

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS EM POPULAÇÕES R₃ DE AVEIA GERADAS PELA CULTURA DE TECIDOS

MAGALI FERRARI GRANDO¹, LIZETE AUGUSTIN², SÉRGIO VALENTE TOMASINI³, CLEDI NEGRÃO⁴

RESUMO – Técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas para gerar mutações genéticas úteis ao melhoramento de plantas. Nesse trabalho foi avaliada a 3ª geração de plantas regeneradas a partir de calos cultivados *in vitro* (somaclones R₃). O ensaio foi estabelecido no campo experimental da Faculdade de Agronomia da Universidade de Passo Fundo. Foram semeados 19 somaclones da geração R₃ da cultivar UPF 12 e 2 somaclones da cultivar CTC 2, bem como as respectivas testemunhas. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados em 3 repetições sendo as parcelas de 1 m², com 250 sementes cada (5 linhas com 50 sementes/linha). As avaliações realizadas foram em relação a dias de emergência à floração, estatura da planta, hábito de crescimento, peso do hectolítro, rendimento de grãos, peso de mil sementes e rendimento industrial. Foram observadas variações úteis nas sete características e variações negativas em 4 características avaliadas nos somaclones da UPF-12. Todos os somaclones UPF 12 apresentaram pelo menos alteração em uma das características avaliadas. Os somaclones da cultivar CTC 2 não apresentaram variações negativas, apresentando alterações positivas em somente 3 características (data de floração, peso do hectolítro e peso de mil sementes).

Palavras-chave: Aveia, melhoramento vegetal, mutação *in vitro*

EVALUATION OF AGRONOMIC TRAITS IN R₃ OAT POPULATION PRODUCED BY TISSUE CULTURE

ABSTRACT – Tissue culture technic is been used to generate useful genetic mutation for breeding program. In this work it was evaluated the third generation of *in vitro* callus regenerated plant (R₃ somaclones). The assay was established in experimental field. It were seeded 19 somaclones of UPF 12 cultivar, 2 somaclones of CTC 2 cultivar as well as the controls. The experiment was carried out randomized with 3 repetitions of 1m² parcels with 250 seeds (5 rows with 50 seeds/row). It were analysed days to flowering, plant heigth, growth habit, test weight, 1000 seeds weight, grain yield and groat percentage. It was observed positive (useful) variation to these seven traits valued from UPF 12 tissue culture derived lines compared to the control. There were only negative variation for four characters. Hundred percent of evaluated UPF 12 somaclones showed variation at least in one measured trait. The CTC 2 somaclones showed positive variation on three traits (days to flowering, test weight and 1000 seeds weight) and did not showed negative alterations.

Key words: Oat, genetic variability, *in vitro* mutation

INTRODUÇÃO

A aveia (*Avena sativa*) constitui-se numa cultura de grande importância dentro do sistema agrícola do sul do Brasil, sendo cultivada tanto para alimentação humana como animal. Através do programa de melhoramento a Universidade de Passo Fundo lançou 17 cultivares de aveia no mercado. No entanto, o sucesso do melhoramento está, em grande parte, na dependência da variabilidade herdável disponível na população.

A estreita base genética desta cultura, principalmente em relação a algumas características, justifica o uso de novas metodologias para induzir alterações no material genético. A técnica de cultura de tecidos está sendo empregada para gerar mutações úteis ao programa de melhoramento. Estas modificações induzidas *in vitro* se manifestam como mutações herdáveis entre a progênie de plantas regeneradas e são definidas como variações somaclonal (LARKING e SCOWCROFT,

1981). As mutações ocorrem principalmente durante o processo de indução de uma massa celular desorganizada e mitoticamente instável denominada de calo (EVANS et al., 1984).

Vários mecanismos podem dar origem a variação somaclonal incluindo mutações de ponto, amplificação e deleção gênica, alterações em genes nucleares e citoplasmáticos, alterações cromossômicas numéricas e estruturais, ativação de transposons, rearranjos somáticos, alteração no padrão de metilação do DNA, bem como perturbações na sua replicação (SCOWCROFT e LARKIN, 1983; PHILLIPS et al., 1990). Esta natureza variável justifica a existência de alguns mutantes que derivam exclusivamente da variação somaclonal *in vitro* (LINDSEY e JONES, 1989). Mais de 15% das plantas regeneradas produzem progênie mutantes as quais geralmente não apresentam mosaicismos, muito comum quando outros métodos mutacionais são empregados (TABARES et al., 1991).

