

BC/27297
IB/80603

T/UNICAMP

C261_r

REGENERAÇÃO SOMÁTICA *IN VITRO* EM CULTIVARES DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) E APLICAÇÃO NO MELHORAMENTO GENÉTICO

CHRISTIANE MARIA OMETTO CASALE

ORIENTADOR: Dr. JOSÉ ALFREDO USBERTI FILHO

Este exemplar correspondente à redação final
da tese de Mestrado (a) candidato(a)
Christiane Maria Ometto Casale
e aprovada pela Comissão Julgadora.

27/2/96

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ciências Biológicas
na área de Genética

CAMPINAS
Estado de São Paulo - Brasil
1996

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	TI/UNICAMP
	C261r
V.	E.
TEMPO BC	27.297
PROC.	GGT/96
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	10/04/96
N.º CPD	

CM-00086184-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

C261r

Casale, Christiane Maria Ometto

Regeneração somática *in vitro* em cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) e aplicação no melhoramento genético / Christiane Maria Ometto Casale. - - Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: José Alfredo Usberti Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Alface. 2. Tecidos (Anatomia e fisiologia) - Cultura e meios de cultura. 3. Melhoramento genético. I. Usberti Filho, José Alfredo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 27 de fevereiro de 1996.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. JOSÉ ALFREDO USBERTI FILHO (Orientador)



assinatura

Prof. Dr. PAULO MAZZAFERA



assinatura

Prof. Dr. MARCOS ANTONIO MACHADO



assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. HERCULANO PENNA MEDINA FILHO

assinatura

APROVADA

“Se não houver frutos,
valeu a beleza das flores;
Se não houver flores,
valeu a sombra das folhas;
Se não houver folhas,
valeu a intenção da semente”.

Henfil

A meus pais,
Lourdes e Helio

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Instituto Agronômico de Campinas (Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais - Seção de Genética), pelas facilidades oferecidas durante a realização deste trabalho;
- Aos Pesquisadores-Científicos Dr. José Alfredo Usberti Filho e MS. Walter José Siqueira, pela valiosa orientação e co-orientação desta tese;
- Ao Pesquisador-Científico Dr. Rogério Salles Lisboa (*in memoriam*), pelo fornecimento do material genético utilizado nesta tese;
- Aos Pesquisadores-Científicos Dr. Toshio Igue e Dr^a. Violeta Nagai (Seção de Estatística) e MS Marcelo Tavares (Seção de Olericultura), pela contribuição nas análises estatísticas dos resultados de experimentos de laboratório e de campo, respectivamente;
- À Universidade Estadual de Campinas (Instituto de Biologia), pela minha formação científica;
- À CAPES (Coordenadoria de Apoio ao Ensino e Pesquisa de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), por terem me permitido a conclusão do curso de pós-graduação;
- À Eng^a Agr^a Roseli Aparecida Marto, pelo auxílio na execução de diversas fases deste trabalho, além da profunda amizade;
- Aos colegas e funcionários da Seção de Genética, em especial à técnica de laboratório Raully Máximo Rabello Moreti, (fase de laboratório), ao auxiliar de campo Sr. Braz Floriano (fase de campo); aos Pesquisadores-Científicos Dr^a. Marinez Muraro Alves de Lima e MS Maria Bernadete Silvarolla (auxílio na utilização de computador); às srtas Marli Harris e Heloiza Fontanini de Oliveira (editoração);

- Aos Pesquisadores-Científicos Solange Gomes Carneiro (Instituto Agrônomo do Paraná) e Edson Tobias Domingues (Centro de Citricultura-Cordeirópolis,SP), ao Professor Marcos David Figueiredo de Carvalho (Universidade Federal do Piauí) e ao Eng^o Agr^o Marcelo Martins Zomignani, pelo apoio, incentivo e amizade.
- Aos Pesquisadores Científicos Dr. Oliveira Guerreiro Filho (Seção de Genética - Instituto Agrônomo de Campinas), e Dr. Marcos Antonio Machado Filho (Centro de Citricultura - Cordeirópolis, SP); e ao Professor Dr. Paulo Mazzafera (Instituto de Biologia - UNICAMP), pelas valiosas contribuições, como membros da pré-banca desta tese;
- Aos Pesquisadores Científicos Dr. Marcos Antonio Machado (Centro de Citricultura - Cordeirópolis, SP) e Dr. Herculano Penna Medina Filho (Seção de Genética - Instituto Agrônomo de Campinas); e ao Professor Dr. Paulo Mazzafera, pela participação como membros da banca desta tese;
- A meu irmão Márcio Fernando Ometto Casale pela colaboração na editoração, disponibilidade e amizade.
- A meus pais Lourdes e Hélio, pelo apoio e incentivo que sempre me deram.

CONTEÚDO	Pag.
RESUMO	1
SUMMARY.....	3
I.INTRODUÇÃO.....	7
II. REVISÃO DE LITERATURA	8
1. Sistemática, Origem e Evolução	8
2. Aspectos Botânicos	9
3 Biologia da reprodução	10
4. Aspectos genéticos	11
5. Histórico, tendências do melhoramento genético de alface e perspectivas	13
6. Variação somaclonal	17
6.1. Fatores que afetam a ocorrência e a frequência de variação somaclonal em plantas	19
6.2. Variação somaclonal em espécies vegetais	23
6.3. Variação somaclonal em alface	25
III. MATERIAL E MÉTODOS	28
1. Material genético	28
2. Metodologia	28

2.1. Fase de laboratório	28
2.1.1. Desinfestação prévia de sementes.....	28
2.1.2. Testes de germinação das sementes desinfestadas.....	30
2.1.2.1. Germinação <i>in vitro</i>	30
2.1.2.2. Germinação convencional	31
2.1.3. Indução de organogênese somática	32
2.1.3.1. Utilização de hipocótilos como fonte de explantes	32
2.1.3.2. Utilização de folhas cotiledonares como fonte de explantes	34
2.2. Fase de casa de vegetação	37
2.3. Fase de campo	39
 IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 42
1. Fase de laboratório	42
1.1. Desinfestação prévia das sementes	42
1.2. Testes de germinação das sementes desinfestadas.....	42
1.2.1. Germinação <i>in vitro</i>	42
1.2.2. Germinação convencional	43
1.3. Indução de organogênese somática	44
1.3.1. Utilização de hipocótilos como fonte de explantes	44

1.3.2.Utilização de folhas cotiledonares como fonte de explantes	47
2. Fase de casa-de-vegetação	67
3. Fase de campo	70
V. CONCLUSÕES	76
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

RESUMO

REGENERAÇÃO SOMÁTICA *IN VITRO* DE CULTIVARES DE ALFACE (*Lactuca sativa* L.) E APLICAÇÃO NO MELHORAMENTO GENÉTICO

Foi definida metodologia adequada de regeneração somática *in vitro* para diversos cultivares comerciais de alface (*Lactuca sativa* L.), a partir de hipocótilos e folhas cotiledonares (tipos proximal e distal), excisados de plantas oriundas de sementes germinadas *in vitro*. Os melhores resultados obtidos através da regeneração de plantas ocorreram com o emprego da dose de 0,1mg/l de 6-BA (6-benzilaminopurina), tanto para hipocótilos como para folhas cotiledonares.

Dentre os explantes testados, o cotiledonar proximal sobressaiu-se, de maneira clara, em relação aos demais.

O estágio de desenvolvimento da plântula, mais adequado para a excisão de explantes cotiledonares, foi o de 3 dias após o início da germinação das sementes (emissão de radícula).

Não ocorreram diferenças significativas entre progênes, originárias de regeneração *in vitro*, dentro de cada cultivar em estudo ("Grand Rapids", "Maravilha-das-quatro-estações" e "Salad Bowl") quanto a diversos caracteres quantitativos (diâmetro, altura e peso de "cabeça"; comprimento e largura de folha basal; número de folhas e comprimento de pendão floral). Entretanto, foram observados vários casos de variabilidade, entre plantas de uma mesma progênie, para alguns caracteres qualitativos (presença/ausência de antocianina; formato e coloração de folha; formação de "cabeça" e outros).

A melhor combinação entre os fitorreguladores 6-BA e IAA quanto à produção de brotos/explante, foi a de 0,1 e 0,5 mg/l.

Estimativas de vários parâmetros genéticos (coeficiente de herdabilidade no sentido amplo; coeficiente de determinação genotípico; ganhos de seleção absoluto e relativo) alcançaram magnitudes variáveis, de acordo com o genótipo e o caráter considerado. Para os caracteres número de folhas e comprimento do pendão floral, os valores obtidos permitem prever o sucesso para o aumento e redução significativos do primeiro e do segundo, respectivamente.

Concluiu-se que a exploração da variação somaclonal pode ser de grande valia em futuros programas de melhoramento genético de alface.

SUMMARY

***IN VITRO* SOMATIC REGENERATION IN LETTUCE (*Lactuca sativa* L.) CULTIVARS AND APPLICATION IN PLANT IMPROVEMENT PROGRAMS**

Proper *in vitro* somatic regeneration methodology has been defined for several lettuce cultivars through hypocotil and cotyledon cultures, excised from *in vitro* germinated seedlings.

