

## Indução de embriogênese somática em diferentes explantes de aveia (*Avena sativa* L.)

### Somatic embryogenesis induction in different explants of oat (*Avena sativa* L.)

Noryam Bevia Bispo<sup>1</sup> Magali Ferrari Grando<sup>1\*</sup> Lizete Augustin<sup>1</sup> Marilei Suzin<sup>1</sup>

#### - NOTA -

#### RESUMO

Três experimentos foram conduzidos com o objetivo de avaliar o potencial de formação de calos embriogênicos de três tipos de explantes de aveia branca (*Avena sativa* L.) (embrião imaturo, embrião maturo e segmentos de coleótilo). Cada experimento foi conduzido com um dos explantes, cinco cultivares ("UPF15", "UPF16", "UPF18", "UPFA20" e "OR3") e dois meios de indução de calos (M1 = MS + 2mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e M2 = MS + 2mg L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1mg L<sup>-1</sup> BAP), sendo avaliadas as frequências de calos embriogênicos aos 60 dias de cultivo, massa fresca (mg) aos 90 e 120 dias e taxa de crescimento dos mesmos durante um período de 30 dias. Foi observada a influência do genótipo sobre as frequências de calos somente quando utilizado o explante embrião imaturo. O fator meio não teve influência sobre a frequência de calos em nenhum dos explantes testados. O embrião maturo não se mostrou adequado para indução de embriogênese somática em aveia. Os explantes coleótilo e embrião imaturo apresentaram uma capacidade embriogênica similar, produzindo 24 e 29% de calos embriogênicos, respectivamente. No entanto, o coleótilo pode ser considerado o explante ideal devido à independência genotípica, à alta taxa de crescimento de calos (328% em 30 dias), à fácil disponibilidade e à rapidez de obtenção.

**Palavras-chave:** *Avena sativa* L.; cultura de tecidos; embriogênese somática.

#### ABSTRACT

Three experiments were carried out to evaluate the embryogenic callus formation potential of three types of explants in oat (*Avena sativa* L.) (immature embryo, mature embryo and coleoptile segments). Each experiment was conducted with one explant, five cultivars (UPF15, UPF16, UPF18, UPFA20 and OR3) and two induction callus medium (M1 = MS + 2 4-D and M2 = MS + 2 4-D + BAP), being analyzed the frequency

of embryogenic calli at 60 days of cultivation, callus fresh weight (mg) at 90 and 120 days and callus growth rate during 30 days period. The influence of genotype on the embryogenic callus frequency was detected only when using the immature embryo explant. The culture medium did not influence the frequency of callus in any of the three tested explants. The mature embryo was not suitable for the induction of oat somatic embryogenesis. The coleoptile and immature embryo explants present a similar embryogenic capacity, producing 24 and 29% of embryogenic calli, respectively. However, the coleoptile can be considered the ideal explant due to its genotypic independence, high embryogenic callus growth rate (328% in 30 days), as well as easy and quick availability.

**Key words:** *Avena sativa* L.; tissue culture; somatic embryogenesis.

A aveia branca (*Avena sativa* L.) é uma importante alternativa para o cultivo de inverno no Sul do Brasil. Para alguns caracteres de importância agrônômica, a variabilidade genética é restrita e a indução de mutações *in vitro* pode ampliar o potencial de ganhos genéticos nessa cultura. Alterações genéticas podem ocorrer durante o cultivo prolongado de calos *in vitro*. GRANDO et al. (1997) e AUGUSTIN et al. (2000) induziram alterações positivas e herdáveis em nível fenotípico e molecular através do cultivo de calos embriogênicos em aveia. A embriogênese somática também tem sido útil na regeneração de plantas transgênicas em aveia (TORBERT et al.; 1998).

Em cultivares brasileiras de aveia, foram obtidas plantas *in vitro* a partir de calos induzidos de diferentes explantes, entre eles, sementes maduras (LAMB et al., 2002; GRANDO et al., 2004a), embriões

<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV), Universidade de Passo Fundo (UPF), CP 611, 99001-970, Passo Fundo, RS, Brasil. E-mail: magali@upf.br. \*Autor para correspondência.

imaturos (GRANDO et al., 1993) e coleóptilos (LAMB & MILACH, 2001). O tipo de calo e o potencial de regeneração podem ser influenciados por fatores como meio de cultura, genótipo e explante (BHASKARAM & SMITH, 1990; GRANDO et al., 1993). Embora o embrião imaturo seja o explante mais utilizado para iniciar a cultura de tecidos em monocotiledôneas, a utilização de explantes alternativos, como embriões maduros e coleóptilos, podem acelerar o processo de indução de variação somaclonal, uma vez que os mesmos podem ser disponibilizados em todas as épocas do ano.

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF e teve como objetivo avaliar o potencial de formação de calos embriogênicos a partir do cultivo de três diferentes explantes em cultivares brasileiras de aveia branca, em dois meios de cultura.

