

## INDUÇÃO DE CALOS EM CULTIVARES DE AVEIA (*Avena sativa* L.)<sup>1</sup>

FERNANDA BERED<sup>2</sup>, MARIA JANE CRUZ DE MELO SERENO<sup>3</sup>, FERNANDO IRAJÁ FÉLIX DE CARVALHO<sup>4</sup>, CLÁUDIA ERNA LANGE<sup>5</sup>, ANA LÚCIA CUNHA DORNELLES<sup>6</sup>, CRISTINE LUISE HANDEL<sup>7</sup>

**RESUMO** – Nove genótipos de aveia (*Avena sativa* L.) foram cultivados *in vitro* com o objetivo de serem avaliados quanto à sua capacidade de formação de calos. Dois experimentos foram realizados, o primeiro testou diferentes meios de cultura (MS-MURASHIGE e SKOOG, 1962 suplementados com hormônios em doses distintas) e a variabilidade entre os genótipos e o segundo constou do cultivo *in vitro* dos genótipos no melhor meio. O explante utilizado foi o embrião imaturo, o qual foi medido com o objetivo de testar o tamanho médio adequado à calogênese. Todos os genótipos produziram calos, ocorrendo variabilidade entre eles para este caráter, a maioria dos calos evidenciou condição mista (organogênico/embriogênico). O tamanho médio de embrião que contribuiu para a maior indução de calos foi entre 1 e 3 mm, semelhante ao encontrado na literatura, e os meios A e B (com 2 e 4 mg/l de 2,4D<sup>1</sup> respectivamente) se mostraram os mais adequados na indução de calos em aveia.

*Palavras-chave:* Aveia, cultura de tecidos, *Avena sativa*

### CALLUS INDUCTION IN OAT (*Avena sativa* L.) GENOTYPES

**ABSTRACT** – Nine oat genotypes were cultivated *in vitro* in order to estimate callus initiation capability. Two experiments were realized, first the culture medium were tested with different hormones dosages and the genotypes for variability, after, the cultivars were exposed to the best medium. The immature embryo were measured to test the adequate size to calogense and the data was similar to literature. All genotypes produced cali, and variability was observed among them concerning this character. Almost all cali revealed organogenic and embryogenic structures. The A and B medium (with 2 and 4 mg/l 2,4 D respectively) were adequated to cali induction in oat.

*Key words:* Oat, tissue culture, *Avena sativa*

### INTRODUÇÃO

A tecnologia de cultura de tecidos tem revelado posição de destaque a medida que vem auxiliando o melhoramento genético de forma eficaz. A indução de calos e posterior regeneração de plantas podem proporcionar o desenvolvimento de diferentes técnicas como a micropropagação, indução e seleção de variantes genéticas (variação somaclonal e seleção *in vitro*) e transformação genética (JACKSON e DALE, 1988). Durante os últimos anos, tais técnicas têm sido estudadas e empregadas em diferentes cereais, servindo como ferramentas no melhoramento genético a campo (CUMMINGS et al., 1976). Em aveia (*Avena sativa* L.), o protocolo de cultivo *in vitro* vem sendo desenvolvido e estudado em diferentes cultivares (CUMMINGS et al., 1976; RINES e McCOY, 1981; BREGITZER et al., 1989; GRANDO et al., 1993). A aveia cultivada (*Avena sativa* L.) é atualmente um dos cereais em fran-

ca expansão na economia agrícola do Sul do Brasil. Segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1996), em 1990 foram plantados 197.266 hectares de aveia no Sul do Brasil, sendo que em 1994, 303.720 hectares foram destinados à esta finalidade. Tal fato reforça a necessidade de estudo de técnicas proveitosas ao melhoramento desta espécie.

Apesar do intenso trabalho dos pesquisadores na área de cultura de tecidos, o protocolo de cultivo *in vitro* é bastante específico em relação à espécie e ao genótipo, o que torna necessário o estabelecimento de uma metodologia adequada. Tal especificidade ocorre já que o caráter indução de calos é controlado geneticamente e, além disto, muitas podem ser as variáveis que devem ser ajustadas para o método de cultivo, tais como tipo de explante, reguladores de crescimento e condições de cultura, além da própria variabilidade entre genótipos (BHASKARAN e SMITH, 1990). Diferentes trabalhos têm demonstrado que ocorre variação entre os genótipos de aveia quanto à indução de

<sup>1</sup> Ácido 2,4 – diclorofenoxiacético

1. Parte da dissertação de mestrado da primeira autora.

2. Biól., M.Sc. – Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da UFRGS, Caixa Postal 776, 90001-970 Porto Alegre - RS/BRASIL. Bolsista do CNPq.