For both the explants tested, the best results of plant regeneration have been achieved with 0,1mg/l of 6-BA (6-benzilaminopurine), added to the culture medium.

The proximal portion of the cotyledon-explant has outperformed the distal portion of the same explant, and the hypocotil explant, as to the percentages of explants with somatic organogenesis and mean shoot number per explant.

The best plantlet development stage as to the excision of cotyledon-explants was 3 days after the start of germination.

There have not been significant differences among progenies, derived from *in vitro* somatic regeneration (within the same cultivar) as to several quantitative traits (head diameter, height and weight; basal leaf length and width; number of leaves and floral stem length). However, marked differences have been detected among different individuals in some progenies as to qualitative traits (presence/absence of antocianin in leaves; leaf shape and color; head formation and so on).

The best combination between the two growth regulators tested (IAA and 6-BA) has been 0,5 mg/l and 0,1 mg/l, as to the mean shoot production/explant.

Estimates of several genetic parameters (heritability, in the broad sense; genotypic determination coefficient; absolute and relative genetic gains) have shown high heterogeneity, according to the genotype and trait analyzed. The results for number of leaves and floral stem length have allowed the prediction of successful selection for both in future lettuce breeding.

Under the experimental conditions of this research, somaclonal variation might be successfully used in the selection of new lettuce genetic materials with desirable characters.

I. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é, entre as hortaliças de folha, a mais popular, sendo cultivada em quase todas as regiões do mundo (ZATARIN, 1985). Nesta espécie, são conhecidos seis tipos cultivados: manteiga ("butter-head"), folha crespa ("leaf"), romana ("cos" ou "romaine"), latina ("latin"), repolhuda ou americana ("crisp-head") e talo ("stem") (NAGAI, 1993).

As folhas são amplamente utilizadas na alimentação humana, sendo comuns os estudos sobre o seu comprimento e largura, formato e tamanho das cabeças, e a sua herança, além de outros caracteres (resistência à doenças e pragas, macho-esterilidade, etc.) (OLIVEIRA, 1984).

A preferência do mercado consumidor determina, em grande parte, a escolha do cultivar a ser produzido. Nos Estados Unidos os cultivares mais plantados são os que possuem folhas com nervuras salientes, bem visíveis. Isso porque, naquele país, a hortaliça é consumida picada, tornando secundária a presença de nervuras salientes nas folhas. No Brasil, entretanto, os consumidores tem acentuada preferência pelo tipo "manteiga", ideal para o consumo como folhas intactas em saladas. Esse tipo apresenta folhas oleosas, de bordas lisas e, principalmente, nervuras quase imperceptíveis (PINTO, 1977).

No Brasil, a alface é a sexta hortaliça em importância econômica (valor de produção) e a oitava em termos de volume produzido (NAGAI *et al.*, 1989). Mais de noventa mil toneladas de alface foram comercializadas no sistema CEASA/CEAGESP em 1987. Acredita-se que, desse total, 50 a 60% pertenciam ao tipo "manteiga"; 30 a 40%, ao "folha-crespa" e o restante, aos tipos "romana" e

“repolhuda” ou “americana”. Em décadas anteriores, a preferência pelo tipo “manteiga” era ainda mais acentuada, chegando a 80% da produção total (NAGAI, 1993).

A alface é uma hortaliça de relevante utilidade na alimentação humana, sendo rica em vitaminas e sais minerais. É uma das melhores fontes de cálcio e de vitamina A, além de apresentar teores razoáveis de tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), niacina (vitamina B₃) e ácido ascórbico (vitamina C).

O valor nutricional da alface, medido pelo conteúdo relativo de um grupo de vitaminas e sais minerais, ocupa a 26ª posição entre aqueles de outras hortaliças (brócoli, espinafre, ervilha, couve-flor, repolho, etc.). Todavia, devido ao seu elevado consumo, generalizado em todo o mundo, assume o quarto lugar quanto à contribuição à dieta alimentar humana (RICK, 1978).

Os programas de melhoramento genético da alface no Brasil, baseados na exploração de variabilidade genética resultante de cruzamentos intraespecíficos, e mesmo interespecíficos, visam principalmente a resistência à diversas doenças limitantes à produção (principalmente viroses), tolerância ao calor (ausência de pendoamento precoce) e, mais recentemente, a presença de textura firme de folha, esta apropriada para a confecção de lanches. Outra fonte alternativa de variabilidade genética é a variação denominada somaclonal, oriunda do processo de regeneração somática de plantas *in vitro* o que, apesar de polêmica, tem se mostrado útil em algumas espécies vegetais.

Assim, o objetivo principal desta pesquisa foi o de avaliar, de maneira racional, a viabilidade de utilização da variação somaclonal, resultante do

emprego de culturas de tecidos *in vitro*, em programas de melhoramento genético de alface, utilizando-se cultivares em distribuição comercial no Brasil. Para tanto, foi necessária a definição de metodologia básica de indução e proliferação de calos *in vitro*, de diferenciação de plantas por organogênese somática, de enraizamento e aclimação das plantas obtidas e, finalmente, de avaliação de progênies R_1 (originárias de autofecundação de plantas regeneradas R_0), a nível de campo, quanto a diversos caracteres desejáveis. Simultaneamente, foram estimados, para os caracteres estudados, os coeficientes de herdabilidade no sentido amplo, coeficientes de determinação genotípico e os ganhos de seleção absoluto e relativo.

II. REVISÃO DE LITERATURA

1. Sistemática, Origem e Evolução

A alface pertence à tribo *Cichoreae*, família *Compositae*, com o gênero *Lactuca* apresentando mais de 100 espécies. Neste gênero ocorrem espécies com 8, 9 e 17 pares de cromossomos (**BABCOCK et al.**, 1937).

Lactuca sativa L. forma um grupo com outras três espécies (*L. serriola*, *L. virosa* e *L. saligna*), todas nativas da região do Mar Mediterrâneo, interférteis entre si e apresentando nove pares de cromossomos. Esse grupo parece ter sido isolado de outras espécies de nove cromossomos que existem no gênero *Lactuca*, através de barreiras genéticas.

Estudos arqueológicos demonstraram que a alface foi cultivada, pela primeira vez, pelos egípcios cerca de 4500 A.C. (**LINDQRIST**, 1960) que, todavia, estavam interessados apenas no óleo comestível extraído das sementes (**KEIMER**, 1924). Em época mais recente, a alface espalhou-se rapidamente por toda a região do Mar Mediterrâneo, existindo indicações de que era muito popular nas civilizações grega e romana. Atingiu as Américas com a descoberta do Novo Mundo em 1492, tendo sido relatada como abundante no Haiti, em 1565, e cultivada no Brasil, em 1647.

A origem da alface cultivada é, ainda, incerta. O complexo *sativa-serriola* parece ser extenso, polimórfico e capaz de troca livre de genes, com pouca ou nenhuma redução de fertilidade.

Lactuca sativa pode ter sido derivada diretamente de *L. serriola*, porque quase todos os segregantes encontrados em *L. sativa*, também estão presentes

em *L. serriola*. Entretanto, outras hipóteses, também plausíveis, tem sido levantadas (LINDQRIST, 1960):

- a) Ambas as espécies podem ter se originado de populações híbridas que divergiram em dois grupos, *L. sativa*. (cultivada pelo homem) e *L. serriola* (adaptada a habitats de resíduos deixados pelo homem);
- b) Os ancestrais de *L. sativa* podem ter sido híbridos entre *L. serriola* e uma terceira espécie;
- c) *L. serriola* pode ser um produto de hibridação entre *L. sativa* e outra espécie.

A seleção inconsciente praticada na alface pelo homem primitivo foi dirigida para plantas com inflorescências que retinham mais as sementes, ausência de florescimento precoce ("bolting"), menores conteúdo de látex e tamanho de semente, além de coração compacto e bem formado. Estes caracteres, atualmente, separam as formas cultivadas das selvagens.

Os programas modernos de melhoramento continuam a enfatizar a resistência ao florescimento precoce e crescente resistência à doenças, principalmente ao fungo "downy mildew" (*Bremia lactucae*) e às viroses "mosaico da alface" (Potyvirus) e "vira-cabeça" (Tospovirus), além de tolerância ao calor.

2. Aspectos Botânicos

A alface é uma planta herbácea, muito delicada, com um caule diminuto, não ramificado, ao qual se prendem as folhas. Estas são muito grandes, lisas ou crespas, fechando-se ou não em forma de "cabeça". Sua coloração varia do

verde-amarelado até o verde-escuro, sendo que alguns cultivares apresentam as margens arroxeadas, devido à presença de antocianina.

As raízes são do tipo pivotante, podendo atingir até 60cm de profundidade porém apresentam ramificações delicadas, finas e curtas, explorando apenas os primeiros 25cm de solo. Para efeitos práticos, a alface é considerada uma espécie de raízes densas e superficiais.

