

REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE AVEIA A PARTIR DE CALOS EMBRIOGÊNICOS E ORGANOGENÉTICOS¹

FERNANDA BERED², MARIA JANE CRUZ DE MELO SERENO³, FERNANDO IRAJÁ FÉLIX DE CARVALHO⁴,
CLÁUDIA ERNA LANGE⁵, CRISTINE LUISE HANDEL⁶ e ANA LÚCIA CUNHA DORNELLES⁷

RESUMO - Nove genótipos de aveia (*Avena sativa* L.) foram avaliados com o objetivo de testar a sua capacidade de regeneração *in vitro* e verificar a sua rota morfogenética preferencial de regeneração. Embriões imaturos medindo entre 1 e 3 mm foram colocados em meio MS com 4 mg/L de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) para a indução de calos. Na etapa seguinte, o 2,4-D foi reduzido, e na fase de regeneração foi totalmente eliminado. Os calos foram avaliados quanto à sua habilidade de produção de embriões somáticos; foi realizado um teste de correlação entre este caráter e a regeneração. Todos os genótipos mostraram capacidade de regenerar plantas, porém foi detectada variabilidade quanto a este caráter. A análise de correlação entre embriogênese e regeneração revelou baixa correlação significativa entre as características, o que indica que a rota preferencial de regeneração pode ter ocorrido principalmente por organogênese e germinação.

Termos para indexação: regeneração *in vitro*, cultura de tecidos, embriogênese somática.

PLANT REGENERATION FROM EMBRYOGENIC AND ORGANOGENIC CALLI IN OAT

ABSTRACT - Nine oat (*Avena sativa* L.) genotypes were evaluated aiming to test *in vitro* regeneration ability. Immature embryos between 1 and 3 mm were inoculated in MS medium supplemented with 4 mg/L of 2,4-D. In the next stage, 2,4-D was reduced, and then removed at the plant regeneration stage. The obtained calli were tested for somatic embryoids production. The correlation between this character and the regeneration was tested. Plant regeneration was observed for all genotypes; however, variability was detected for this character. The embryogenesis x regeneration analysis revealed low correlation between these characters, showing that plant regeneration may have occurred preferentially via organogenesis and germination.

Index terms: *in vitro* regeneration, tissue culture, somatic embryogenesis.

INTRODUÇÃO

Paralelamente a programas de melhoramento de aveia (*Avena sativa* L.), estudos que visam ampliar a variabilidade genética ou servir de suporte para as tecnologias mais modernas vêm sendo desenvolvidos e aplicados. O estabelecimento de um protocolo de regeneração *in vitro* de qualquer espécie vegetal é essencial para que novas metodologias, como a transformação genética, venham a incrementar a criação de genótipos superiores.

Diversos fatores podem influenciar o potencial regenerativo de uma espécie, como o genótipo utilizado, os tipos e dosagens de reguladores de crescimento, os tipos e tamanhos de explantes, os meios

¹ Aceito para publicação em 12 de maio de 1998.

² Bióloga, aluna de Doutorado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Dep. de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, Caixa Postal 776, CEP 95501-970 Porto Alegre, RS. Bolsista do CNPq. E-mail: fbered@portoweb.com.br

³ Bióloga, Dr^a, Dep. de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS. Bolsista do CNPq.

⁴ Eng. Agr., Ph.D., Prof. Titular, Dep. de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS. Bolsista do CNPq.

⁵ Eng^a Agr^a, M.Sc., FUNDACEP, Rodovia RS 342, Km 14, Caixa Postal 10, CEP 98100-970 Cruz Alta, RS.

⁶ Eng^a Agr^a, M.Sc., Dep. de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS.

