação das variedades (experimento 2). Foram utilizadas vinte placas como repetições de cada genótipo, cada uma contendo dez embriões.

Os calos foram avaliados conforme a sua porcentagem de embriogênese. Na primeira etapa do trabalho (experimento 1) escores de 0 a 9 foram atribuídos aos calos e no experimento 2 escores de 1 a 10. A nota mínima indicava 0% de embriogênese e a máxima 100%. Para fins de análise foram utilizadas as médias de embriogênese por placa.

No experimento 2 os embriões imaturos foram medidos em comprimento com o auxílio de uma ocular graduada. A graduação seguia a proporção de 20 unidades = 1mm.

Foi utilizado o delineamento completamente casualizado. Os fatores utilizados na Análise de Variância foram genótipo, protocolo e sua interação.

A análise foi realizada segundo o procedimento de modelo linear generalizado (GLM do SAS), devido ao desbalanceamento das repetições (placas) causado por contaminação e conseqüente eliminação das mesmas. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5%. Foi feita uma análise de covariância utilizando tamanho de embrião como covariável da embriogênese.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao passarem por subcultivo os calos com potencial para embriogênese foram gradativamente formando pequenas estruturas globulares identificadas como pré-embrióides. A grande maioria dos calos era mista, com partes embriogênicas e outras organogênicas. Os pedaços do calo que continham embrióides somáticos eram de cor amarela e friável, enquanto que os organogênicos possuíam aspecto esbranquiçado.

Os protocolos testados para indução de embriogênese somática revelaram efeitos distintos entre si (Tabela 2). Os protocolos A e B não foram diferentes estatisticamente, apresentando médias gerais de 0,47 e 0,69 respectivamente, entretanto mostraram superioridade ao protocolo C no qual foi obtida média geral de 0,008. BREGITZER *et al.* (1995) relataram que o meio MS com 2mg/l de 2,4D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) tem sido o mais

Tabela 2. Quadro da análise de variância contendo graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM) e coeficiente de variação (CV) para embriogênese somática de aveia nos experimentos 1 e 2.

| F. de variação | Experimento 1 | | Experimento 2 | |
|-------------------|---------------|-------|---------------|-------|
| | GL | QM | GL | QM |
| Protocolo (Prot.) | 2 | 4,93* | - | - |
| Genótipo (Gen.) | 8 | 0,81 | 8 | 2,47* |
| Prot. x Gen. | 15 | 1,16 | - | - |
| Erro | 209 | 0,81 | 128 | 0,62 |
| CV(%) | 209,14 | | 45,65 | |

* Significativo pelo teste de F a nível de 5%.

utilizado na indução de calos em aveia. Além disto, diversos trabalhos de cultura de tecidos em cereais utilizam como protocolo básico a redução gradual da dosagem de 2,4 D até a regeneração de plantas (BRE-GITZER *et al.*, 1995, CUMMINGS *et al.* 1976, IMMONEN, 1992, LANGE *et al.*, 1995, MILACH *et al.*, 1991). A necessidade de escolha de um dos protocolos para continuação do trabalho fez com que o protocolo B fosse selecionado por proporcionar médias mas elevadas apesar de não diferir do A.

Os genótipos não foram estatisticamente distintos para este caráter no experimento 1 (Tabela 2 e 3). A ocorrência de variações ao acaso e constante tentativa de adequação dos métodos de trabalho foram os responsáveis pelos elevados coeficientes de variação.

Tabela 3. Escore médio obtido de embriogênese somática entre os genótipos de aveia testados nos experimentos 1 e 2.

| Experimento | 1 | 2 |
|------------------|--------|--------|
| ----- | ----- | ----- |
| Escore | (0-9) | (1-10) |
| Genótipos | | |
| UFRGS 7 | 0,42a* | 2,33a |
| UFRGS 8 | 0,17a | 2,34a |
| UFRGS 9 | 0,59a | 1,58 b |
| UFRGS 10 | 0,64a | 2,01ab |
| UFRGS 11 | 0,12a | 1,26 b |
| UFRGS 12 | 0,26a | 1,40 b |
| UPF 7 | 0,27a | 1,34 b |
| UPF 12 | 0,24a | 1,28 b |
| GAF/PARK | 0,77a | 2,40ab |

* Genótipos com médias não seguidas de mesma letra diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

Por outro lado, foi obtida diferença para os genótipos quanto a capacidade de embriogênese somática no experimento 2 (Tabela 2). O genótipo UFRGS 7 e UFRGS 8 possuíram médias maiores (Tabela 3) para este caráter, o que é de extrema importância já que são variedades que nunca foram testadas com este objetivo. Da mesma forma TOMES & SMITH (1985) verificaram que a capacidade de iniciação de calos embriogênicos está intimamente relacionada ao tipo de germoplasma utilizado em milho. IMMONEN (1992), testando o efeito do cariótipo de triticales na embriogênese somática,

concluiu que um determinado cariótipo daquela espécie produzia significativamente mais calos embriogênicos. Genótipos superiores quanto à formação de embriões somáticos podem ser utilizados para técnicas avançadas de biotecnologia como a biolística, por exemplo.