Trata-se de planta anual, sendo a fase vegetativa de seu ciclo encerrada quando ocorre o máximo desenvolvimento das suas folhas. A seguir, acontece a emissão de uma haste floral, que alcança até 100cm de altura, terminando por uma inflorescência ramificada, com numerosas flores hermafroditas (**FILGUEIRA, 1982**).

3. Biologia da reprodução

A alface é considerada uma espécie de autofecundação. O estilete cresce bem rápido e ultrapassa as anteras. Assim, ao despontarem na parte externa, os estigmas já se encontram cheios de pólen. Este processo é chamado de cleistogamia, porque a fecundação ocorre antes da extrusão do estigma, dificultando a ocorrência de polinização cruzada.

A inflorescência da alface é uma panícula, constituída de numerosos botões florais ou capítulos. Cada capítulo contém de 10 a 25 flores (florete), que desenvolvem-se simultaneamente. O ovário de cada florete é unilocular, produzindo apenas uma semente. Todos os floretes de um mesmo botão floral abrem-se no mesmo dia, geralmente pela manhã (**PINTO, 1977**).

4. Aspectos genéticos

A alface apresenta inúmeras características que a tornam apropriada para estudos genéticos como, por exemplo, o ciclo precoce, autocompatibilidade, baixa taxa de polinização natural (5%) e número reduzido de cromossomos. Além disso, é possível a execução de elevado número de polinizações controladas na mesma planta enquanto o canteiro de cruzamentos ocupa pequeno espaço. Embora a alface apresente algumas desvantagens para os geneticistas, como a pequena quantidade de sementes produzida em cada polinização e o problema de produção de sementes híbridas sem a contaminação por sementes autofecundadas, estas dificuldades podem ser superadas (ROBINSON *et al.*, 1982).

De acordo com MICHELMORE & EASH (1986) a alface cultivada (*Lactuca sativa*) juntamente com as espécies *L. serriola*, *L. saligna* e *L. virosa*, constituem um grupo com número básico comum de $2n=18$ cromossomos, reprodutivamente isolado das demais espécies. *L. sativa* e *L. serriola* cruzam-se facilmente, originando híbridos com pouca ou nenhuma esterilidade; *L. sativa* pode ser hibridizada com *L. saligna*, porém com maiores dificuldades; cruzamentos entre *L. sativa* e *L. virosa* têm produzido, ocasionalmente, híbridos F_1 estéreis. Como a alface cultivada tem base genética restrita, a compatibilidade em cruzamentos com as espécies selvagens acima mencionadas abre a perspectiva de obtenção de grande número de segregantes desejáveis, particularmente aqueles com resistência às doenças. Por outro lado, polinizações controladas dentro da espécie *L. sativa* podem ser realizadas por vários métodos (RYDER, 1985);

embora alguns procedimentos resultem em, aproximadamente, 100% de sementes híbridas, as sementes autofecundadas obtidas naturalmente não podem ser evitadas.

Nos últimos anos, vários genes têm sido identificados em alface. **ROBINSON et al.** (1982) relataram a existência de 59 genes para a espécie *Lactuca sativa*. Seis deles condicionam a presença de antocianina; 10, de clorofila; 11, afetam a morfologia foliar; 4, a formação de "cabeça"; 7, a morfologia floral e caracteres de sementes; 7, a macho-esterilidade; 1, a sensibilidade a agentes químicos e 13, a resistência às doenças. Também são conhecidos muitos casos de alelos múltiplos e genes ligados. Outros genes têm sido identificados em pesquisas mais recentes, a saber: Ef (florescimento precoce) (parcialmente dominante) **RYDER** (1985); Sm₁ (dominante) e Sm₂ (recessivo) (resistência à mancha de *Stemphylium*) (**NETZER**, 1985); 4 genes de resistência a *Microdochium panottoniana*, agente causador da antracnose da alface (**OCHOA**, 1987); genes Dm13, Dm14, Dm15 e Dm16, de resistência à *Bremia lactucae* (**FARRARA et al.**, 1987); genes Sg (folhas verdes lustrosas), Sa (flores de coloração salmão) e Ag (folhas verdes "apple") (**RYDER**, 1989); gene Dm11, para resistência à *Bremia lactucae* (**LEBEDA**, 1989); genes de ananismo dwf1, dwf2 e dwf3 (**WAYCOTT & TAIZ**, 1991); gene plr de resistência à *Plasmopora lactucae-radicis* (**VANDEMARK**, 1992); gene de resistência ao vírus do mosaico da alface (**PINK**, 1992).

O advento das novas técnicas bioquímicas (eletroforese) e de biologia molecular (RFLP - Restriction fragment length polymorphism; RAPD - Random

amplified polymorphic DNA; PCR - Polymerase chain reaction) tem proporcionado grande progresso em estudos sobre a natureza do genoma em alface. **LANDRY et al.** (1987) construíram um mapa genético de *Lactuca sativa* com 53 marcadores genéticos (41 loci RFLP, 5 genes de resistência *Bremia lactucae*, 4 loci de isoenzimas e 3 marcadores morfológicos). **HULBERT et al.** (1988) realizaram análises genéticas do fungo *Bremia lactucae*, usando RFLP, concluindo que a alta frequência do polimorfismo do DNA em isolados de ocorrência natural e a própria segregação mendeliana detectada dos loci indicam a possibilidade de construção de um mapa genético de *Bremia lactucae* usando RFLPs como marcadores. **WAUGH & POWELL** (1992) discutem o potencial do uso de RAPDs como marcadores, exemplificando com o gene de resistência à *Bremia lactucae* (Dm) em alface. **PARAN et al.** (1991) identificaram marcadores de DNA, RFLPs e RAPDs ligados a genes de resistência ao “downy mildew” em alface, usando linhagens quase isogênicas, concluindo que o rápido “screening” e identificação de marcadores estreitamente ligados a genes-alvo demonstraram o potencial dos marcadores RAPD para o preenchimento de mapas genéticos.

5. Histórico, tendências do melhoramento genético da alface e perspectivas.

Nos Estados Unidos, os cultivares de cabeça crespa tornaram-se dominantes nas primeiras décadas do século XX, após a execução de programas de melhoramento que enfatizaram o tamanho e o peso da “cabeça”, além da capacidade de suportar transporte à longa distância. Posteriormente, em 1941,

foram desenvolvidos os cultivares “Great Lakes”, que mostravam cor, tamanho e peso de “cabeça” adequados, resistência ao florescimento precoce e às principais doenças. Atualmente, a popularidade da alface de “cabeça” crespa tem aumentado, consideravelmente, na Europa Ocidental e Japão.

Atualmente, o principal objetivo dos programas de melhoramento genético de alface, nos países de clima temperado, é a resistência crescente às desordens de pós-colheita. Paralelamente, deve continuar a pesquisa por maiores níveis de resistência à doenças e pragas (RYDER & WHITAKER, 1976). Os primeiros cultivares com resistência ao mosaico, disponíveis no mercado, originaram-se de cruzamentos interespecíficos com *L. serriola*, fonte de resistência àquela doença.

Nos países de clima tropical e subtropical, como o Brasil, existe a preferência acentuada do consumidor por cultivares do tipo “manteiga”, que apresentam folhas lisas, macias, brilhantes e de coloração verde claro.

Tanto nos países de clima temperado como nos tropicais, a base genética dos cultivares modernos de alface é, ainda, bem restrita. Nos primeiros, a maioria dos cultivares de cabeça crespa foram derivados de seleções e cruzamentos de linhagens do cultivar “Great Lakes” (BARROS, 1988), enquanto que nos segundos, os cultivares disponíveis de alface “manteiga” foram resultantes de cruzamentos envolvendo o cultivar “White Boston” (ZATARIN, 1985). Assim, em ambos os casos, cruzamentos interespecíficos são altamente desejáveis, visando ampliar a variabilidade genética disponível na espécie e permitir, posteriormente, a seleção eficiente de novos cultivares com características desejáveis, principalmente, a resistência à doenças.

No Brasil, os principais objetivos dos programas de melhoramento genético da alface têm sido, até o momento, a seleção de novos cultivares com resistência ao espigamento precoce (“bolting”) e tolerância ao calor, além de resistência às principais doenças, como o mosaico e o “vira-cabeça”. O florescimento precoce provoca a ocorrência de gosto amargo nas folhas, depreciando o valor comercial do produto. Altas temperaturas, além de estarem associadas ao florescimento precoce, ocorrem em meses de precipitações pluviométricas intensas, que causam o rasgamento das folhas tenras dos cultivares do tipo “manteiga”, com diminuição significativa da produção.

No início da década de setenta o Instituto Agronômico de Campinas, lançou, comercialmente, o cultivar “Brasil 48”, com resistência ao pendoamento precoce e ao mosaico, resultante do cruzamento entre “Gallega de Inverno” e “White Boston”. Os cultivares “White Boston” e “Sem Rival” serviram como progenitores recorrentes durante os retrocruzamentos (NAGAI, 1979). Posteriormente, foram liberados os cultivares Brasil-202, 203, 221 e “Áurea”, todos resistentes ao pendoamento e ao mosaico (LMV). O cultivar “Floresta”, comercializado pela ASGROW, é originário da série Brasil-300 (do tipo “manteiga”, com boa formação de cabeça), também resistente ao vírus do mosaico da alface.