⁷ Eng^a Agr^a, Dr^a, Prof^a Adjunta, Dep. de Horticultura, Faculdade de Agronomia, UFRGS.

de cultura e as condições de cultivo (Milach et al., 1991). A primeira etapa a ser superada para o início do cultivo *in vitro* de qualquer espécie é a utilização de um meio de cultura apropriado. O meio MS (Murashige & Skoog, 1962) tem sido um dos mais utilizados em trabalhos de cultura de tecidos, dada a sua ampla aplicação, inclusive em aveia (Carter et al., 1967; Rines & McCoy, 1981; Mantell et al., 1985; Bregitzer et al., 1989). Por outro lado, o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), o regulador de crescimento mais eficiente na indução de calos e de embriogênese somática em cereais, tem sido utilizado com sucesso em aveia (Rines & McCoy, 1981; McCoy et al., 1982; Grando et al., 1993; Bered et al., 1996). O embrião imaturo é o explante mais utilizado, nos cereais em geral, para indução de calos e posterior regeneração de plantas (Bhaskaran & Smith, 1990). Além disto, diversos estudos vêm sendo realizados para a verificação do estágio ideal do embrião que promova maior porcentagem de calogênese e embriogênese somática com vista na regeneração (Zimny & Lörz, 1989). Em aveia, embriões extraídos de sementes no estágio de grão leitoso, medindo entre 1 e 3 mm, são capazes de formar calos embriogênicos com grande potencial regenerativo (Bregitzer et al., 1989).

O protocolo de cultivo *in vitro* pode gerar calos embriogênicos e/ou organogênicos, e em aveia os tipos de calos formados estão intimamente relacionados ao seu potencial genético de regeneração. A regeneração de plantas via embriogênese somática é preferida, pois culturas capazes de produzir embrióides somáticos têm crescimento mais rápido, maior friabilidade e altos níveis de regeneração. Além disto, o calo embriogênico é o alvo preferido utilizado para o bombardeamento de partículas contendo DNA com vista à transformação genética (Bregitzer et al., 1995). Handro & Floh (1990) salientaram que os embrióides se destacam facilmente dos calos embriogênicos, o que proporciona maior número de plantas em comparação com os calos organogênicos. Existem trabalhos que descrevem a embriogênese somática em aveia (Bregitzer et al., 1989; Grando et al., 1993; Bregitzer et al., 1995; Bered et al., 1996), porém a porcentagem obtida, quando comparada com a de outros cereais, como centeio (Zimny & Lörz, 1989) e triticale (Immonen, 1992), é bastante inferior.

Por outro lado, a organogênese é um fenômeno bastante comum em cereais, principalmente em aveia. Heyser & Nabors (1982) observaram pequenas regiões embriogênicas em apenas 21% dos calos de aveia em cultura, enquanto o restante era totalmente organogênico. Grando et al. (1993) também observaram que a maioria dos calos obtidos a partir de embriões imaturos era organogênica.

Além disto, diversos autores têm constatado variabilidade entre genótipos de diferentes cereais para sua capacidade de regeneração, e sugerido que esta característica está sob controle genético (Milach et al., 1991). Desta forma, genótipos com alta frequência de regeneração de plantas devem ser selecionados com o propósito de transferir esta característica para genótipos superiores que possam ser utilizados no programa de melhoramento. Em aveia também foi detectada variabilidade tanto para embriogênese somática quanto para regeneração de plantas (Grando et al., 1993; Bered et al., 1996).

Os objetivos deste trabalho foram testar os genótipos de aveia mais utilizados no Sul do Brasil quanto à sua capacidade de regeneração *in vitro* e verificar a rota morfogenética preferencial de regeneração dos genótipos avaliados.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Nove genótipos de aveia (*Avena sativa* L.) foram avaliados quanto à sua capacidade de regeneração *in vitro*. Seis destes genótipos provieram do programa de melhoramento da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS 7, UFRGS 8, UFRGS 9, UFRGS 10, UFRGS 11 e UFRGS 12), dois da Universidade de Passo Fundo (UPF 7 e UPF 12), e um da University of Minnesota (GAF/PARK).

O explante inicial utilizado para os experimentos de regeneração foi o embrião imaturo de sementes coletadas quando apresentavam aspecto leitoso (aproximadamente 12 dias após a antese em período normal de cultivo). As plantas utilizadas para a coleta estavam em vasos, em um telado. As sementes imaturas foram desinfestadas em etanol a 70% (v/v) por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio 2,5% (alvejante comercial diluído a 50%) por dez minutos, e hipoclorito de sódio 1% (alvejante comercial diluído a 20%). Uma gota de Tween 20 foi adicionada às soluções de hipoclorito. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas três vezes em água esterilizada.