1. Biol., M.Sc. – Professora da Universidade de Passo Fundo. FAMV, Caixa Postal 511, 99001-970 Passo Fundo – RS/BRASIL.

2. Eng. Agr., M.Sc. – Professora da Universidade de Passo Fundo. Faculdade de Agronomia – Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Caixa Postal 566, 99001-970 Passo Fundo – RS/BRASIL.

3. Acadêmico de Agronomia: Bolsista do CNPq/ RHAÉ.

4. Acadêmica de Agronomia. Estagiária.

Recebido para publicação em 05/02/1997.

Independente dos mecanismos pelos quais os eventos mutacionais ocorrem, existem evidências suficientes de que estas variações incluem diversos tipos de alterações herdáveis e agronomicamente desejáveis (MOHMAND e NABORS, 1990). Variantes somaclonais úteis foram relatadas em diferentes espécies de plantas como cana-de-açúcar (HEINZ et al., 1977), batata (SHEPARD et al., 1980; SECOR e SHEPARD, 1981) e tomate (EVANS et al., 1984), apresentando alterações em características morfológicas e agrônomicas, bem como resistência à moléstias. Modificações em características qualitativas e quantitativas foram observadas em plantas cereais regeneradas *in vitro*, tais como milho, arroz e trigo (BAJAJ, 1989; LARKING et al., 1984). Alterações na fertilidade, tamanho da espiga, peso de sementes e teor de proteína da semente de trigo (LARKIN et al., 1984), plantas somaclonais de arroz resistente a *xantomonas oryzae* (SUN et al., 1986) e com alteração na data de florescimento, estatura, perfilhamento e vigor (PACHÓN, 1988, citado por TABARES et al., 1991) foram já relatadas na literatura. DAHLEEN et al. (1991) observaram aumento de produtividade em

aveia, bem como variações positivas e negativas em outras características como: estatura de planta, dias de emergência à floração, número e peso de sementes, área da folha bandeira e percentagem de proteína no grão.

Este trabalho objetiva avaliar a 3ª geração de autofecundação de somaclones de duas cultivares de aveia geradas pela cultura de tecidos. Busca também selecionar variantes úteis ao melhoramento vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram semeadas no Campo Experimental da Faculdade de Agronomia da Universidade de Passo Fundo 21 somaclones da 3ª geração (R_3) de autofecundação de plantas regeneradas de calos cultivados *in vitro*, sendo 19 somaclones da cultivar UPF 12 e 2 somaclones da cultivar CTC 2, bem como as respectivas testemunhas. A Figura 1 mostra as etapas do desenvolvimento dos somaclones usados neste experimento. Os somaclones utilizados sofreram uma pré-seleção na geração R_1 e foram avaliados para algumas características na geração R_2 como mostra a Figura 2.

