

# VARIABILIDADE GENÉTICA PARA A REGENERAÇÃO DE PLANTAS NO CULTIVO DE CALOS DE TRIGO<sup>1</sup>

SANDRA C.K. MILACH<sup>2</sup>, LUIS CARLOS FEDERIZZI, FERNANDO I.F. DE CARVALHO e JOSÉ FERNANDES BARBOSA NETO<sup>3</sup>

**RESUMO** - Três genótipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) e as respectivas progênes F1 e/ou F2 dos cruzamentos Maringá x Nobre, Maringá x Palmeira, Nobre x Palmeira e cruzamentos recíprocos foram avaliados quanto à regeneração de plantas no cultivo de calos. Variabilidade entre genótipos foi observada para essa característica. Evidências de ação gênica aditiva e de dominância no controle do caráter foram encontradas. Os efeitos recíprocos parecem ser de pouca importância para a regeneração de plantas *in vitro*.

Termos para indexação: *Triticum aestivum*, herança genética, cultura de tecido.

## GENETIC VARIABILITY FOR PLANT REGENERATION ON CALLUS CULTURE OF WHEAT

**ABSTRACT** - The parental genotypes and F1 and/or F2 generations from three wheat crosses Maringá x Nobre, Maringá x Palmeira, Nobre x Palmeira and reciprocals were evaluated for plant regeneration on callus culture. Variability among genotypes was observed to that trait, and additive and dominance gene actions appear to be important. Reciprocal effects were not significant for regeneration.

Index terms: *Triticum aestivum*, genetic inheritance, tissue culture.

## INTRODUÇÃO

A descoberta, neste século, da totipotência da célula vegetal, permitiu o desenvolvimento das técnicas de cultura de células e tecidos em diversas espécies. Entretanto, o êxito na utilização dessas metodologias tem sido distinto de uma espécie para outra e entre diferentes genótipos da mesma espécie.

Em diversos cereais, o emprego das técnicas de cultura de células e tecidos tem sido limitado a um número restrito de genótipos (Green et al. 1974, Sharma et al. 1980, Rines & McCoy 1981, Maddock et al. 1983, Hanzel et al. 1985 e Oard & Rutger 1988). Esse fato

tem restringido o germoplasma a ser trabalhado pelas novas técnicas e impossibilitado a utilização de genótipos com boas características agronômicas, mas baixo potencial para cultivo *in vitro*. No caso do trigo, variabilidade genética para regeneração de plantas tem sido relatada por vários autores (Ahloowalia 1982, Sears & Deckard 1982, Maddock et al. 1983, He et al. 1986, Papenfuss & Carman 1987 e Agache et al. 1988).

Diversos trabalhos têm sido feitos para estudar o controle genético da regeneração de plantas no cultivo *in vitro* de várias espécies, e os autores têm sugerido que essa característica é controlada geneticamente (Kumar et al. 1985, Tomes & Smith 1985, Miah et al. 1985 e Hodges et al. 1986). Assim, existe a possibilidade de selecionar genótipos com alta frequência de regeneração de plantas e transferir essa característica para genótipos superiores, mas com baixo potencial para o cultivo *in vitro*.

Entre genótipos brasileiros de trigo foi observada variabilidade para regeneração de

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 5 de junho de 1991. Trabalho desenvolvido no Lab. do Dep. de Plantas de Lavoura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

<sup>2</sup> Enga. - Agra., (UFPel), Mestra em Fitotecnia, UFRGS, Caixa Postal 776, CEP 90001 Porto Alegre, RS. Pesquisadora do CNPq.

<sup>3</sup> Eng. - Agr., Ph.D., Fac. de Agron., UFRGS. Pesquisador do CNPq.

plantas *in vitro* (Milach 1989), e as causas do comportamento distinto dos genótipos para essa característica ainda não foram esclarecidas.

Este trabalho teve como objetivo fazer um estudo preliminar da herança genética da regeneração de plantas em genótipos brasileiros de trigo, para viabilizar a utilização de genótipos com baixo potencial para o cultivo *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Três genótipos brasileiros de trigo (*Triticum aestivum* L.) e as respectivas progênes F1 e/ou F2 dos cruzamentos entre eles foram avaliados quanto à regeneração de plantas *in vitro*, em três experimentos diferentes.