Dentro da mesma linha de pesquisa, o Instituto de Genética da ESALQ-USP desenvolveu o cultivar “Vivi” e posteriormente a série “Regina”. Em trabalho conjunto com a AGROCERES, a ESALQ desenvolveu os cultivares “Piracicaba 65” e “Regina 71”, resistentes ao pendoamento precoce e, em colaboração com a

AGROFLORA, o cultivar “Regina 440”, com resistência ao pendoamento e ao mosaico. A série “Regina” originou-se do cruzamento da geração F7 (White Boston x Monstruese Ronde d’Eté) com o cultivar “Brasil 48”, fonte de resistência ao vírus do mosaico da alface.

Dentro do grupo crespa sem “cabeça”, a AGROFLORA selecionou o cultivar “Vanessa”, com baixa resistência ao pendoamento precoce mas resistente ao mosaico e a AGROCERES desenvolveu, em 1990, o cultivar “Divina”, com resistência ao pendoamento, coloração verde-escura e peso médio de 500-600g.

A partir de 1986, a AGROFLORA vem desenvolvendo alfaces do tipo “americana” (“AGROFLORA”, “INAJÁ”, e “TAÍNA”). Em 1989, liberou o cultivar de alface lisa “Glória” (F7 - “Áurea” x germoplasma que originou “Regina 440”) e a cultivar de alface crespa “Verônica” (F7 - “Slow Bolting” x “Grand Rapids”).

Atualmente, as tendências dos programas de melhoramento são a de resistência crescente às doenças limitantes à produção (mosaico e “vira-cabeça”), tolerância ao calor e aos danos físicos causados por chuvas intensas, além de resistência estável ao florescimento precoce. Além disso, as alfaces do grupo “manteiga”, são bem menos resistentes ao transporte e tem “vida de prateleira” mais curta do que as do grupo “crespo”. Assim, novos programas devem ser realizados visando estes parâmetros de qualidade de produto, mantendo-se, entretanto, a maciez das folhas.

Por outro lado, foi detectada apenas uma única fonte de genes de resistência ao “vira-cabeça” (introdução PI 342517) que, embora susceptível ao vírus do mosaico comum da alface, pode ser utilizada com vantagens em

programas de melhoramento genético, por apresentar bons caracteres de qualidade de produto (NAGAI, 1989). Outra alternativa para a solução do problema é a exploração da variação somaclonal, originária de cultura de tecidos, tentando-se a obtenção de novos materiais genéticos tolerantes ao patógeno.

6. Variação somaclonal

LARKIN & SCOWCROFT (1981) denominaram de variação somaclonal a variação genética detectada entre plantas regeneradas a partir de cultura de tecidos somáticos *in vitro*.

Segundo SKIRVIN et al. (1993) a variação somaclonal envolve todas as formas de variação encontradas em cultura de tecidos. Tem se mostrado um problema sério na micropropagação *in vitro* quando se deseja elevada uniformidade do produto final. Por outro lado, a variação resultante da cultura de tecidos representa um reservatório de variabilidade, ao qual pode ser imposta pressão de seleção para isolarem-se formas raras de um clone. As origens da variação somaclonal, já exaustivamente estudadas, ainda permanecem contraditórias. Alguns segregantes originários de variação somaclonal têm se mostrado transitórios (epigenéticos), enquanto outros têm se mantido estáveis em repetidas gerações de propagação assexual. Alguns destes, após processo seletivo, tem sido lançados comercialmente, como novos cultivares (alho, batata, banana, cana-de-açúcar, etc.)

A quantidade de variabilidade resultante da cultura de tecidos depende do clone e da sua idade, do uso de agentes mutagênicos e da intensidade de

seleção, aplicada a células individuais (presença de salinidade elevada, presença de herbicidas, microrganismos ou seus produtos e metabólitos específicos).

Segundo **PHILLIPS** (1990), a cultura de tecidos é claramente um processo mutagênico. Provavelmente, todas as formas de eventos mutacionais que ocorrem na natureza também acontecem em células de tecidos cultivados. Entretanto, certos eventos (mutações de um único gene; ativação de transposons; alterações numéricas e estruturais dos cromossomos) parecem ocorrer em frequências excessivamente altas em culturas de tecidos vegetais. Variações de frequência das mesmas tem sido observadas parecendo depender da espécie, genótipo, fonte de explante e meio de cultura utilizados. O autor defende a hipótese de que os vários eventos mutacionais estão direta ou indiretamente relacionados à modificações do DNA (hipo/hipermetilação). Isso porque a metilação do DNA parece ter um efeito importante na regulação da expressão gênica em organismos superiores, consistindo na ligação do grupo metil com a base nitrogenada citosina, formando 5-metilcitosina. O seu efeito é devido à interferência que o grupo metil pode ocasionar na interação DNA x proteína. Supostamente, existem fatores específicos para a transcrição protéica que reconhecem seqüências metiladas e não metiladas e que interagem com a RNA polimerase (**HOLIDAY**, 1987). A metilação inibe a interação DNA x proteína, e conseqüentemente, impede a transcrição do gene. Uma vez metilada, uma seqüência nucleotídica pode ser mantida no estado inativo durante todo o desenvolvimento do organismo ou até mesmo por várias gerações posteriores (**BRANQUINHO**, 1993).

6.1 Fatores que afetam a ocorrência e a frequência da variação somaclonal em plantas

EVANS & SHARP (1986), SILVAROLLA (1987) e PESCHKE & PHILLIPS (1992) fizeram revisões detalhadas sobre os fatores que determinam a ocorrência e a frequência da variação somaclonal em espécies vegetais, a saber: condições bióticas (genótipo; tipo, posição, tamanho e idade do explante; estágio fenológico e fisiológico da planta doadora) e condições abióticas (meio de cultura, duração da cultura, fotoperíodo e temperatura). Segundo **PESCHKE & PHILLIPS (1992)**, a influência do genótipo na frequência da variação somaclonal é devida a dois fatores: variação pre-existente e diferenças varietais. A variação pre-existente implica a ocorrência de polissomatismo, que é a coexistência de células diplóides e poliplóides no mesmo tecido; essa condição pode ser encontrada em cerca de 90% das espécies vegetais (**D'AMATO, 1952; 1985**). Por outro lado, **SILVAROLLA (1987)** sugere que, em cana-de-açúcar, diferentes genótipos apresentam diferentes frequências de variação somaclonal. Da mesma forma, **PUNIA et al. (1993)**, trabalhando com explantes cotiledonares de diferentes genótipos de *Brassica juncea*, *B. carinata* e *B. napus*, observaram variações nas frequências de regeneração de plantas. Os mais favoráveis à regeneração foram os genótipos das espécies *B. carinata* e *B. napus*. O tipo de explante constitui-se um fator muito importante para a regeneração de plantas *in vitro* e conseqüente ocorrência de variação somaclonal. De acordo com **PESCHKE & PHILLIPS (1992)**, explantes originários de fontes diferentes apresentam diferentes

resultados quanto à regeneração de plantas e posterior constatação de variação somaclonal entre elas. Duas generalizações podem ser feitas:

a) meristemas cultivados sem um estágio prévio de desdiferenciação produziram pouca ou nenhuma variação somaclonal entre as plantas resultantes quando comparados com aqueles onde o estágio de desdiferenciação foi induzido (**KARP & BRIGHT, 1985; D'AMATO, 1985; POTTER & JONES, 1991**).

b) diferenças de variação genética entre plantas regeneradas *in vitro*, originárias de diferentes fontes de explante, podem ser atribuídas à variabilidade preexistente nos explantes. O caso mais conhecido dessa ocorrência é o polissomatismo.

O efeito de posição do explante foi relatado por **KATHAL et al.** (1994) em trabalho de regeneração de plantas a partir de calos derivados de explantes de raiz de diferentes idades (5, 7, 14, 21, 25 e 28 dias) e de diferentes regiões da raiz principal (basal, sub-basal, sub-apical e apical) de *Cucumis melo L. cv. Puramarbati*. Concluíram que o segmento de raiz basal apresentou a máxima formação de nódulos (91,3%) e a frequência de regeneração diminuiu do segmento basal para o apical. Além do efeito de posição, os autores observaram também que plântulas com 21 dias responderam melhor ao crescimento de calos (100%) e formação de nódulos (83%).

O estágio fisiológico (idade) do explante também é um fator que deve ser levado em consideração. **COMPTON & GRAY, 1994**, pesquisaram a ocorrência de organogênese de brotos adventícios e regeneração de plantas em quatro linhagens de *Citrullus lunatus*, em explantes oriundos de cotilédones, sementes

maduras e plântulas de 2, 4, 6, 8 e 10 dias de idade. Concluíram que o número de brotos produzidos por explantes depende do estágio fisiológico. Explantes de plântulas com 2 e 4 dias de idade produziram as maiores quantidades de brotos enquanto que os derivados de plântulas com mais de 4 dias de idade e de sementes tiveram as menores proliferações de brotos.