Indução de embriogênese

Embriões que mediam entre 1 e 3 mm foram extraídos das sementes desinfestadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico com ocular graduada, submetidos a inoculação do escutelo em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) acrescido de 30 g/L de sacarose, 7 g/L de ágar e 0,1 g de mio-inositol. Foram colocados dez embriões em cada placa-de-petri, e utilizadas 20 placas para cada genótipo.

As dosagens de 2,4-D adequadas e o protocolo de regeneração *in vitro* de aveia foram estabelecidos em trabalho anterior (Bered et al., 1996) e aplicados no presente experimento (Tabela 1). Em todas as etapas do cultivo dos calos, a temperatura permaneceu em 25°C, e não foi aplicado nenhum tipo de fotoperíodo. Nas fases de indução e manutenção, os calos foram expostos à luz difusa (luminosidade indireta), e, na fase de regeneração, à luz contínua. Após a regeneração, as plantas obtidas de cada calo foram aclimatadas até as condições normais de ambiente, permanecendo primeiro em câmara de crescimento a 25°C e depois colocadas em vasos no telado.

Análise estatística

Na avaliação da eficiência de embriogênese somática em calos derivados de embriões imaturos, foi utilizada uma escala de valores de 1 a 10, que correspondia à porcentagem de 0 a 100% de embriogênese, respectivamente. Os calos foram avaliados 12 semanas após a inoculação no meio, e foram utilizadas as médias de embriogênese por placa para a análise estatística.

Para avaliar a eficiência de regeneração, o número de plantas regeneradas a partir de cada calo foi contado duas vezes. A primeira contagem considerou a formação de brotos (primórdios foliares sem raízes), e a segunda, considerou a formação de uma plântula completa. Na análise estatística, foram utilizadas as médias de regeneração por placa.

Para avaliar as diferenças entre os genótipos quanto à sua capacidade de regeneração, foi utilizada a análise de variância, considerando genótipos como tratamentos, e as placas, como repetições, e feito o teste de Duncan a 5% para diferenciar as médias. Para avaliar a correlação entre a embriogênese somática e regeneração foi calculado o coeficiente de correlação entre as duas variáveis através do programa estatístico SAS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os calos, em sua fase de indução, revelaram aspecto aquoso; o escutelo necrosou em contato com o meio (Fig. 1). Cummings et al. (1976) também observaram que o tecido escutelar se tornava necrótico no início do cultivo *in vitro* de aveia. Além disto, Bregitzer et al. (1995) descreveram que o calo embriogênico de aveia é estabelecido em duas etapas: primeiramente, o calo iniciado a partir do explante tem condição mista, e grande parte dele é composta de células vacuoladas não regeneráveis (calo aquoso), e outra parte é formada por embrióides globulares (pré-embrióides); a segunda etapa consiste nos subcultivos sucessivos e formação de embrióides maduros prontos para regeneração.

Ao passarem por subcultivo, os calos com potencial para embriogênese formaram pré-embrióides já no primeiro mês de cultivo, adquirindo coloração amarela e condição friável quando maduros (Fig. 2), enquanto os organogênicos tinham um aspecto esbranquiçado. A grande maioria dos calos possuía condição mista, com parte organogênica e parte embriogênica, assim como descrito por Cummings et al. (1976), Grando et al., (1993) e Bregitzer et al. (1995) (Fig. 3). Todos os genótipos utilizados revelaram habilidade de formação de embriogênese

TABELA 1. Protocolo para o cultivo *in vitro* de aveia (*Avena sativa* L.)¹.

Fases	Meios	Período	Condições de cultivo
Indução	MS + 4 mg/L de 2,4-D	8 semanas	Luz difusa a 25°C
Manutenção	MS + 2 mg/L de 2,4-D	1 mês	Luz difusa a 25°C
Regeneração de parte aérea	MS + 0,2 mg/L de BAP + 2 mg/L de ANA	Variável, de acordo com o genótipo	Luz contínua a 25°C
Formação de raízes	½ MS sem hormônios		

¹ 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; BAP: 6-Benzilaminopurina; ANA: ácido naftaleno acético.

somática; nenhum calo gerado era 100% embriogênico, mas muitos deles eram totalmente organogênicos, sem embrióide algum (Tabela 2). Em



FIG. 1. Calo aquoso de aveia com o escutelo necrosado (20x).