3. Biól., Dr. – Professora do Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Bolsista do CNPq.

4. Eng. Agr., Ph.D. – Professor do Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Bolsista do CNPq.

5. Eng. Agr., M.Sc. – Pesquisador da FUNDACEP.

6. Eng. Agr., Dr. – Professor do Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Bolsista do CNPq.

7. Eng. Agr., M.Sc.

Recebido para publicação em 01/02/1996.

**TABELA 1 – Meios de cultura testados para indução de calos em aveia no experimento 1**

Meio básico MS	A	B	C
Reguladores de crescimento	2,0 mg/l 2,4D	4,0 mg/l 2,4D	0,2 mg/l 2,4D + 0,2 mg/l BAP

calos, embriogênese somática e regeneração de plantas, o que comprova a necessidade de testar cultivares de alto potencial para o melhoramento genético levando em consideração estes caracteres (CUMMINGS et al., 1976; GRANDO et al., 1993).

Considerando os fatores de ajuste do protocolo de cultivo *in vitro*, em aveia, o meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) tem sido o mais utilizado (CARTER et al., 1976; CUMMINGS et al., 1976; BREGITZER et al., 1989; GRANDO et al., 1993); por outro lado, a dose de 2,0 mg/l de 2,4D adicionada ao meio tem demonstrado ser a mais ajustada para a indução de calos (RINES e McCOY, 1981; GRANDO et al., 1993). O embrião imaturo de aveia, indubitavelmente, é o melhor explante a ser utilizado para cultivo (CUMMINGS et al., 1976; RINES e McCOY, 1981; HEYSER e NABORS, 1982), porém seu tamanho, condições fisiológicas e posição de contato com o meio também são fatores limitantes para o sucesso na indução de calos.

Após a obtenção de um protocolo de cultivo adequado, diferentes tipos de calos, em seu aspecto e potencial, podem ser identificados de acordo com a espécie. Em aveia os tipos de calos formados estão intimamente relacionados ao seu potencial de regeneração de planta via rotas morfogenéticas distintas (GRANDO et al., 1993). BREGITZER et al. (1989) descreveram o calo embriogênico de aveia como friável, semi-opaco e esbranquiçado, porém, a fase inicial de calogênese parece ser representada por calos aquosos com células vacuoladas não regeneráveis. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar cultivares brasileiras de aveia quanto a sua capacidade de formação de calos; avaliar a dosagem de hormônio adequada para indução de calos; testar o tamanho médio de embrião imaturo adequado à calogênese e descrever o tipo de calo gerado por cultivo *in vitro* de aveia.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram escolhidos nove genótipos de aveia para serem cultivados *in vitro* (UFRGS7, UFRGS8, UFRGS9, UFRGS10, UFRGS11, UFRGS12, UPF7, UPF12 e GAF/PARK). Dois experimentos foram implementados, o primeiro testou diferentes meios (Tabela 1) e a variabilidade entre genótipos para o caráter indução de calos e o segundo constou do cultivo *in vitro* dos genótipos no melhor meio escolhido a partir do primeiro experimento.

As sementes foram coletadas em estágio de grão leitoso, não havendo seleção para tamanho do em-

brão imaturo. Após a desinfecção os embriões foram extraídos com auxílio de lupa e bisturi e colocados com o escutelo em contato com o meio de cultura. O meio utilizado foi o MS suplementado com 30 g/l de sacarose, 7 g/l de agar e 0,1 g/l de mio-inositol (MILACH et al., 1991). A este meio base foram acrescidas diferentes dosagens de reguladores de crescimento conforme descrição incluída na Tabela 1.

### Experimento 1

Para cada meio foram empregadas oito placas de cada genótipo (repetições), contendo cada uma dez embriões imaturos. As placas foram colocadas em luz difusa a 25°C durante doze semanas com subcultivo a cada vinte e oito dias.