As condições de cultura, juntamente com fatores externos (fotoperíodo e temperatura), também são muito importantes para a ocorrência e frequência da variação somaclonal. Atuam nos mecanismos de regulação gênica, ativando e/ou desativando complexos gênicos, e até mesmo, produzindo alterações nos genomas.

Os reguladores de crescimento exógenos são os agentes responsáveis pela iniciação e/ou indução de calos, brotos, raízes e pelo desenvolvimento dos mesmos. Dentre eles, as auxinas e citocininas exercem importante papel na morfogênese em culturas de tecidos vegetais. Determinadas concentrações de auxinas e citocininas promovem a regeneração de plantas completas, outras somente de brotos, ainda outras somente de raízes, além de ocorrerem casos em que só é observada a indução de calos, não havendo diferenciação. **BRAGA & DIETRICH** (1985) afirmam que os hormônios podem agir sobre os tecidos vegetais provocando alterações físicas em estruturas celulares ou interferindo em processos metabólicos específicos como, por exemplo, alterando a síntese e a atividade de enzimas.

Existem inúmeros relatos de variações observadas em culturas de longa duração, com uma correlação positiva entre a frequência das variações observadas e o tempo de duração da cultura.

HANG & BREGITZER (1993) relataram variações em embriões imaturos, derivados de calos de seis cultivares de *Hordeum vulgare* e concluíram que a regeneração de plantas diminui e o número de aberrações citogenéticas aumenta com a duração da cultura. **JOACHIMIAK et al.** (1993) realizaram estudos cromossômicos em culturas de longa duração de 3 espécies de *Allium*: *A. porrum* ($2n=32$), *A. tuberosum* ($2n=32$) e *A. fistulosum* ($2n=16$), concluindo que a espécie *A. fistulosum* pode ser um excelente sistema-modelo para analisar aspectos citogenéticos e moleculares de alterações genômicas induzidas em calos e, portanto, variação somaclonal. Deve ser mencionado ainda que, embora as culturas de células possam conter muitas células anormais, a regeneração age como um crivo, reduzindo a frequência de plantas anormais (**SILVAROLLA**, 1987).

Dois processos diferentes de regeneração podem ocorrer após a fase de desdiferenciação: organogênese somática (formação de raízes ou brotos a partir de regiões meristemáticas) ou embriogênese somática (formação de embriões somáticos, que “germinam”) (**SPRINGER, et al.**, 1979). Estudos histológicos e análises genéticas nos variantes produzidos tem demonstrado que a organogênese é, geralmente, de origem multicelular. Em contraste, na embriogênese somática, o embrióide é, frequentemente, derivado de uma única célula, embora algumas evidências de origem multicelular estejam disponíveis

(PESCHKE & PHILLIPS, 1992). Em adição, alguns autores tem relatado que plantas regeneradas a partir de embrióides somáticos devem conter menos mutações que aquelas regeneradas via organogênese somática, presumivelmente devido às necessidades genéticas mais rigorosas impostas pela formação de embriões (SWEDUM & VASIL, 1985).

6.2. Variação somaclonal em espécies vegetais

A ocorrência de variação somaclonal em espécies vegetais vem sendo muito estudada nos últimos anos. Em seguida, é apresentada uma pequena amostra de resultados obtidos por diferentes autores em diferentes espécies vegetais:

SITA (1991) realizou estudos com cultura de tecidos de *Santalum albiun* visando a seleção de genótipos superiores, livres de doenças. As plantas resultantes cresceram 3 metros em 2 anos, em comparação com 20-30 centímetros esperados em plantas normais. Assim o autor sugere que é possível antecipar o período de colheita de 50 para 20 anos.

CHENG et al. (1992) regeneraram plantas a partir de cultura de embriões imaturos de 35 genótipos de trigo de inverno. Dos 134 variantes selecionados, cerca de 70% foram classificados como herdáveis. A segregação observada tornou evidente a presença de mutações gênicas recessivas e dominantes, em 2 ou 3 loci.

Em centeio, LINACERO & VAZQUEZ (1992), realizaram análises genéticas de variantes somaclonais, deficientes em clorofila, a partir de calos de embriões

imaturos de quatro cultivares enquanto **AMBERGER et al.** (1992) obtiveram fenótipos de soja, não relatados anteriormente, com potencial para permitir melhor compreensão do genoma da espécie. Na mesma linha de pesquisa, **RAO et al.** (1992) estudaram o emprego da variação somaclonal como fonte de novos genótipos de *Stylosanthes guianensis* adaptados a solos ácidos, concluindo que o processo pode ter sucesso no futuro. Entretanto, resultados contrários foram relatados por **DAVIES & COHEN** (1992), estudando a variabilidade fenotípica entre somaclones de *Paspalum dilatatum*, concluindo que pouca ou nenhuma da variação observada seria de utilidade em um programa de melhoramento genético.

Alguns trabalhos a respeito do assunto concluíram favoravelmente sobre a exploração de variação somaclonal em programa de melhoramento genético. **JAIN** (1993) observou diferenças significativas na morfologia e tamanho das flores, altura de planta e número de flores por planta entre somaclones de *Begonia x Elatior*, regenerados a partir de calos de discos de folhas. No mesmo trabalho é relatada a ocorrência de variação somaclonal em *Saintpaulia ionantha* quanto ao número de flores por planta, tamanho da flor e número de pétalas por flor. **WATTANASIRI et al.** (1993) estudaram a regeneração de plantas e variação somaclonal resultante em *Bromus inermis*, concluindo que a variabilidade observada nos somaclones obtidos pode permitir a seleção daqueles com caracteres agrônômicos desejáveis. Outros estudos relatam o emprego de marcadores moleculares RAPD para avaliar a estabilidade genética de somaclones (**ISABEL et al.**, 1993), análises moleculares, através de RFLP, de

culturas embriogênicas de cana-de-açúcar (**CHOWDHURY & VASIL**, 1993) e análises estruturais de DNA de plantas regeneradas de beterraba (**DIKALOVA et al.**, 1993). **KAEPLER & PHILLIPS** (1993) estudaram a variação da metilação do DNA induzida por cultura de tecidos, e os resultados evidenciaram que a ocorrência da dimetilação em uma alta frequência, poderia ser uma causa importante da variação induzida por cultura de tecidos.

Assim, a exploração da variação somaclonal com fins de melhoramento genético depende, em grande parte, da espécie vegetal estudada.

6.3. Variação somaclonal em alface

SIBI (1976) obteve variantes somaclonais, através de cultura de tecidos *in vitro*, do cultivar de alface "Val d'Orge". As plantas P_0 apresentaram formatos diferentes, quando comparadas com as do cultivar original, com o mesmo número de cromossomos, sendo denominadas de fenovariantes. As famílias P_1 , originárias de autofecundação das plantas P_0 , cultivadas em condições normais, mostraram indivíduos segregantes com variações no peso, comprimento e espessura das folhas; na quantidade de gemas axilares desenvolvidas e no formato e coloração de folhas. Gerações avançadas (famílias P_2 , P_3 e P_4), também originárias de autofecundação, mostraram estabilidade para alguns dos caracteres estudados e variabilidade, para outros.

A mesma autora (**SIBI**, 1984) comparou progênies de plantas de alface regeneradas *in vitro* e progênies originárias de autofecundação das plantas regeneradas. Observou, nas primeiras, a ocorrência de rearranjos

cromossômicos e, nas últimas, a presença de interações entre fatores genéticos e epigenéticos. Em condições particulares, as interações citadas mantiveram-se estáveis em gerações posteriores.

Variabilidade significativa entre protoclonos de alface (regeneração a partir de protoplastos) quanto à tolerância a estresses fisiológicos foi relatada por **SECOR** (1983) enquanto **ENGLER & GROGAN**, 1984, observaram a ocorrência de mutações nucleares recessivas em plantas individuais, também regeneradas a partir de protoplastos.

A ocorrência de variação somaclonal marcante em plantas de alface, regeneradas a partir de calos originários de explantes citoledonares, foi verificada por **BROWN et al.** (1986). No estágio de "seedling" foram detectadas várias mutações (vigor reduzido, albinismo, baixos teores de clorofila, etc.), a maior parte delas sendo recessivas; em plantas imaturas, observaram-se variações no formato de folha e no vigor. Uma das linhagens estudadas apresentou aumento no conteúdo de clorofila, florescimento precoce e reduzida suscetibilidade ao vírus do mosaico e à *Bremia lactucae* (agente causal do míldio da alface). Cabe salientar que todas as linhagens avaliadas eram diplóides.

Trabalhando com número elevado de cultivares de alface, com os quatro tipos morfológicos principais representados, **ZHANG & CONNER** (1992) relataram marcantes diferenças genotípicas quanto às respostas de cotilédones, em desenvolvimento, aos meios de cultura de indução de calos e de regeneração de plantas.