FIG. 2. Calo de aveia com pré-embrióides (20x).



FIG. 3. Calo misto de aveia com setores embriogênicos e organogênicos (20x).

aveia, a indução de embriogênese somática não tem sido tarefa fácil. Bregitzer et al. (1989) testaram três cultivares quanto à sua habilidade de formar calos embriogênicos, e a que apresentou maior índice teve somente 19% dos calos com alguma porcentagem embriogênica. Os resultados obtidos neste trabalho superaram este valor.

Todos os genótipos testados mostraram capacidade de regenerar plantas (Tabela 3), mas foi detectada variação quanto a esta habilidade, segundo o teste de F a 5%, tanto no tocante à parte aérea quanto no que diz respeito à plântula (Figs. 4 e 5). Diversos trabalhos feitos com cereais têm demonstrado que a capacidade de regeneração *in vitro* é determi-

TABELA 2. Porcentagem de calos avaliados que apresentaram embriogênese ou organogênese.

Genótipo	Número de calos	Calos (%)	
		Embriogênicos e organogênicos	Organogênicos
UFRGS 7	116	77,5	22,4
UFRGS 8	70	67,1	32,8
UFRGS 9	157	54,1	45,8
UFRGS 10	95	58,9	41,0
UFRGS 11	68	30,8	69,1
UFRGS 12	52	42,3	57,6
UPF 7	83	12,0	87,9
UPF 12	129	31,0	68,9
GAF/PARK	57	36,8	63,1

TABELA 3. Número médio de brotos e plântulas originado por calo por placa¹.

Genótipo	Brotos (plantas/calo)	Plântulas (plantas/calo)
UPF 12	0,95a	0,53ab
GAF/PARK	0,86ab	0,62a
UFRGS 9	0,68abc	0,50ab
UPF 7	0,60abcd	0,16bc
UFRGS 12	0,49abcde	0,49ab
UFRGS 8	0,40bcde	0,19bc
UFRGS 7	0,36cde	0,19bc
UFRGS 11	0,21de	0,13bc
UFRGS 10	0,06e	0,02c

¹ Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

nada geneticamente. Tomes & Smith (1985), estudando morfogênese em milho, concluíram que a regeneração é um caráter herdável. Lange et al. (1995), além de comprovarem que a regeneração e



FIG. 4. Calo de aveia com regeneração de parte aérea (20x).



FIG. 5. Plântula de aveia.

embriogênese são caracteres controlados geneticamente, estimaram que a ação gênica aditiva é um componente importante no controle genético destas características.

O teste de Duncan permitiu detectar as diferenças entre os genótipos a 5%, e agrupá-los de acordo com o número médio de brotos ou plântulas produzidos por calo (Tabela 3). Além disto, levando em consideração a eficiência de regeneração (porcentagem de embriões imaturos que formaram brotos e plântulas), a UPF 12 foi superior, e a UFRGS 10, inferior (Tabela 4).

Por outro lado, analisando a Tabela 3, podemos verificar que as médias de plântulas/calos são inferiores quando comparadas com as médias de brotos/calos, fato este determinado pela inabilidade de algumas brotações produzirem raízes. A GAF/PARK, cultivar padrão de regeneração nos EUA, revelou destaque, assim como a UPF 12. A UFRGS 10 parece ser um genótipo de reduzido potencial para a capacidade de regeneração *in vitro*. A Tabela 4 demonstra a porcentagem de brotos que originaram plântulas em cada genótipo. A UFRGS 12 foi a cultivar que melhor produziu raízes, pois 100% dos brotos formados originaram plântulas, e os brotos da UPF 7 foram os que menos produziram raízes. Cummings et al. (1976) também tiveram dificuldades na formação de raízes de aveia.

A análise de correlação entre embriogênese e regeneração demonstrou a baixa correlação significativa de 31%, ou seja, poucas plantas regeneradas

TABELA 4. Porcentagem de embriões que formaram brotos e plântulas nos diferentes genótipos testados.