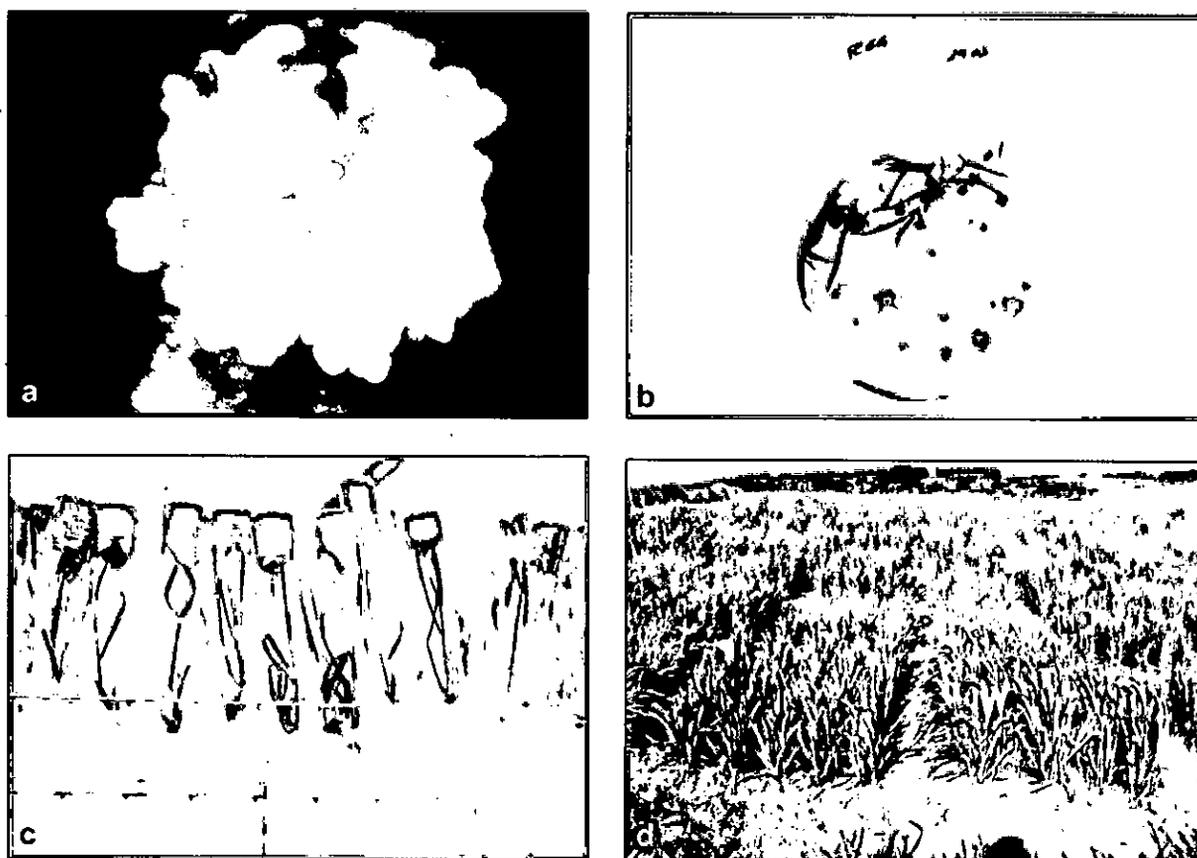


FIGURA 1 – Processo de criação dos somaclones: a) calos induzidos a partir de embriões imaturos cultivados em meio de cultura contendo 2,4-D; b) regeneração de brotos a partir dos calos; c) enraizamento das plântulas e geração das plantas somaclones RO; d) somaclones R3 conduzidos ao nível de campo para avaliação das mutações induzidas

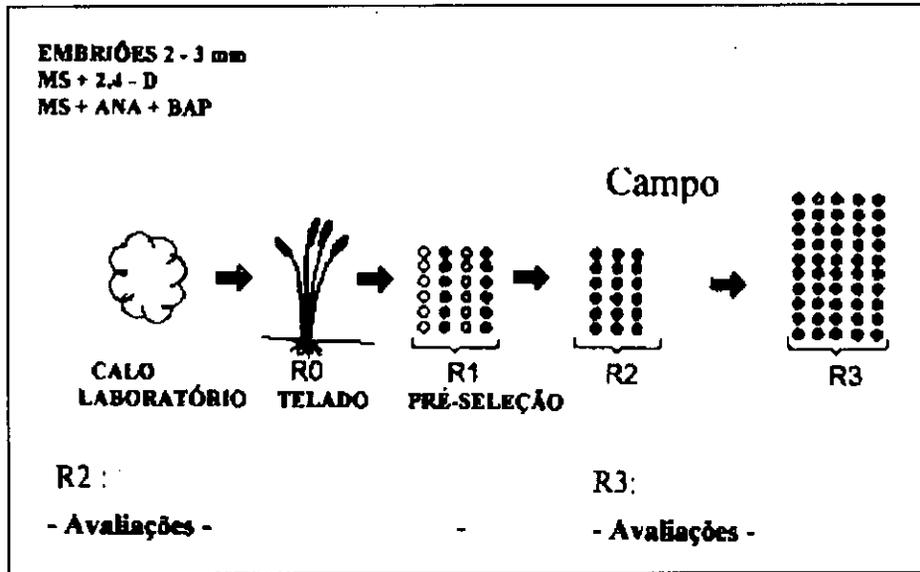


FIGURA 2 – Esquema de obtenção e avaliação dos somaclones. Plantas R₀ são diretamente obtidas a partir de calos. As sementes dessas plantas dão origem a geração R₁, na qual se faz uma pré-seleção de plantas que morfologicamente se diferenciam do controle. Diferentes avaliações são realizadas nas populações R₂ e R₃ devido ao tamanho da população

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, em 3 repetições, sendo as parcelas de 1 m², com 250 sementes cada (5 linhas com 50 sementes/linha).