Foram realizados três experimentos, sendo que em cada um foi avaliado um tipo de explante, (embrião imaturo, embrião maturo e segmento de coleóptilo). Para todos os experimentos, foram utilizadas as cultivares “UPF15”, “UPF16”, “UPF18”, “UPFA20” e “OR3”, cultivadas em telado e dois meios de indução de calos (M1 = MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) + 2mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético) + 30g L<sup>-1</sup> de sacarose + 6g L<sup>-1</sup> de ágar; M2= M1 acrescido de 1mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-Benzilaminopurina)). A dose de 2,4-D foi adotada em função de resultados obtidos com embriões imaturos por GRANDO et al. (1993).

Para obtenção dos embriões zigóticos imaturos, cariopses no estágio de grão leitoso foram desinfestados e os embriões imaturos (2 a 3mm) excisados foram cultivados nos meios de indução. Para o experimento de embriões zigóticos maduros, cariopses maduros foram descascados, desinfestados e os embriões excisados foram cultivados *in vitro*. Os segmentos de coleóptilos foram obtidos de cariopses maduros germinados em meio MS, por cerca de uma semana. Coleóptilos com 4,0 a 7,0cm de comprimento foram seccionados na porção basal, de forma a obter segmentos de 2mm, dentro dos quais estava o meristema apical. Todos os explantes foram subcultivados para meio fresco a cada 30 dias e as culturas mantidas em câmara de crescimento no escuro, a 28±2°C.

As variáveis analisadas em cada experimento foram a frequência de calos embriogênicos aos 60 dias de cultivo, a massa fresca (mg) de calos aos 90 e 120 dias e a taxa de crescimento de calos embriogênicos, expressa em percentagem, em 30 dias (correspondente a um ciclo de cultivo no período dos 90 aos 120 dias). Para cada explante estudado, utilizou-

se o delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial cinco (genótipos) x dois (meios de cultura) e quatro repetições, sendo a unidade experimental uma placa de Petri com seis explantes. Os dados de frequência de calos foram transformados por arco seno de X+1 e submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey (P≤0,05). Na análise comparativa dos experimentos, os dados com relação à frequência, à massa fresca e à taxa de crescimento dos calos embriogênicos foram comparados utilizando a média ±1 desvio padrão.

No experimento com embriões zigóticos imaturos, observou-se a influência do genótipo na frequência de calos embriogênicos (P=0,0003), onde a cultivar “OR3” produziu a mais alta frequência deste tipo de calo (66,7%), diferindo estatisticamente das demais (Tabela 1). Em cereais, tem sido demonstrado que o genótipo desempenha um papel significativo na iniciação de culturas embriogênicas (BHASKARAN & SMITH, 1990). Em genótipos sul-brasileiros de aveia, GRANDO et al. (1993) observaram uma variação de 0 a 37% na produção de calos a partir de embriões imaturos.

A resposta diferencial entre os genótipos pode ser explicada pelas variações nos níveis de hormônios endógenos, bem como pela expressão de genes que codificam receptores hormonais (CLOSE & GALLAGHER-LUDEMAN, 1989). Segundo GALIBA et al. (1986), um sistema poligênico pode estar envolvido na determinação da capacidade de indução de calos e da regeneração de plantas.

Quando foram utilizados embriões maduros, não foi observada influência de nenhum dos fatores estudados (genótipo e meio) sobre as frequências de calos embriogênicos. Em média, a frequência observada foi de 1,9%, variando de 0% (UPF16) a 3,0% (UPF18).

Tabela 1 - Frequência de calos embriogênicos obtidos a partir de embriões zigóticos imaturos de cinco cultivares de aveia após 60 dias de cultivo, em dois meios de indução de calos (M1 = MS + 2mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e M2= M1 acrescido de 1mg L<sup>-1</sup> de BAP)

Cultivares	Média de calos
	embriogênicos (%)
OR3	66,7 a
UPFA20	30,0 b
UPF16	23,7 b
UPF18	17,4 b
UPF15	11,7 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro (P≤0,05).

Baixa frequência de calos e ausência de efeito genotípico foi observada anteriormente em aveia, com o mesmo explante, por LAMB et al. (2002).

A frequência de calos embriogênicos obtida de segmentos de coleótilo contendo meristemas apicais também não foi influenciada pelos fatores genótipo e meio. Porém, diferentemente do observado em embriões maduros, o coleótilo foi mais eficiente na produção de calos. Em média, 24,1% dos segmentos de coleótilos produziram calos embriogênicos, variando de 7,1% na “UPF15” a 36,7% na “OR3”. GRANDO et al. (2004), utilizando os mesmos genótipos de aveia, observaram média similar e ausência de efeito genotípico. O comportamento diferencial dos explantes quanto à presença do efeito genotípico na resposta embriogênica poderia ser explicado por vários fatores, como grau de diferenciação, determinação e competência do tecido, níveis hormonais endógenos e estágio do desenvolvimento do explante.

A presença da citocinina BAP no meio de cultura não teve efeito sobre a embriogênese nos diferentes genótipos e explantes de aveia testados. Entretanto, GRANDO et al. (2001) observaram que o uso de BAP em combinação com auxina 2,4-D resultou num aumento de 20 vezes na frequência de calos embriogênicos de sementes maduras de *Paspalum notatum*.