Conforme observado acima, a ocorrência de variação somaclonal é muito comum em alface embora o seu emprego como fonte de variabilidade para programas de melhoramento genético, visando a seleção de novos cultivares com caracteres agronômicos e de qualidade de produto desejáveis, ainda esteja em fase incipiente.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Material genético

Neste trabalho de pesquisa foram utilizados 10 cultivares de alface, pertencentes aos seguintes grupos agronômicos:

a) Grupo “lisa ou manteiga”, com formação de “cabeça”: “White Boston”, “Brasil-48”, “Brasil-303” e “Maravilha-das-quatro-estações”;

b) Grupo “lisa ou manteiga”, com “cabeça” pouco compacta ou sem formação de “cabeça”: “Babá”;

c) Grupo “repolhuda crespa”, com formação de “cabeça”: “Great Lakes” e “Regina”;

d) Grupo “solta crespa”, sem formação de “cabeça”: “Grand Rapids” e “Salad Bowl”;

e) Grupo “romana”: “Romana Ballon”.

2. Metodologia

2.1. Fase de Laboratório

Os explantes utilizados nos experimentos, relatados a seguir, foram folhas cotiledonares (Figura 1-C) e hipocótilos, excisados de plantas originárias de sementes germinadas *in vitro* (Figura 1-A e B).

2.1.1. Desinfestação prévia de sementes

Sementes dos cultivares “Brasil-303”, “White-Boston” e “Great Lakes” foram avaliadas, em experimento fatorial com delineamento experimental

FIGURA 1

A - Sementes de alface previamente desinfestadas, colocadas em placa de Petri contendo ágar-água, visando a germinação das mesmas;

B - Plântulas de alface recém-germinadas, em placa de Petri, cujos hipocótilos e/ou cotilédones foram excisados para a obtenção dos explantes;

C - Explantes cotiledonares proximais (2 linhas à esquerda) e distais (2 linhas à direita), colocados em placa de Petri contendo meio de cultura, visando a organogênese somática;

D - Explantes cotiledonares proximais (2 linhas inferiores) e distais (2 linhas superiores), apresentando organogênese somática;

E - Plantas de alface individualizadas, colocadas em meio de cultura, visando o seu desenvolvimento e enraizamento;

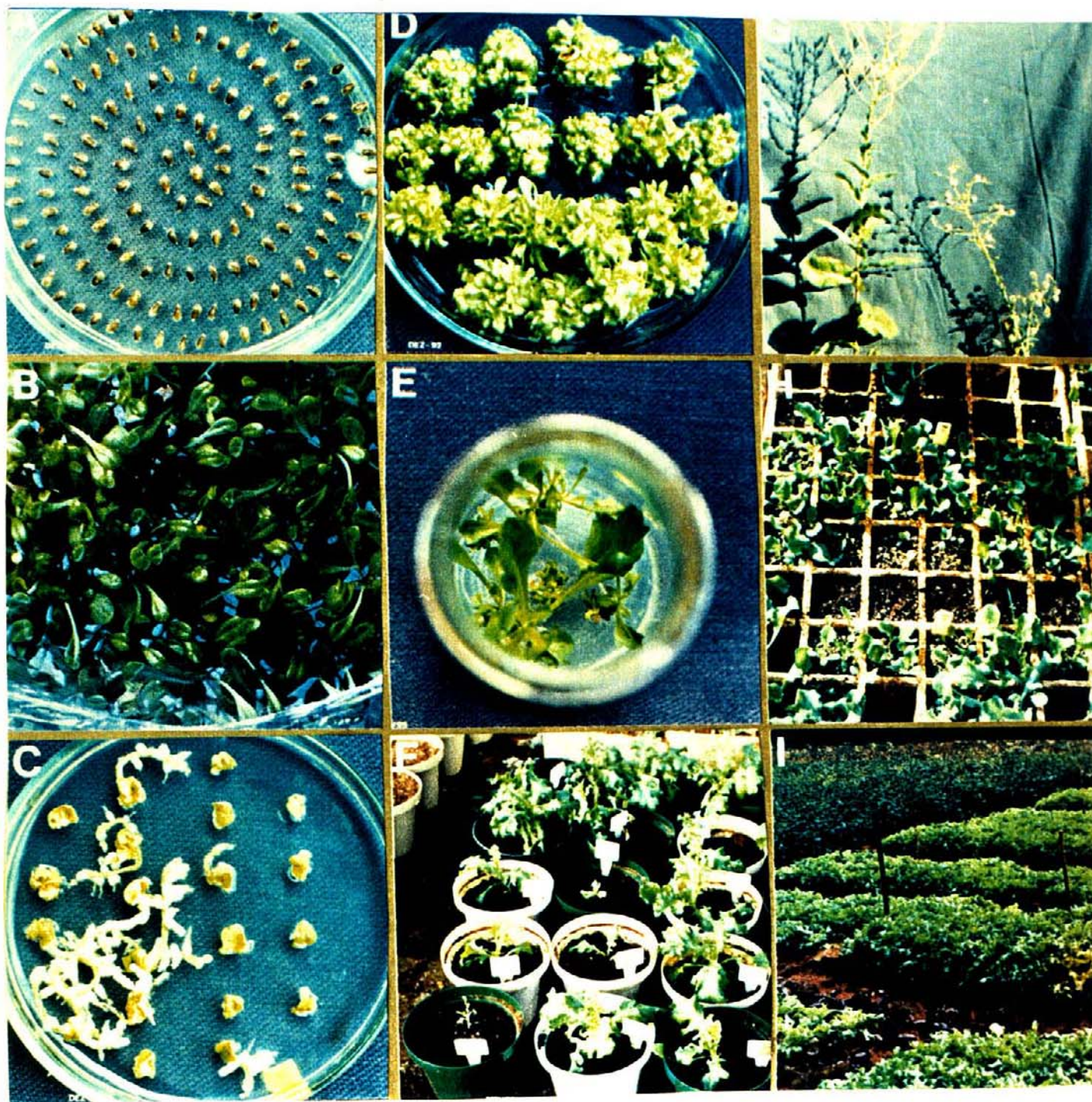
F - Aclimação de plantas de alface regeneradas *in vitro*, em vasos com substrato orgânico-mineral;

G - Plantas de alface regeneradas *in vitro*, em bandeja de isopor com substrato orgânico-mineral;

H - Produção de mudas de progênie de plantas de alface regeneradas *in vitro*;

I - Vista geral de ensaio de campo do cultivar "Salad Bowl".

FIGURA 1



inteiramente casualizado com 4 repetições, quanto à desinfestação por fungos e bactérias, produzida pelos seguintes tratamentos:

a) imersão em álcool 96%, por 1 minuto, seguida de imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% (QBoa), por 15 minutos;

b) imersão em álcool 96%, por 1 minuto, seguida de imersão em hipoclorito de sódio a 2,5%, por 30 minutos;

c) imersão em álcool 96%, por 1 minuto, seguida de imersão em hipoclorito de sódio a 1,25%, por 30 minutos;

Após a desinfestação, as sementes foram lavadas 3 vezes em água deionizada estéril e colocadas em frascos contendo ágar-água. A transferência das sementes para os frascos foi feita sob condições assépticas (câmara de fluxo laminar). A parcela experimental foi constituída de 5 frascos, cada um com seis sementes. Em seguida, os frascos foram mantidos em sala de cultura à temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, intensidade luminosa de 3000 lux e fotoperíodo de 14 horas de luz, sendo a avaliação da contaminação efetuada uma semana depois.

2.1.2. Testes de germinação das sementes desinfestadas

2.1.2.1. Germinação *in vitro*

Testes de germinação preliminares mostraram irregularidade de germinação das sementes, devida à dormência e/ou diferenças de vigor. Assim, antes das sementes serem germinadas *in vitro*, elas sofreram estratificação para quebra de dormência (5 a 7°C , por 72 horas), após colocação das mesmas em placas de Petri, contendo ágar-água.

A taxa de germinação de sementes *in vitro* foi determinada para 5 cultivares ("White Boston", "Romana Ballon", "Brasil-303", "Grand Rapids" e "Great Lakes"), em experimento fatorial com delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições, empregando-se os seguintes meios de cultura sólidos:

a) Ágar-água;

b) Metade das concentrações de vitaminas e sais minerais do meio de cultura de **MURASHIGE & SKOOG (MS)** (1962);

c) Meio de cultura de **HOAGLAND** (1950);

A parcela experimental foi constituída de um frasco, com 35 ml do meio de cultura, com 4 sementes. Estas sofreram desinfestação prévia em álcool 96° (1minuto) seguida de imersão em hipoclorito de sódio 2,5% (15 minutos) e colocação nos frascos, sob câmara de fluxo laminar. Os frascos foram, então, colocados em sala de cultura a 25+/-3°C, em fotoperíodo de 14 horas de luz e avaliação feita 7 dias após o início do teste.