Foram realizadas as seguintes avaliações: dias de emergência à floração, estatura de plantas, hábito de crescimento, peso do hectolítro (PH), rendimento de grãos (kg/ha), peso de mil sementes (PMS) e rendimento industrial (%). Para avaliar hábito de crescimento

foram designados os valores 4 para plantas de hábito prostrado, 3 para plantas de hábito semi-prostrados, 2 para hábito semi-ereto e 1 para hábito ereto de crescimento. A característica rendimento industrial diz respeito a percentagem do peso dos grãos descascados em relação aos grãos com casca, indicando a percentagem do peso que é relativo a solidez do grão sem a palha. Os dados foram submetidos a análise de variância e ao teste de comparação de médias Duncan a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

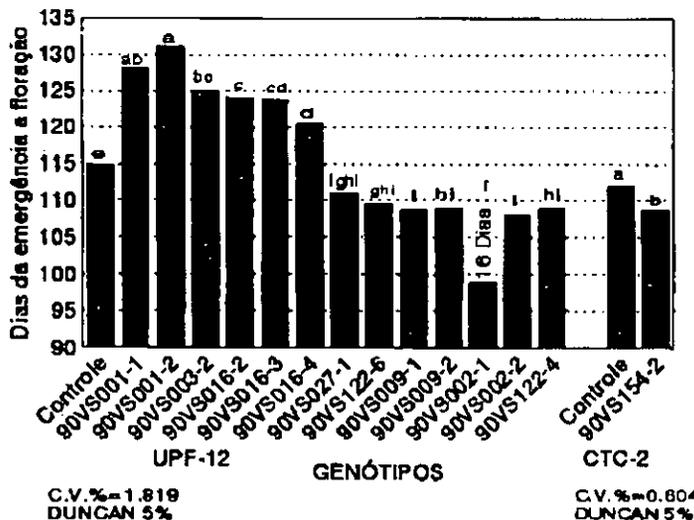


FIGURA 3 – Resultados referentes a dias de emergência à floração do somaclones R₃ das cultivares UPF 12 e CTC 2

A análise quanto a dias de emergência à floração demonstrou que os somaclones 90VS027-1, 90VS122-6, 90VS009-1, 90VS009-2, 90VS002-2, 90VS002-1 e 90VS122-4 foram mais precoces que a Testemunha UPF 12 (Figura 3). O somaclone 90VS002-1 foi 16 dias mais precoce que a testemunha. Seis somaclones deste mesmo genótipo foram mais tardios. Os genótipos 90VS001-2, 90VS001-1 e 90VS003-2 foram mais tardios, concordando com os resultados obtidos no ano anterior (EICHLER et al., 1993). Nas figuras somente são mostrados os resultados dos somaclones que apresentaram variações para a característica em questão. Em relação ao genótipo CTC 2, o somaclone 90VS154-2 foi mais precoce. A criação de genótipos mais precoces é desejável devido a possibilidade de utilização da aveia em sistemas de rotação de culturas.

Dos 19 somaclones da UPF 12 avaliados, somente 4 não diferiram da testemunha no que diz respeito à estatura de plantas (Figura 4). O restante dos materiais foram significativamente mais baixos. Os somaclones 90VS016-2, 90VS016-4 e 90VS016-3 apresentaram uma estatura de 88,2, 87,3 e 83,1 cm, respectivamente, portanto 38 cm, em média, a menos que a testemunha.

Estes mesmos somaclones se destacaram no ano anterior por esta característica. A redução da estatura de planta é desejável e tem sido constatada em vários experimentos realizados em nosso laboratório. Plantas de baixa estatura também foram obtidas de regenerantes de arroz (PACHÓN, 1988, citado por TABARES et al., 1991) e aveia (DAHLEEN et al., 1991).

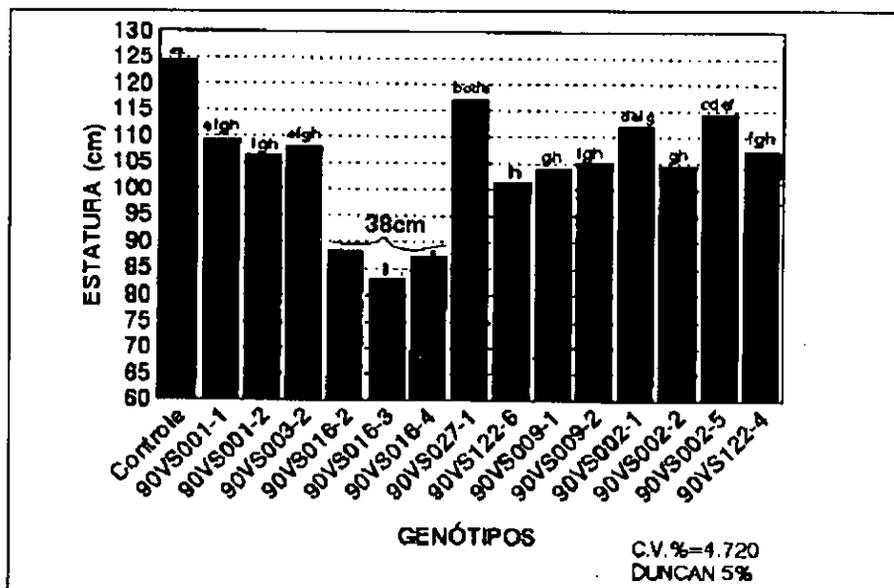


FIGURA 4 – Resultados referentes a estatura (cm) dos somaclones R 3 da cultivar UPF 2