Embora a homogeneidade das variâncias não tenha permitido a análise conjunta dos três experimentos em relação às frequências de calos embriogênicos, é possível comparar os resultados obtidos com os três explantes. As frequências médias de calos de embriões imaturos (29,1%) e coleótilos (24,1%) foram superiores à frequência obtida de embriões maduros (1,9%) (Tabela 2). Porém, um fato negativo observado na utilização do embrião imaturo como explante foi a influência do genótipo na resposta embriogênica *in vitro*. O efeito do

tipo e idade do explante de gramíneas na resposta *in vitro* tem sido relatado por vários autores. Tais diferenças podem refletir a variação na concentração endógena de fitohormônios, na produção de receptores hormonais e na expressão de genes envolvidos na embriogênese (CLOSE & GALLAGHER-LUDEMAN, 1989). Ainda, explantes mais jovens respondem melhor devido ao fato de apresentarem crescimento rápido, o que é essencial para iniciar as culturas.

A massa fresca e a taxa de crescimento de calos são importantes para a determinação da capacidade de crescimento e para a manutenção dos mesmos. Valores inferiores de massa fresca foram observados em calos obtidos de embrião maturo e taxas superiores de crescimento durante um ciclo de subcultivo foram observadas em calos oriundos de coleótilos (327,7%) (Tabela 2).

Conclui-se que o tipo de explante e o genótipo utilizado para iniciar o cultivo *in vitro* de aveia influenciam na frequência de calos embriogênicos. A influência genotípica só é observada quando se utiliza o embrião imaturo como explante. Já a adição de BAP no meio de indução não tem influência positiva sobre a frequência desse tipo de calo. O coleótilo pode ser considerado o explante ideal para indução de embriogênese somática em aveia devido à alta frequência de calos formados, à alta taxa de crescimento dos mesmos, à ausência de influência genotípica, além da disponibilidade durante o ano e da rapidez no isolamento do mesmo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a bolsa de iniciação científica disponibilizada pelo CNPq.

Tabela 2 – Frequência média de calos embriogênicos, amplitude de variação de médias de tratamentos e influência dos fatores cultivar e meio(+= influência do fator; - = ausência de influência do fator) sobre as frequências dos calos obtidos nos três explantes, aos 60 dias, bem como massa fresca de calos individuais (mg) observados aos 90 e 120 dias de cultivo e taxa de crescimento no mesmo período

Explante	Calos embriogênicos			Avaliação do crescimento de calos embriogênicos			
	Média (%)	Varição (%)	EG	EM	Massa fresca aos 90 dias (mg)	Massa fresca aos 120 dias (mg)	Taxa de crescimento (%)
Embrião imaturo	29,1 S	11,7 – 66,7	+	-	0,21	0,53	269,5
Embrião maturo	1,9 I	0 – 3,0	-	-	0,06 I	0,29 I	241,5
Coleótilo	24,1 S	7,1 – 36,7	-	-	0,17	0,45	327,7 S
Média	18,36				0,15	0,42	279,57
Desvio padrão	14,47				0,08	0,12	43,97

EG= Efeito genotípico; EM= Efeito de meio

Média + desvio padrão = superior (S)

Média – desvio padrão = inferior (I)

**REFERÊNCIAS**

- AUGUSTIN, L. et al. Agronomic, cytogenetic, and isoenzymatic characterizations of oat somaclones. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.3, p.649-660, 2000.
- BHASKARAN S; SMITH RH. Regeneration in cereal tissue culture: a review. **Crop Science**, Madison, v.30, p.1328-1336, 1990.
- CLOSE, K.R.; GALLAGHER-LUDEMAN, L.A. Structure-activity relationships of auxin-like plant growth regulators and genetic influences on the culture induction responses in maize (*Zea mays* L). **Plant Science**, Ireland, v.61, p.245-252, 1989.
- GALIBA, G. et al. Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat. **Plant Breeding**, Berlin, v.97, p.261-263, 1986.
- GRANDO, M.F. et al. 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.
- GRANDO, M.F. et al. Avaliação das características agronômicas em populações R<sub>3</sub> de aveia geradas pelo cultivo de tecidos. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v.3, n.2, p.139-145, 1997.
- GRANDO, M.F. et al. Optimizing embryogenic callus production and plant regeneration from "Tifton 9" bahiagrass (*Paspalum notatum* Flugge) seed explants for genetic manipulation. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, Netherland, v.1, n.10, p.1-10, 2001.
- GRANDO, M.F. et al. Uso de meristema apical como explante para indução de calos embriogênicos em cinco genótipos de aveia. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 24., 2004, Pelotas, RS. **Anais... Pelotas: UFPEL**, 2004. p545-547.
- LAMB, C.R.C.; MILACH, S.C.K. Regeneração de plantas a partir de segmentos de base de folhas em aveia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.751-755, 2001.
- LAMB, C.R.C. et al. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro em aveia (*Avena sativa* L.). In: BRAMMER, S.P.; IORCZESKI, E.J. **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p.349-362.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v.15, p.473-497, 1962.
- TORBERT et al. Genetically engineering elit oat cultivars. **Crop Science**, Madison, v.38, p.1685-1687, 1998.