2.1.2.2. Germinação convencional

Os mesmos cultivares de alface testados quanto à germinação *in vitro* foram avaliados em teste padrão de germinação, seguindo normas internacionais (**BRASIL**, 1992). As sementes dos mesmos foram colocadas em caixas de plástico tipo GERBOX, contendo papel de filtro embebido em água destilada. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 4 repetições, sendo a parcela experimental constituída por uma caixa GERBOX com 100 sementes. O critério utilizado para avaliação da germinação das sementes

foi o início de protusão da radícula. O experimento foi conduzido em laboratório à temperatura de $\pm 20^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 8 horas de luz e a avaliação final efetuada aos 7 dias após o início do mesmo.

2.1.3. Indução de organogênese somática

2.1.3.1. Utilização de hipocótilos como fontes de explantes

a) Indução de calos:

Hipocótilos dos cultivares “Great Lakes”, “Romana Ballon” e “Maravilha-das-quatro-estações” foram colocados em frascos contendo os seguintes meios de cultura: H_1 = MS completo + 0,1 mg/l 2,4D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) + 0,1 mg/l de cinetina e H_2 = MS completo + 0,1 mg/l de 2,4D + 0,5 mg/l de cinetina (SASAKI, 1982), ambos acrescidos de 30g/l de sacarose e 6g/l de ágar. Previamente, os explantes foram desinfestados por imersão em álcool (1 minuto), seguida de imersão em hipoclorito de sódio 2,5% (15 minutos) e sucessivas lavagens com água destilada estéril. Os frascos foram, então, colocados em sala escura, por um período de 7 dias.

b) Regeneração de plântulas

b₁) Efeito da cinetina

Dois meios de cultura foram testados nesta fase, a saber: H_3 = MS completo + 0,1 mg/l de cinetina e H_4 = MS completo + 0,5 mg/l de cinetina (SASAKI, 1982), ambos acrescidos de 30g/l de sacarose e 6g/l de ágar. Foi feita a transferência asséptica dos hipocótilos para frascos contendo os meios de cultura citados e, a seguir, os mesmos foram colocados em sala de cultura à

temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, sob intensidade luminosa de 3000 lux e fotoperíodo de 14 horas de luz. Aos 30 dias, os explantes foram avaliados quanto à presença/ausência de calos (escala de notas de 1 a 4, onde: 1 = ausência de calo; 2 = calo pequeno, na periferia do explante; 3 = calo bem desenvolvido, com explante ainda visível; 4 = calo bem desenvolvido, cobrindo totalmente o explante), ocorrência ou não de morfogenêse, número e estágio de desenvolvimento dos brotos.

O mesmo tipo de delineamento experimental (inteiramente casualizado, com 20 repetições), em fatorial, foi empregado em ambas as fases, sendo a parcela experimental constituída de um frasco, contendo um único explante.

b₂) Efeito de 6-BA (6 benzilaminopurina):

O meio de cultura básico empregado foi o MS completo, acrescido de 5,0 mg/l de IAA (ácido indolacético) (DOERSCHUG & MILLER, 1967). Foram testadas 5 doses de 6BA (0,1; 0,3; 0,5; 0,7 e 1,0 mg/l) (WEBB *et al.*, 1984) em hipocótilos dos cultivares “Maravilha-das-quatro-estações” e “Salad Bowl”, em experimento fatorial em delineamento experimental em blocos ao acaso com 3 repetições, com parcela experimental constituída por uma placa de Petri contendo 10 explantes. Adicionalmente, determinou-se a concentração ótima do fitoregulador através de regressão polinomial dos dados obtidos.

A quebra de dormência das sementes, a desinfestação das mesmas, os processos de indução e regeneração de calos, avaliação dos calos e brotos obtidos e as condições ambientes foram semelhantes às utilizadas para a cinetina, anteriormente relatadas.

2.1.3.2. Utilização de folhas cotiledonares como fontes de explantes

Nesse caso, os meios de cultura empregados, abaixo detalhados, foram os mesmos para as fases de indução de calos e regeneração de plantas. Consistiram do meio de MS completo, acrescido de 30g/l de sacarose e 6g/l de ágar, com as seguintes doses de fitoreguladores:

a) Meio de cultura 1: 5,0mg/l de IAA + 0,5 mg/l de cinetina (**DOERSCHUG & MILLER**, 1967);

b) Meio de cultura 2: 5,0mg/l de IAA + 0,5 mg/l de 6-BA + 40mg/l de adenina (**WEBB et al.**, 1984, modificado);

c) Meio de cultura 3: 5,0mg/l de IAA + 0,5mg/l de 6-BA (**WEBB et al.**, 1984).

Cinco cultivares ("Grand Rapids", "White Boston", "Brasil-48", "Brasil-221 e "Brasil-304") foram avaliados quanto à indução de calos e regeneração de plantas nos 3 meios de cultura citados, em experimento fatorial em delineamento experimental em blocos ao acaso com 4 repetições. As sementes dos mesmos sofreram o mesmo tratamento de quebra de dormência e desinfestação empregado para o caso dos hipocótilos, sendo a seguir colocadas em placas de Petri contendo ágar-água. Quatro dias após o início da germinação (**WEBB et al.**, 1984) as folhas cotiledonares foram cortadas transversalmente, com a obtenção de dois tipos de explante: proximal (próximo ao pecíolo) e distal. A parcela experimental foi constituída por uma placa de Petri, onde foram inoculados 10 explantes de cada tipo. Aos 14 dias de cultura, os explantes sofreram a primeira repicagem para os mesmos meios de cultura e, aos 30 dias, foram avaliados

quanto à presença e desenvolvimento dos calos (escala de notas de 1 a 6, sendo: 1 = ausência de calos; 2= calo pequeno na periferia do explante; 3 = calo mais desenvolvido, com explante mais visível; 4 = calo bem desenvolvido, envolvendo todo o explante; 5 = calo pouco visível, quase totalmente envolvido por organogênese; 6 = calo totalmente envolvido por organogênese) e ocorrência ou não de morfogênese.

Duas semanas após a avaliação, os explantes foram novamente repicados para os mesmos meios de cultura visando o desenvolvimento e individualização dos brotos. O enraizamento dos mesmos foi conseguido com a transferência para meio de cultura contendo MS completo + 30g/l de sacarose + 3g/l de ágar (BROWN *et al.*, 1986).

Com a observação de diferentes respostas aos dois tipos de explantes originários de folhas cotiledonares (proximal e distal) em diversos cultivares de alface, tentou-se identificar a concentração ótima do fitorregulador 6-BA, através de regressão polinomial, a partir de resultados obtidos em experimento em blocos ao acaso, com 4 repetições, em 2 tipos de explantes cotiledonares (proximal e distal) excísados, assepticamente, do cultivar "Maravilha-das-quatro-estações" e cultivados em 5 meios de cultura, a saber:

d) Meio de cultura 4: MS completo + 30g/l de sacarose + 6g/l de ágar + 5,0mg/l de IAA = Meio básico + 0,1mg/l de 6-BA;

e) Meio de cultura 5: Meio básico + 0,3mg/l de 6-BA;

f) Meio de cultura 6: Meio básico + 0,5mg/l de 6-BA;

g) Meio de cultura 7: Meio básico + 0,7mg/l de 6-BA;

h) Meio de cultura 8: Meio básico + 1,0mg/l de 6-BA.

Neste experimento foram avaliados os caracteres porcentagem de explantes com organogênese e número de brotos/explante, aos 30 dias.

Em experimentos idênticos ao anterior, foram posteriormente avaliados os cultivares “Grand Rapids”, “Salad Bowl” e “Brasil-303”.

Outros cultivares (“Regina”, “Glória”, “Great Lakes”, “Babá”, “Brasil-48” e “White Boston”), foram também avaliados em três meios de cultura (Meio básico anterior - MB + zero de 6-BA; MB + 0,1mg/l de 6-BA e MB + 0,3mg/l de 6-BA) para se confirmar a superioridade da concentração de 0,1mg/l de 6-BA, quanto a organogênese somática, além de se testar o efeito de ausência do fitorregulador (meio controle).

Para se conhecer os efeitos das interações entre 5 estádios de desenvolvimento do explante (3, 4, 5, 6 e 7 dias após a germinação das sementes) e 2 tipos de explante (proximal e distal) na organogênese somática, o cultivar “Brasil-303”, por ser comercialmente importante foi avaliado em experimento em blocos ao acaso, com 5 repetições, sendo a parcela experimental constituída de uma placa de Petri contendo 5 explantes de cada tipo. O meio de cultura utilizado foi o de MS completo + 30g/l de sacarose + 6g/l de ágar + 5,0mg/l de IAA + 0,1 mg/l de 6-BA.

Finalmente, o cultivar “Brasil-303” foi avaliado, quanto ao número de brotos produzidos/explante, em fatorial com delineamento experimental de blocos ao acaso, com 3 repetições, para testar os efeitos das combinações possíveis entre 3 concentrações de IAA (2,5; 5,0; 7,5mg/l) e 6 concentrações de 6-BA (zero; 0,025;

0,05; 0,1; 0,3; 0,5mg/l). A parcela experimental foi constituída de 10 explantes proximais e 10 distais, colocados em uma única placa de Petri. O meio básico foi o MS completo acrescido de 30g/l de sacarose e 6g/l de ágar, e avaliação foi realizada aos 21 dias.