Como a característica estatura tem se mostrado facilmente alterável pelo processo de cultivo *in vitro* esta metodologia poderia ser aplicada a genótipos e linhagens que apresentam bom potencial de rendimento mas que apresentam o problema de acamamento devido a alta estatura de planta.

dicou variação nos somaclones 90VS001-1, 90VS001-2 e 90VS003-2 os quais apresentaram hábito ereto, e os somaclones 90VS016-2, 90VS016-3 e 90VS016-4 apresentaram hábito prostrado e semi-prostrado em relação a testemunha que possui hábito semi-ereto. Tais variações não foram observadas nos materiais da cultivar CTC 2.

A análise do hábito de crescimento (Figura 5) in-

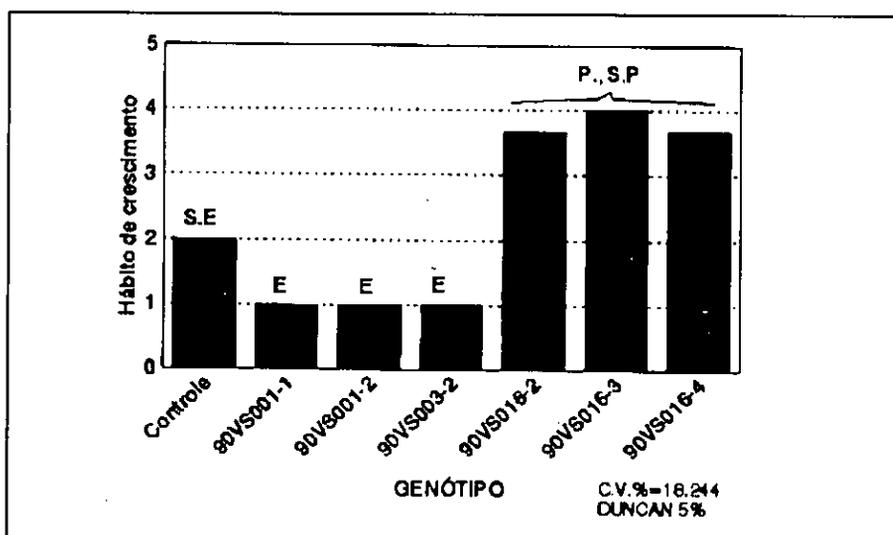


FIGURA 5 – Resultados referentes ao hábito de crescimento dos somaclones R 3 da cultivar UPF 12

O alto valor do PH tem sido uma exigência das empresas na comercialização de aveia destinada a alimentação humana. O somaclone 90VS002-1 apresentou peso hectolítro (PH) (46,20 kg/hl) muito superior ao da testemunha UPF 12 (31,11/kg/hl). Os materiais

90VS011-1, 90VS015-1, 90VS016-3, 90VS027-1 e 90VS027-2 também apresentaram PH significativamente maior que a testemunha, concordando com os dados do ano anterior (Figura 6). O somaclone 90VS154-2 teve PH superior a cultivar CTC 2.