No experimento I, receberam inóculo 20 embriões dos genótipos Maringá e Nobre e respectivas progênes F1 ou F2 dos cruzamentos Maringá x Nobre e Nobre x Maringá.

No experimento II receberam inóculo 20 embriões dos genótipos Nobre e Palmeira e respectivas progênes F2 dos cruzamentos Nobre x Palmeira e Palmeira x Nobre.

No experimento III foram avaliados 35 embriões dos mesmos genótipos e progênes F2 dos cruzamentos Maringá x Nobre, Maringá x Palmeira, Palmeira x Maringá e Nobre x Palmeira.

O explante utilizado foi o embrião imaturo de trigo, coletado 14 a 18 dias após a antese, com um a dois milímetros de comprimento. As sementes imaturas foram desinfestadas com etanol a 70% por 30 segundos, alvejante comercial a 20% (com hipoclorito de sódio a 5%) por 15 minutos e com três lavagens com água esterilizada.

Os embriões imaturos foram inoculados com o escutelo para cima em meio de cultura Murashige & Skoog (1962), suplementado com 30 g/l de sacarose, 6 g/l de ágar-ágar (Difco), 100 mg/l de mio-inositol e 2,0 mg/l de 2,4 D (ácido 2,4-diclorafenoxiacético), e corrigido para pH 5,8 com o acréscimo de hidróxido de sódio.

Os calos regenerados foram transferidos primeiro para meio MS com 0,5 mg/l de 2,4 D, e depois, para meio de regeneração da parte aérea da planta, MS com 0,1 mg/l de 2,4 D, permanecendo 21 dias em cada etapa de cultivo. Os calos com parte aérea induzida foram transferidos para meio MS sem reguladores de crescimento, para a formação do sistema

radicular da planta, e permaneceram de 21 a 30 dias até que as plantas pudessem ser retiradas dos vidros.

As condições de incubação foram: temperatura de 25°C ± 1°C, escuro nas duas primeiras etapas de cultivo, e luz constante a partir da etapa de regeneração da parte aérea da planta.

As frequências de calos que regeneraram plantas ou raízes foram calculadas pelo número e calos que regeneraram plantas ou raízes sobre o número total de calos induzidos, excluindo-se os calos contaminados. Foi realizado teste para a comparação dos diferentes genótipos ou gerações segregantes quanto à proporção de calos que regeneraram plantas, utilizando-se a fórmula proposta por Walpole (1968):

$$z = \frac{\hat{p}_1 - \hat{p}_2}{\{\hat{p}\hat{q}[(1/n_1) + (1/n_2)]\}^{1/2}} \quad \text{onde:}$$

$$\hat{p}_1 = \frac{x_1}{n_1} \quad \begin{array}{l} \text{(nº de calos que regeneraram plantas do genó-} \\ \text{tipo 1)} \\ \text{(nº total de calos testados do genótipo 1)} \end{array}$$

$$\hat{p}_2 = \frac{x_2}{n_2} \quad \begin{array}{l} \text{(nº de calos que regeneraram plantas do genó-} \\ \text{tipo 2)} \\ \text{(nº total de calos testados do genótipo 2)} \end{array}$$

$$\hat{p} = \frac{x_1 + x_2}{n_1 + n_2}$$

$$\hat{q} = 1 - \hat{p}$$

O valor calculado de z é comparado com valor da Tabela de Z conforme probabilidade desejada (Ex.: para P, 05 Z = 1,64).

A comparação foi realizada entre os genótipos parentais e entre o genótipo parental e a geração F1 e/ou F2.