### Experimento 2

Os genótipos foram cultivados no meio B onde foram utilizados vinte placas (repetições) de cada genótipo, cada uma contendo dez embriões. Devido à consulta feita à literatura, o cultivo ficou reduzido à oito semanas com subcultivo a cada quatro.

### Análise Estatística

A indução de calos foi medida a partir da porcentagem de calos formados em cada placa. Foi realizado o delineamento completamente casualizado (DCC), utilizando protocolo, genótipo e sua interação simples como fontes de variação no primeiro experimento e genótipo no segundo. Foi feita uma análise de variância, complementada pelo teste de Duncan a 5%.

No experimento 2 os embriões foram medidos em comprimento com o auxílio de uma ocular graduada. Foi realizada uma análise de distribuição de frequências, sendo calculadas as médias, variâncias, desvios padrão e coeficientes de variação dos tamanhos de embriões que induziram a formação de calos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os calos, independente do experimento, meio ou genótipo, em sua fase inicial de indução revelaram aspecto aquoso. Da mesma forma, o escutelo, o qual ficou em contato com o meio, necrosou em todos os embriões. A grande maioria dos calos evidenciou condição mista após subcultivos sucessivos. Parte era organogênica e esbranquiçada e parte embriogênica, amarela e friável. Tal descrição dos calos de aveia é semelhante àquela realizada por RINES e McCOY (1981) e HEYSER e NABORS (1982). A condição

mista dos calos também foi discutida por GRANDO et al. (1993), os quais, testando genótipos brasileiros de aveia, evidenciaram que o calo típico de aveia continha setores embriogênicos e organogênicos.

**Experimento 1**

A análise de variância para o caráter indução de

indução de calos. Em aveia o 2,4 D é o hormônio que melhor promove a indução de calos (CUMMINGS et al., 1976; RINES e McCOY, 1981; BREGITZER et al., 1989).

A comparação geral entre médias de porcentagem de indução de calos nos meios, avaliada pelo teste de Duncan, evidenciou dois grupos. Os meios A e B foram

**TABELA 2 – Resumo da Análise de variância para indução de calos de aveia**

Fontes de Variação	Experimento 1		Experimento 2	
	GL	QM	GL	QM
Meio	2	67245,21*	-	-
Genótipo (Gen.)	8	2174,59*	8	2884,59*
Meio x Gen.	16	710,65	-	-
Erro	254	671,28	128	1171,93
		CV(%) = 52,77		CV(%) = 47,70

\* – significativo pelo teste de F ao nível de 5%

calos revelou a existência de diferenças significativas entre os meios e genótipos testados (Tabela 2), não ocorrendo interação significativa entre genótipo e meio. BHASKARAN e SMITH (1990) salientaram que existe resposta diferenciada ao cultivo *in vitro* de acordo com o genótipo em diferentes cereais. Os autores afirmam ainda que as condições ótimas de cultivo podem ser diferentes de acordo com a cultivar e a espécie. Diversos autores têm detectado diferenças significativas entre genótipos de aveia quanto à sua capacidade de formação de calos (RINES e McCOY, 1981; CUMMINGS et al., 1976; GRANDO et al., 1993). Por outro lado, o meio utilizado (principalmente a dosagem de hormônio diferenciada) é outro fator limitante para o sucesso do cultivo *in vitro*. Segundo BHASKARAN e SMITH (1990) a resposta dos explantes aos reguladores de crescimento é diferenciada de acordo com a espécie e cultivar, sendo necessário, muitas vezes, uma adequação do balanço auxina/citocinina para que haja

superiores e estatisticamente iguais (Tabela 3). A comparação entre as médias dos genótipos nos meios indicou a existência de classes distintas, revelando variabilidade entre os genótipos. A UPF 7, GAF/PARK e UFRGS 8 mostraram boa capacidade de indução de calos, enquanto que a UFRGS 9 demonstrou ter uma resposta inferior (Tabela 3).

**Experimento 2**

De acordo com os resultados obtidos no experimento 1, os meios A e B foram os mais adequados para a indução de calos em aveia. Devido à necessidade de escolha, o meio B foi selecionado para dar continuidade ao trabalho por proporcionar maiores médias.

Os genótipos, testados no meio B, apresentaram médias significativamente distintas pelo teste de Duncan a 5% (Tabela 2 e 4). A UFRGS 8 foi inferior, enquanto que a UPF 12, GAF/PARK, UPF 7 e UFRGS 7 produziram médias superiores (Tabela 4).