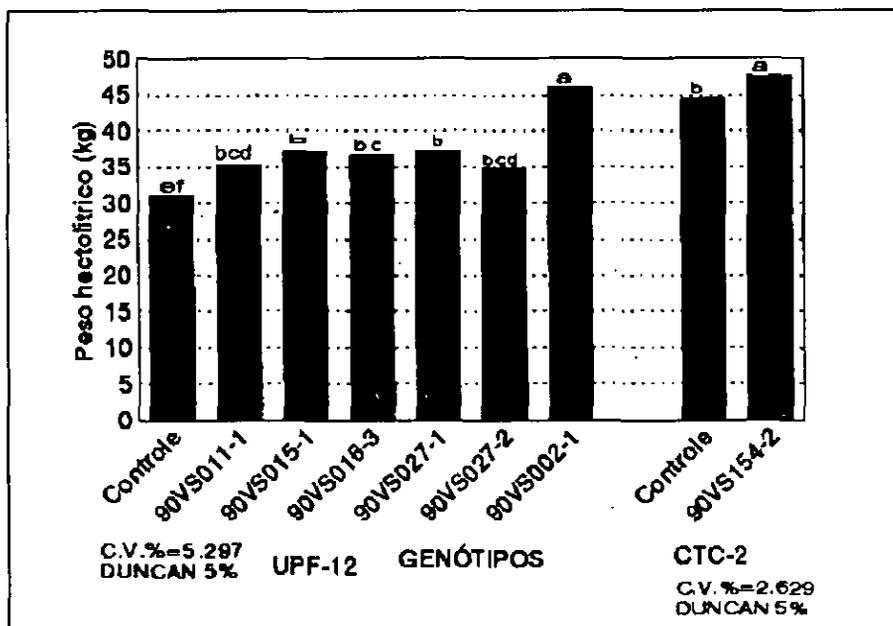


FIGURA 6 – Resultados referentes ao peso hectolítro (PH) dos somaclones R 3 das cultivares UPF 12 e CTC 2

Quanto ao caráter rendimento de grãos (Figura 7) os somaclones 90VS002-6 e 90VS002-1 produziram, respectivamente, 2.664 e 2.562 kg/ha superando a testemunha UPF 12, que produziu, em média, 1.792 kg/ha. No ano anterior, o somaclone 90VS002-6 produziu quase o dobro da testemunha e manteve sua superioridade

neste ensaio. Para esta característica houve também variações negativas pois alguns somaclones apresentaram menor rendimento que a testemunha. O aumento do rendimento de grãos é uma característica extremamente desejável e determinada por genes de ação quantitativa.

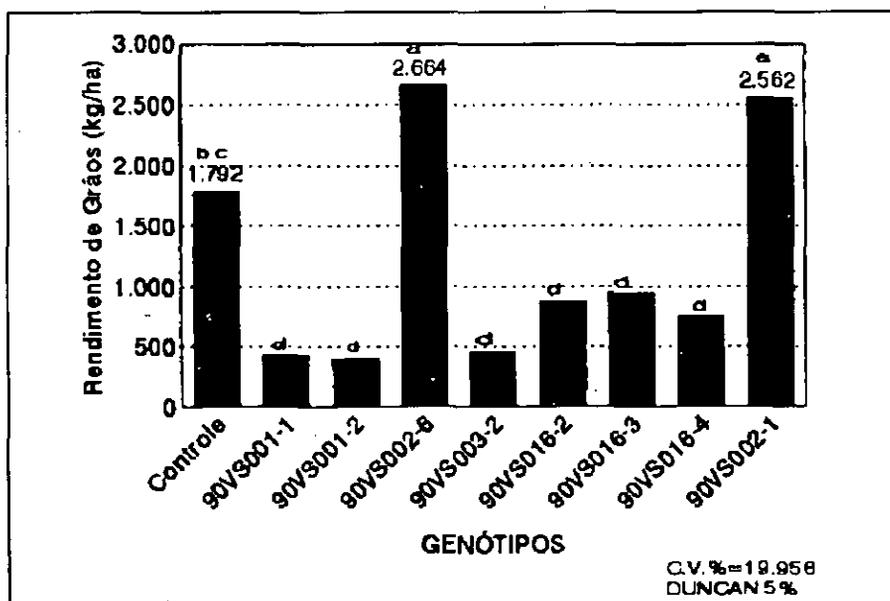


FIGURA 7 – Resultados referentes ao rendimento de grãos dos somaclones R 3 das cultivar UPF 12

Os somaclones 90VS002-1, 90VS002-5, 90VS016-2, 90VS016-3 e 90VS016-4 apresentaram peso de mil sementes (PMS) superior à testemunha UPF 12. Estes três últimos somaclones destacaram-se no ano anterior por esta

característica. Os somaclones 90VS001-1, 90VS001-2 e 90VS003-2 tiveram, como no ano anterior, menor PMS. O somaclone 90VS0154-2 da CTC 2 apresentou PMS maior que a testemunha, como mostra a Figura 8.