A diferença entre a ordenação dos genótipos de um experimento para outro, provavelmente tenha como causa a adequação da técnica de avaliação de embriogênese. No 2º experimento ocorreu uma diminuição drástica no coeficiente de variação e foi detectada diferença entre os genótipos quanto à sua capacidade de formação de embriões somáticos.

A análise de covariância, realizada com o objetivo de verificar se o tamanho de embrião estava diretamente envolvido na indução de embriogênese, evidenciou que em alguns genótipos esta medida era importante. Os genótipos UFRGS 7, UFRGS 8, UFRGS 10 e GAF/PARK parecem depender do estágio fisiológico do explante para que ocorra o aumento de embriogênese (Tabela 4). IMMONEN (1992), de outra forma, não encontrou diferenças nas frequências de indução de calos e embriogênese nos diferentes tamanhos de embriões imaturos de triticales testados.

Tabela 4. Resumo da análise de covariância do tamanho de embrião de aveia para a característica embriogênese somática do experimento 2, contendo graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM) e coeficiente de regressão (b).

| F. de Variação | GL | QM |
|----------------|-----|--------|
| Genótipo | 8 | 13,95* |
| Calo | 9 | 1,21 |
| Tam. embrião | 1 | 2,68 |
| Erro | 761 | 0,88 |

| Genótipo | b |
|----------|--------|
| UFRGS 7 | 0,796* |
| UFRGS 8 | 0,865* |
| UFRGS 9 | 0,000 |
| UFRGS 10 | 0,511* |
| UFRGS 11 | -0,270 |
| UFRGS 12 | -0,198 |
| UPF 7 | -0,143 |
| UPF 12 | -0,116 |
| GAF/PARK | 0,378* |

CONCLUSÕES

Tanto protocolos de cultivo distintos como as diferenças genéticas provocam alterações do caráter embriogênese somática, sendo que o melhor protocolo para cultivo *in vitro* e indução de embriogênese em aveia é aquele que envolve a redução gradual de 2,4 D. Também o tamanho de embrião está relacionado com o caráter, acentuando a embriogênese em alguns genótipos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BREGITZER, P., SOMERS, D.A., RINES, H.W. Development and characterization of friable, embryogenic oat callus. **Crop Science**, Madison, v. 29, p. 798-803, 1989.
- BREGITZER, P., MILACH, S.C.K., RINES, H.W., *et al.* **Biotechnology in agriculture and forestry. Somatic embryogenesis and synthetic seed II**. YPS, Bajaj: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1995. v. 31: somatic embryogenesis in oat (*Avena sativa* L.): p. 53-62.
- CUMMINGS, D.P., GREEN, C.E., STUTHMAN, D.D. Callus induction and plant regeneration in oats. **Crop Science**, Madison, v. 16, p. 465-470, 1976.
- DORNELLES, A.L.C., CARVALHO, F.I.F., FEDERIZZI, L.C., *et al.* Genetics of regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. **Revista Brasileira de Genética**, Brasília, 1996. (aceito para publicação).
- EAPEN, S., RAO, P.S. Plant regeneration from immature inflorescence callus culture of wheat, rye and triticale. **Euphytica**, Wageningen, v. 34, p. 153-159, 1985.
- FEIL, B. Breeding progress in small grain cereals - a comparison of old and modern cultivars. **Plant Breeding**, Berlin, v. 108, p. 1-11, 1992.
- HEYSER, J.W., NABORS, M.W. Long term plant regeneration, somatic embryogenesis and green spot formation in secondary oat (*Avena sativa* L.) callus. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 107, p. 153-160, 1982.
- IMMONEN, A.S.T. Effect of karyotype on somatic embryogenesis from immature triticale (*xTriticosecale wittmack*) embryos. **Plant Breeding**, Berlin, v. 109, p. 116-122, 1992.
- LANGE, C.E., FEDERIZZI, L.C., CARVALHO, F.I.F., *et al.* Genetic analysis of somatic embryogenesis and plant regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Genetics and Breeding**, v. 49, p. 219-223, 1995.
- MILACH, S.C.K., FEDERIZZI, L.C., CARVALHO, F.I.F., *et al.* Regeneração de plantas no cultivo de calos de genótipos brasileiros de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 1947-1956, 1991.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- TOMES, D.T., SMITH, O.S. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 70, p. 505-509, 1985.