As plantas obtidas foram retiradas dos vidros, separadas, e, após o período de ajuste ao novo ambiente, transferidas para o telado, onde permaneceram até a colheita.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genótipos Maringá e Nobre apresentaram diferenças significativas quanto à frequência de calos que regeneraram plantas nos experimentos I (Tabela 1) e III (Tabela 2). O mesmo foi observado na comparação dos genótipos Nobre e Palmeira (Tabelas 3 e

4) e Maringá e Palmeira (Tabela 5), quanto à regeneração de plantas *in vitro*. Esses resultados indicam que existe variabilidade entre genótipos para essa característica. O genótipo Maringá revelou melhor regeneração em todos os experimentos, seguido do genótipo Nobre e do genótipo Palmeira de baixa regeneração.

Variabilidade genética em trigo para regeneração de plantas tem sido relatada por diversos autores (Ahloowalia 1982, Sears & Decard 1982, Maddock et al. 1983, Lazar et al. 1983, He et al. 1986, Papenfuss & Carman 1987 e Agache et al. 1988). Esse fato é de ex-

trema importância, pois a existência de genótipos com baixo potencial para regeneração de plantas *in vitro* poderá limitar o uso dessas técnicas a um número muito pequeno de genótipos. A frequência de calos, que não haviam regenerado parte aérea e regeneravam somente raízes quando em meio de cultura sem reguladores de crescimento, variou de zero por cento para o genótipo Maringá (Tabelas 1, 2 e 5) a 20% para os genótipos Nobre (Tabelas 1, 2 e 4) e Palmeira (Tabelas 4 e 5). Alguns autores relatam que a formação de raízes antes da indução da parte aérea em trigo tem sido obser-

**TABELA 1.** Frequência de calos que regeneraram plantas e/ou raízes dos genitores Maringá e Nobre, e progênies F1 e ou F2, no experimento I. FA/UFRGS, Porto Alegre, RS, 1988/89.

Genótipos	Nº de calos	% de calos com	
		Regeneração de plantas	Regeneração de raízes
Maringá	11	72,70	0,00
Nobre	10	30,00*	20,00
M x N F1	13	61,50	7,70
M x N F2	10	50,00	10,00
N x M F2	9	44,40	11,10

\* Diferente de Maringá ( $P < 0,05$ ).

**TABELA 2.** Frequência de calos que regeneraram plantas e/ou raízes dos genitores Maringá e Nobre, e progênies F2, no experimento III. FA/UFRGS, Porto Alegre, RS, 1988.

Genótipos	Nº de calos	% de calos com	
		Regeneração de plantas	Regeneração de raízes
Maringá	23	100,00	0,00
Nobre	20	50,00*	20,00
M x N F2	22	68,20*	4,54

\* Diferente de Maringá ( $P < 0,05$ ).

**TABELA 3.** Frequência de calos que regeneraram plantas e/ou raízes dos genitores Nobre e Palmeira, e progênies F2, no experimento II. FA/UFRGS, Porto Alegre, RS, 1988/89.

Genótipos	Nº de calos	% de calos com	
		Regeneração de plantas	Regeneração de raízes
Maringá	14	43,00	7,00
Palmeira	16	12,50*	31,25
N x PF2	12	16,60	12,50
P x NF2	14	21,40	7,00

\* Diferente de Nobre ( $P < 0,05$ ).

**TABELA 4.** Frequência de calos que regeneraram plantas e/ou raízes dos genitores Nobre e Palmeira, e progênies F2, no experimento III. FA/UFRGS, Porto Alegre, RS, 1988/89.

Genótipos	Nº de calos	% de calos com	
		Regeneração de plantas	Regeneração de raízes
Nobre	20	50,00	20,00
Palmeira	25	24,00**	20,00
N x PF2	30	46,60	20,00

\*\* Diferente de Nobre e do F2 ( $P < 0,05$ ).

vada a partir de calos não embriogênicos (O'Hara & Street 1978, Ozias-Akins & Vasil 1982 e 1983). Assim, é possível que as diferenças entre genótipos quanto à regeneração de plantas seja devido ao comportamento distinto dos mesmos para diferenciação de calos embriogênicos. Por outro lado, mudanças nas concentrações de auxinas e citocininas utilizadas neste trabalho poderiam variar a resposta observada nos diferentes genótipos estudados. Variação para a tolerância a 2,4 D existe entre genótipos de trigo, e para a maioria dos genótipos o grau de organização celular e meristemático pode ser controlado pela manipulação da concentração de 2,4 D (Sears & Deckard 1982).