Genótipo	Brotos	Plântulas	Brotos que originaram plântulas
UFRGS 7	28,6	14,6	51,1
UFRGS 8	13,6	6,3	46,1
UFRGS 9	46,6	34,7	74,4
UFRGS 10	3,16	1,0	33,3
UFRGS 11	11,8	7,2	61,5
UFRGS 12	31,0	31,0	100,0
UPF 7	32,6	8,6	26,5
UPF 12	75,6	41,8	55,3
GAF/PARK	47,8	39,2	82,0

foram obtidas a partir de calos embriogênicos. Immonen (1992) verificou que não havia significância estatística na correlação entre embriogênese e regeneração em tritcale, sugerindo que o processo regenerativo naquele cereal deve ser controlado por diferentes mecanismos genéticos, e não só por embriogênese.

Os dados da análise de correlação podem fornecer um indício de que a rota preferencial de regeneração neste trabalho não ocorreu por embriogênese, e sim por organogênese e germinação; porém, para que este fato seja afirmado, é necessário um acompanhamento da regeneração a partir de cortes histológicos.

Trabalhos futuros devem ser realizados com objetivo de maximizar a embriogênese e induzir regeneração a partir dela, já que diversos autores, como Handro & Floh (1990) e Bregitzer et al. (1995) apontam este tipo de morfogênese como preferível para que haja grande número de plantas regeneradas com maior rapidez. Para que a cultura de tecidos possa ser incorporada a um programa de melhoramento de forma viável, é necessário que se consiga um grande número de plantas de forma fácil e rápida.

CONCLUSÕES

1. Existe variabilidade entre os genótipos testados quanto ao caráter regeneração *in vitro*.

2. A GAF/PARK apresenta maior porcentagem de brotos e plântulas formados a partir de embriões imaturos, e o genótipo UFRGS 12, maior regeneração de plântulas a partir de brotos.

3. A análise de correlação entre embriogênese e regeneração traz um indício de que a regeneração ocorre preferencialmente por organogênese e germinação.

REFERÊNCIAS

- BERED, F.; SERENO, M.J.C.M.; CARVALHO, F.I.F.; FEDERIZZI, L.C.; DORNELLES, A.L.C.; LANGE, C.E.; HANDEL, C.L. Avaliação de embriogênese somática em cultivares de aveia (*Avena sativa* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.26, n.3, p.371-375, 1996.
- BHASKARAN, S.; SMITH, R.H. Regeneration in cereal tissue culture: a review. **Crop Science**, Madison, v.30, p.1328-1338, 1990.
- 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.; SOMERS, D.A. Somatic embryogenesis in oat (*Avena sativa* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. v.31, p.53-62.
- CARTER, O.; YAMADA, Y.; TAKAHASHI, E. Tissue culture of oats. **Nature**, London, v.214, p.1029-1030, 1967.
- 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.
- GRANDO, M.F.; EICHLER, L.; TANABE, C.R.; SANTOS, J.F.; SANTOS, C.M. Indução de calos e regeneração de plantas em três genótipos de aveia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.5, n.2, p.139-144, 1993.
- HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, S.L. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1990. p.203-212.
- 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 tritcale (x *Triticosecale* Wittmack) embryos. **Plant Breeding**, Berlin, v.109, p.116-122, 1992.
- LANGE, C.E.; FEDERIZZI, L.C.; CARVALHO, F.I.F.; TAVARES, M.J.C.M.S.; DORNELLES, A.L.C.; HANDEL, C.L. Genetic analysis of somatic embryogenesis and plant regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Genetics and Breeding**, Roma, v.49, p.195-200, 1995.
- MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas**. Ribeirão

- Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1985. 333p.
- McCOY, T.J.; PHILLIPS, R.L.; RINES, H.W. Cytogenetic analysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa* L.) tissue cultures; high frequency of partial chromosome loss. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v.24, p.51-56, 1982.
- MILACH, S.C.K.; FEDERIZZI, L.C.; CARVALHO, F.I.F.; DORNELLES, A.L.C.; LANGE, C.E. 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.
- RINES, H.W.; McCOY, T.J. Tissue culture initiation and plant regeneration in hexaploid species of oats. **Crop Science**, Madison, v.21, p.837-842, 1981.
- TOMES, D.T.; SMITH, O. 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.
- ZIMNY, J.; LÖRZ, H. High frequency of somatic embryogenesis and plant regeneration of rye (*Secale cereale* L.). **Plant Breeding**, Berlin, v.39, p.98-103, 1989.