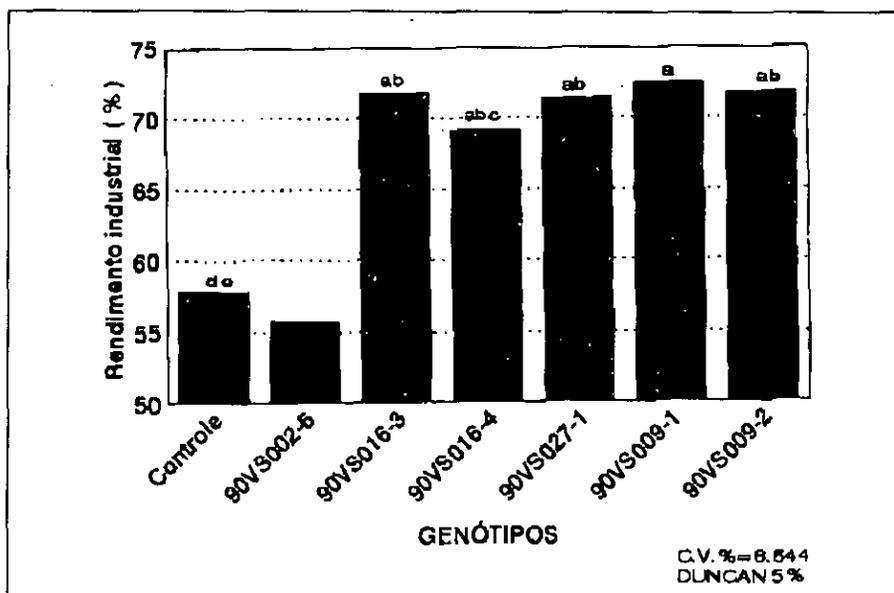


FIGURA 8 – Resultados referentes ao peso de mil sementes dos somaclones R3 das cultivares UPF 12 e CTC 2

Quanto ao rendimento industrial (Figura 9) os somaclones, ou se igualaram as testemunhas ou superaram as mesmas. Os somaclones 90VS016-3, 90VS016-4, 90VS027-1, 90VS009-1, 90VS009-2 apresentaram uma percentagem média de 13,48%

superior à testemunha UPF 12. Tais variações não foram observadas no genótipo CTC 2. O aumento do peso do grão em relação à casca leva a uma valorização do grão destinado ao processamento da aveia para o consumo humano.

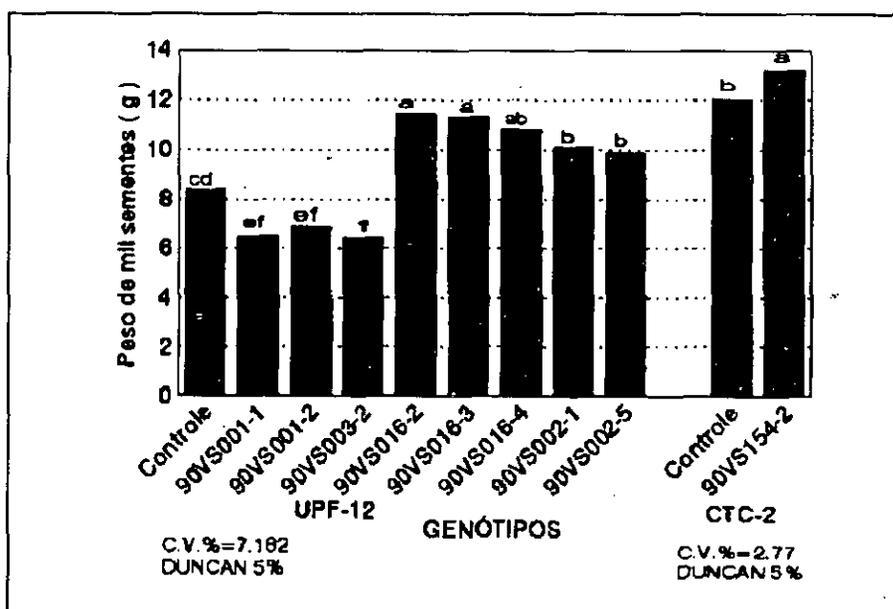


FIGURA 9 – Resultados referentes ao rendimento industrial (RI) dos somaclones R 3 da cultivar UPF 12

Em geral foram observadas variações úteis nas sete características avaliadas para genótipo UPF 12, somente havendo variações negativas para 4 características (dias da emergência à floração, hábito de crescimento, rendimento de grãos e PMS). 100% dos somaclones deste genótipo mostraram pelo menos uma característica alterada. Apenas um dos 19 somaclones da UPF 12 (90VS002-6) teve apenas uma característica mutada: produção de grãos. Outros somaclones apresentaram pelo menos 2 características modificadas.

Os somaclones da cultivar CTC 2 mostraram variações positivas para precocidade, PH e PMS, não apresentando características negativas.

A metodologia de cultivo *in vitro* empregada se mostrou eficiente na indução de mutações agronomicamente úteis. A escolha de bons genótipos para indução de calos aumenta a probabilidade de produzir materiais variantes com potencial de competição com genótipos de elite nos ensaios do programa de melhoramento de aveia. A técnica de obtenção de calos para indução de variação somaclonal pode ser usada para introduzir um caráter desejado em uma cultivar ou linhagem.