As progênes F1 ou F2 dos cruzamentos Maringá x Nobre e Nobre x Maringá apresentaram frequência de calos que regeneraram plantas ou raízes situada na amplitude de variação dos genitores (Tabelas 1 e 2). Destas, somente a geração F2 no cruzamento Nobre x Maringá foi significativamente diferente de Maringá (Tabela 2). Embora não significativa, houve um decréscimo da proporção de calos que regeneraram plantas da geração F1 para a F2 no cruzamento Maringá x Nobre evidenciando a presença de dominância (Tabela 1). Resultados similares foram relatados por Hodges et al. (1986) em milho.

**TABELA 5. Frequência de calos que regeneraram plantas e/ou raízes dos genitores Maringá e Palmeira, e progênes F2, no experimento III. FA/UFRGS, Porto Alegre, RS, 1988/89.**

Genótipos	Nº de calos	% de calos com	
		Regeneração de plantas	Regeneração de raízes
Maringá	23	100,00	0,00
Palmeira	25	24,00*	20,00
M x PF2	19	36,80*	10,53
P x MF2	21	42,80*	4,77

\* Diferente de Maringá ( $P < 0,05$ ).

Comportamento intermediário das progênes F2 para regeneração de plantas ou raízes foi também verificado nos cruzamentos entre os genitores Nobre e Palmeira (Tabelas 3 e 4), e Maringá e Palmeira (Tabela 5).

Para o cruzamento entre Nobre e Palmeira nos diferentes experimentos foram obtidos resultados contrastantes. No experimento II, as progênes F2 revelaram percentagem de regeneração mais próxima do pai de menor regeneração, embora não diferente de Nobre (Tabela 3), enquanto que no experimento III a regeneração de plantas da geração F2 foi próxima à do genitor de maior regeneração (Tabela 4). Estes resultados refletem provavelmente diferenças no número de calos utilizados nos dois experimentos e no aperfeiçoamento na condução das técnicas.

Para o cruzamento Maringá x Palmeira a geração F2 foi mais próxima do pai de menor capacidade regenerativa. Parece evidente que o genótipo Palmeira determina em seus cruzamentos uma menor percentagem de regeneração de plantas *in vitro* (Tabela 5).

Os resultados observados com as diferentes progênes revelam como importantes a aditividade e também a existência de dominância, proporcionada por combinações específicas.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Tomes & Smith (1985) no estudo da herança genética da formação de calos embriogênicos em milho, e com os de Agache et al. (1988) para regeneração de plantas na cultura de anteras de trigo.

As diferenças para as progênes F2 dos cruzamentos recíprocos entre os genótipos Maringá e Nobre (Tabela 1), Nobre e Palmeira (Tabela 3), e Maringá e Palmeira (Tabela 5) foram pequenas. Entretanto, dada a pequena amostragem de calos avaliados, é difícil atribuir essas diferenças a uma herança citoplasmática, e é provável que os efeitos recíprocos não sejam importantes para a regeneração de planta *in vitro*. Por outro lado, em milho, efeito materno significativo foi observado na herança da formação de calos embriogênicos (Tomes & Smith 1985). Assim, estudos posteriores deverão ser feitos para

confirmar a existência, ou não, de efeito materno para essa característica.

As evidências obtidas neste estudo, da importância das ações gênicas de aditividade e dominância para a regeneração de plantas, indicam que esta característica poderá ser facilmente manipulada nos programas convencionais de melhoramento, para a seleção de genótipos com maior habilidade regenerativa *in vitro*. Dessa forma, genótipos com características agrônomicas desejáveis, mas baixo potencial no cultivo *in vitro*, poderão ser melhorados para a regeneração de plantas. Isso será de grande importância para não limitar o germoplasma a ser utilizado pelas novas técnicas de cultura de células e tecidos.