**TABELA 3 – Porcentagem média de indução de calos em nove genótipos de aveia e meios testados no experimento<sup>1</sup>**

Genótipos	Meios			Média Geral
	A	B	C	
UFRGS 7	46,25	39,38	8,75	31,46bc
UFRGS 8	77,14	78,00	3,57	52,90 a
UFRGS 9	47,14	38,57	1,43	29,05 c
UFRGS 10	62,50	57,78	0	40,09 bc
UFRGS 11	51,43	60,36	0	37,26 bc
UFRGS 12	50,00	52,85	10,36	37,74 bc
UPF 7	81,11	75,66	38,88	65,22 a
UPF 12	70,37	77,00	0	49,12 ab
GAF/PARK	67,14	84,29	4,00	51,81 a
Média Geral	61,46 a	62,65 a	7,44 b	

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente por Duncan a 5%.

**TABELA 4 – Porcentagem de calos formados em nove genótipos de aveia cultivados em meio tipo B no experimento 2**

Genótipo	Média
UPF 12	95,62 a
GAF/PARK	85,38 a
UPF 7	80,83 a
UFRGS 7	78,93 a
UFRGS 9	77,62 ab
UFRGS 10	76,84 ab
UFRGS 11	72,50 ab
UFRGS 12	71,00 ab

A GAF/PARK e UPF 7 permaneceram no grupo superior em ambos os experimentos. A UFRGS 8, superior no primeiro experimento, foi classificada como inferior no experimento seguinte. A mudança de ordenação de alguns genótipos pode ter ocorrido devido a efeitos aleatórios no momento de instalação do experimento. Por outro lado, os resultados obtidos são de extrema importância visto que muitos dos genótipos avaliados não têm sido ainda testados para o cultivo *in vitro*.

O aumento expressivo das médias de indução de calos comparando os dois experimentos é um exemplo típico dos avanços metodológicos obtidos com a repetição do trabalho. O tamanho médio de embrião que contribuiu para a maior indução de calos foi de 2,35 mm (Tabela 5). A GAF/PARK demonstrou induzir maior número de calos com menor tamanho médio de embrião e a UFRGS 10 com o maior (Tabela 5). A média geral corresponde à citada na literatura, a qual fica entre 1 e 3 mm (BREGITZER et al., 1989).

### CONCLUSÕES

Existe variabilidade entre os genótipos de aveia testados quanto ao caráter indução de calos. Além disso, meios de cultura com diferentes concentrações de hormônios e tamanho de embrião são responsáveis por distintas manifestações deste caráter. O calo típico de aveia tem condição mista (parte organogênico e parte

embriogênico), sendo que em sua fase inicial possui aspecto aquoso.

### BIBLIOGRAFIA CITADA

- BHASKARAN, S.; SMITH, R.H. Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Science*, Madison, v.30, p.1328-1336, 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.
- 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.
- 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.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Serviço de disseminação de informações on line. Internet, 1996.
- JACKSON, J.A.; DALE, P.J. Callus induction, plant regeneration and an assessment of cytological variation in regenerated plants of *Lolium multiflorum* L. *Journal of Plant physiology*, Stuttgart, v.132, p.351-355, 1988.
- MILACH, S.C.K.; FEDERIZZI, L.C.; CARVALHO, F.I.F.; DORNELLES, A.L.C.; LANGE, C. Regeneração de plantas no cultivo de calos de genótipos brasileiros de trigo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.26, p.1947-1956.
- 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.

**TABELA 5 – Tamanho médio (mm) de embriões adequados para indução de calos de aveia do experimento 2**

Genótipos	Média (mm)	Desvio padrão	Variância	C.V.
UFRGS 7	1,92	13,99	195,85	36,38
UFRGS 8	2,21	17,02	289,38	38,57
UFRGS 9	2,02	17,32	299,38	42,94
UFRGS 10	2,86	12,80	163,78	22,40
UFRGS 11	2,45	11,78	138,69	23,69
UFRGS 12	2,36	12,91	166,44	27,32
UPF 7	2,77	14,42	207,72	26,01
UPF 12	2,63	19,34	373,73	36,77
GAF/PARK	1,92	10,92	119,06	28,42
Média Geral	2,35	14,50	217,16	31,43