Seis linhagens somaclonais derivadas deste experimento foram repassadas para o ensaio preliminar do programa de melhoramento (90VS002-1, 90VS002-6, 90VS011-1, 90VS015-1, 90VS027-1, 90VS0154-2). As plantas que apresentaram mutações neste experimento estão sendo avaliadas a nível cromossômico e molecularmente para sistemas enzimáticos em eletroforese.

CONCLUSÕES

A técnica de indução de variação somaclonal pela cultura de tecidos é uma metodologia viável para promover alterações em características quantitativas úteis ao melhoramento vegetal.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- BAJAJ, Y.P.S. Induction and cryopreservation of somaclonal variation in wheat and rice. In: MUJEEB-KASI, A.; SITCH, L.A. *Review of advances in plant biotechnology*. 1989. p. 159-203.
- DAHLEEN, L.S.; STUTHMAN, D.D. AND RINES, H.N. Agronomic traits variation in oat lines derived from tissue culture. *Crop Science*, v. 31, p. 90-94, 1991.
- EICHLER, L.; GRANDO, M. F.; TOMASINI, S.; HECKLER, J.P. Avaliação das características morfológicas e fenológicas, de somaclones R₂ de aveia. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SULBRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 13., 1993, Ijuí. *Resultados ...* Ijuí, 1993. p. 32 -36.
- EVANS, D.A.; SHARP, W. R.; MEDINA - FILHO, M. P. Somaclonal and gametoclonal variation. *American Journal of Botany*, v. 71, n. 6, p. 759-774, 1984.
- HEINZ, D. J.; KRISHAMURTHI, M.; NICKELL, L. G.; MARETZKI, A. Cell, tissue and organ culture in sugarcane. In: REINERT, J. A.; BAJAJ, Y. P. S. *Plant cell, tissue and organ culture*. Spring - Verlag, Berlin: 1977, p. 3-17.
- LARKING, P. J.; RYAN, S.A.; BRETTELL, R.I.S.; SCOWCROFT, W.R. Heritable somaclonal variation in wheat. *Theory Applied Genetic*, v. 64, p. 443-445, 1984.
- LARKING, P. J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theory Applied Genetic*, v. 60, p. 197-214, 1981.
- LINDSEY, K.; JONES, M.G.K. Consecuencias del cultivo de tejidos: variabilidad e inestabilidad. In: LINDSEY, K.; JONES, M. G. K. *Biociencia Vegetal Agrícola*. Espana: Acribia, 1989. p. 63-85.
- MOHMAND, A.S.; NABORS, M. W. Somaclonal variant plants of wheat derived from mature embryo explant of three genotypes. *Plant Cell Reproduction*. v. 8, p. 558-560, 1990
- PHILLIPS, R. L.; KAEPLER, S.M.; PESCHKE, V.M. Do we understand somaclonal variation? In: NIJKAMP, H. J. J.; VAN-DERPLAS, L. H. N.; VAN AARTNIJK, J. *Progress in plant cellular and molecular biology*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE CELL AND CULTURE, 7., 1990. *Proceedings...* Netherland: Kluwer, 1990. p. 131-141.
- SECOR, G.; SHEPARD, J. F. Variability of protoplast derived potato clones. *Crop Sciences*. n. 21, p. 102-105, 1981.
- SCOWCROFT, W.R.; LARKING, P.J. Somaclonal variation: a new option for plant. In: VASIL, I. K. ; SCOWCROFT, W. R.; FREY, K. J. *Plant Improvement and somatic cell genetics*. New York: Academic Press, 1983. p. 159-178.
- SHEPARD, J.F.; BIDNEY, D.; SHAHIN, E. Potato protoplasts in crop improvement. *Science*, v. 208, p.17-24, 1980.
- SUN, L. H.; SHE, J. M.; LU, X. F. *In vitro* selection of *Xanthomonas oryzae*- resistant mutants in rice. I. Induction of resistant callus and screening regenerated plants. *Acta Genet. Sin.*, v. 13, p. 188-193, 1986.
- TABARES, E.; PACHÓN, J.; ROCA, W. M. Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. In: ROCA, W. M. ; MROGINSKI, L. A. *Cultivos de tejidos en la agricultura*. Colombia: Ciat. Cali, 1991. p. 339-359.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Eng. Agr. Dr^a. Sandra Milach pelo apoio ao desenvolvimento das técnicas geradoras dos materiais usados neste experimento. O projeto foi parcialmente financiado pela FINEP, CNPq (BIC) e FAPERGS (BIC).