### CONCLUSÕES

1. Foi observada variabilidade entre diferentes genótipos quanto à regeneração de plantas *in vitro*.

2. Existem evidências de que a regeneração de plantas é um caráter controlado por efeitos aditivos e de dominância. Tal fato indica que será possível manipular essa característica nos programas convencionais de melhoramento a fim de obter genótipos com alto potencial para o cultivo *in vitro*.

3. Efeitos recíprocos não foram importantes para a regeneração de plantas *in vitro*.

4. A dominância parece depender de combinações específicas, tanto para maior como para menor capacidade regenerativa.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FAPERGS pelo auxílio financeiro prestado.

### REFERÊNCIAS

- AGACHE, S.; DE BUYSER, J.; HENRY, Y.; SNAPE, J.W. Studies of the genetic relationship between anther culture and somatic tissue culture abilities in wheat. **Plant Breeding**, Berlin, v.100, p.26-33, 1988.
- AHLOOWALIA, B.S. Plant regeneration from callus culture in wheat. **Crop Science**, Madison, v.22, p.405-410, 1982.
- GREEN, C.E.; PHILLIPS, R.L.; KLEESE, R.A. Tissue cultures of maize (*Zea mays* L.): initiation, maintenance, and organic growth factors. **Crop Science**, Madison, v.14, p.54-58, 1974.
- HANZEL, J.J.; MILLER, J.P.; BRINKMAN, M.A.; FENDOS, E. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. **Crop Science**, Madison, v.25, p.27-31, 1985.
- HE, D.G.; TANNER, G.; SCOTT, K.J. Somatic embryogenesis and morphogenesis in callus derived from the epiblast of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum*). **Plant Science**, Limerick, v.45, p.119-124, 1986.
- HODGES, T.K.; KAMO, K.K.; IMBRIE, C.W.; BECWAR, M.R. Specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. **Biotechnology**, v.4, p.219-223, 1986.
- KUMAR, A.S.; REDDY, T.P.; REDDY, G.M. Genetic analysis of certain *in vitro* and *in vivo* parameters in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.70, p.151-156, 1985.
- LAZAR, M.D.; COLLINGS, G.B.; VIAN, W.E. Genetic environmental effects on the growth and differentiation of wheat somatic cell cultures. **Journal of Heredity**, Washington, v.74, p.353-357, 1983.
- MADDOCK, S.E.; LANCASTER, V.A.; RISIOTT, R.; FRANKLIN, J. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.34, p.915-926, 1983.
- MIAH, M.A.A.; EARLE, E.D.; KHUSH, G.S. Inheritance of callus formation ability in anther cultures of rice, *Oryza sativa* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.70, p.113-116, 1985.
- MILACH, S.C.K. Variabilidade genética para o crescimento de calos e potencial de regeneração de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.). *in vitro*. Porto Alegre: UFRGS, 1989. 73p. Dissertação de Mestrado.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- WARD, J.H.; RUTGER, J.N. Callus inductions and plant regeneration in elite U.S. rice lines. **Crop Science**, Madison, v.28, p.565-567, 1988.
- O'HARA, J.F.; STREET, H.E. Wheat callus culture: the initiation, growth and organogenesis of callus derived from various explant sources. **Annals of Botany**, Oxford, v.42, p.1029-1038, 1978.
- OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I.K. Callus induction and growth from the mature embryo of *Triticum aestivum* (wheat). **Protoplasma**, New York, v.115, p.104-113, 1983.
- OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I.K. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat) evidence for somatic embryogenesis. **Protoplasma**, New York, v.110, p.95-105, 1982.
- PAPENFUSS, J.M.; CARMAN, J.G. Enhanced regeneration from wheat callus cultures using dicamba and kinetin. **Crop Science**, Madison, v.27, p.588-593, 1987.
- 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.
- SEARS, R.G.; DECKARD, E.L. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. **Crop Science**, Madison, v.22, p.546-550, 1982.
- SHARMA, G.C.; BELLO, L.L.; SAPRA, V.T. Genotypic differences in organogenesis from callus of ten triticale lines. **Euphytica**, Wageningen, v.29, p.751-754, 1980.
- 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.
- WALPOLE, R.E. **Introduction to statistics**. New York: Macmillan Publishing Co, 1968. 340p.