As análises estatísticas dos resultados obtidos para todos os experimentos da fase de laboratório, foram realizados em microcomputador, com o emprego do programa SANEST. Os resultados de porcentagem foram previamente transformados em $\arcsin \sqrt{x\%}$ e os de contagens, em $\sqrt{x} + 0,5$.

2.2. Fase de casa-de-vegetação

Os cultivares “Maravilha-das-quatro-estações” (grupo “lisa ou manteiga”), “Grand Rapids” (grupo “crespa”) e “Salad Bowl” (grupo “folha”) foram os escolhidos, por sua importância comercial, para terem seus indivíduos, obtidos *in vitro*, através de organogênese somática, aclimatados em casa-de-vegetação, para posterior colheita de sementes e testes de suas progênies (Figura 1-E e F).

Para a otimização das condições de aclimação, três substratos foram testados, a saber:

- a) Vermiculita autoclavada a 120°C e uma atmosfera de pressão por 20 minutos, à qual adicionou-se água deionizada estéril, em copos plásticos;
- b) Vermiculita autoclavada a 120°C e uma atmosfera de pressão por 20 minutos, à qual adicionou-se solução de Hoagland, em copos plásticos;
- c) Solo comum acrescido de matéria orgânica (esterco de curral curtido), em vasos.

Inicialmente, os frascos de vidro, contendo as plantas regeneradas *in vitro*, tiveram as tampas plásticas perfuradas no dia anterior ao da transferência para os recipientes acima citados, em casa-de-vegetação. Em seguida, as plantas foram cuidadosamente colocadas nos três substratos, com prévia instalação de uma estrutura de plástico sob a qual foram postos os copos plásticos e vasos. Água deionizada estéril foi, com frequência, borrifada no interior da estrutura para manter elevada a umidade relativa do ar (câmara úmida) e evitar a morte prematura das plantas por ressecamento.

Após a aclimação das plantas R_0 , estas foram mantidas de maneira tradicional, com regas diárias, aplicação de adubos minerais e de defensivos, quando necessária, até a fase de florescimento e maturação de sementes (Figura 1-G). Estas foram colhidas, no momento adequado, após a prévia colocação de sacos de papel nas inflorescências de plantas individuais.

Para a obtenção das progênes R_1 , as sementes colhidas foram semeadas em bandejas de isopor modelo Plantágil, com 128 células cada uma, contendo substrato orgânico mineral constituído de solo, areia e esterco de curral curtido, na proporção de 3:1:1 (Figura 1-H). O solo foi previamente analisado em laboratório e acrescido de corretivo (Minercal) e adubo mineral (superfosfato simples), de acordo com as recomendações da análise.

Três semanas após a germinação, os indivíduos das progênes foram retirados das bandejas e cuidadosamente transplantados no campo.

2.3. Fase de Campo

Utilizou-se o delineamento experimental de blocos completos aumentados (MALUF *et al.*, 1983) em virtude da impossibilidade de avaliação, com repetições, do número relativamente grande de progênies R_1 obtidas (52, no total). O delineamento citado permite o teste de cada uma das progênies, sem repetição, em comparação com controles intercalares. Estes, no caso, foram os cultivares originais.

Instalaram-se 3 experimentos de campo, um para cada cultivar em estudo ("Maravilha-das-quatro-estações"; "Grand Rapids" e "Salad Bowl"). Cada experimento consistiu de 3 blocos, onde foram distribuídas, ao acaso, as progênies R_1 dos cultivares, juntas com o cultivar original (controle intercalar) em cada bloco (Figura 1-I).

A parcela experimental foi constituída de 40 indivíduos de cada progênie R_1 (4 linhas de 10 plantas), sendo utilizados os espaçamentos de 25cm entre linhas e de 25cm entre plantas (dentro da linha).

No estágio vegetativo, todos os indivíduos das progênies R_1 foram avaliados quanto a diversos caracteres quantitativos (altura e diâmetro de "cabeça"; número, comprimento e largura de folha) e qualitativos (coloração, tipo de borda e presença/ausência de nervuras nas folhas; aspecto de "cabeça").

Por ocasião da colheita, foi medido o comprimento do pedúnculo floral e pesada a "cabeça" colhida.

As análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas em microcomputador, com o emprego do programa MAPGEN (delineamento de blocos completos aumentados - experimentos de campo).

Foram estimados, para os caracteres quantitativos estudados nos 3 cultivares, os seguintes parâmetros genético-estatísticos: coeficiente de herdabilidade (H^2), no sentido amplo; coeficiente de determinação genotípico (b) e os ganhos de seleção absoluto (G_s) e relativo ($G_s\%$).

O modelo genético-estatístico utilizado foi um modelo misto, onde os efeitos de controles intercalares foram considerados fixos e os das progênies R_1 (tratamentos) como aleatórios, como se segue:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + e_{ij}, \text{ onde}$$

$i = 1, 2, \dots, I$ tratamentos (controles intercalares e progênies);

$j = 1, 2, \dots, J$ blocos;

μ = média geral (fixa);

α_1, α_2 = efeitos fixos dos controles intercalares;

$\alpha_i, i = 1, 2$ efeito aleatório do $i^{\text{ésimo}}$ tratamento (progênies R_1), no $j^{\text{ésimo}}$ bloco;

β_j = efeito aleatório do $j^{\text{ésimo}}$ bloco;

e_{ij} = efeito experimental (aleatório).

Após isolamento e cálculo da variância genética (s^2_G) e da variância ambiental (s^2_E), a partir das esperanças matemáticas das somas de quadrados do modelo empregado, foi calculado o coeficiente de herdabilidade (H^2), no sentido

amplo, para cada caráter quantitativo em estudo, segundo a fórmula seguinte:

$$H^2 = \frac{\sigma^2_G}{\sigma^2_G + \sigma^2_E}$$

A seguir, estimou-se o coeficiente de determinação genotípico (b), usando-se a seguinte fórmula:

$$b = \frac{CV_G}{CV_E}, \text{ onde:}$$

$$CV_G = \sqrt{\sigma^2_{s_G}} \times 100 \text{ e } CV_E = \sqrt{\sigma^2_{s_E}} \times 100$$

Após o isolamento e cálculo do desvio-padrão fenotípico (s_F), estimou-se o ganho de seleção (G_s) pela fórmula:

$G_s = H^2 \cdot K \cdot s_F$, onde H^2 = coeficiente de herdabilidade, no sentido amplo; K = fator que depende da intensidade de seleção; s_F = desvio-padrão fenotípico.

Finalmente, foi calculado o ganho de seleção relativo ($G_s\%$), com o emprego da seguinte expressão:

$$G_s\% = \frac{G_s}{x} \times 100, \text{ onde:}$$

G_s = ganho de seleção;

x = média geral do caráter.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Fase de Laboratório

1.1. Desinfestação prévia das sementes

Não foram observadas diferenças significativas, entre os cultivares de alface testados (“Brasil-303”, “White Boston” e “Great Lakes”), quanto aos 3 tratamentos de desinfestação de sementes testados. Todos eles promoveram ótima eliminação de fungos e bactérias, confirmada após a avaliação das sementes, previamente colocadas em placas de Petri contendo ágar-água, uma semana após a desinfestação (Figura 1-A). Por praticidade (menor tempo exigido), optou-se pelo emprego, nos experimentos posteriores, da desinfestação das sementes por imersão em álcool 96%, por 1 minuto, seguida de imersão em hipoclorito de sódio a 2,5%, por 15 minutos.

1.2. Testes de germinação das sementes desinfestadas

1.2.1. Germinação *in vitro*

Os resultados obtidos para 5 cultivares, em 3 meios de cultura diferentes, são apresentados no Quadro 1. Os meios de cultura ágar-água e solução de Hoagland apresentaram resultados médios de germinação de sementes estatisticamente semelhantes (75% e 71,5%, respectivamente), superiores ao observado para o meio $\frac{1}{2}$ MS. Essa diferença parece ter sido devida ao possível efeito inibidor do meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS, para os cultivares “Great Lakes” e “White Boston”. Por outro lado, para o cultivar “White Boston”, as baixas porcentagens de germinação observadas, nos 3 meios de cultura, parecem indicar a ocorrência de dormência acentuada das sementes.

QUADRO 1. Porcentagens de germinação *in vitro* de sementes de 5 cultivares de alface obtidas, em 3 diferentes meios de cultura.

Cultivares	Meios de Cultura		
	ágar-água	Solução de Hoagland	½ de sais e vitaminas de MS
“White Boston”	25,0%	35,0%	15,0%
“Romana Ballon”	90,0%	80,0%	80,0%
“Brasil-303”	95,0%	97,5%	80,0%
“Grand Rapids”	70,0%	62,5%	50,0%
“Great Lakes”	95,0%	82,5%	47,5%
Médias	75,0% ^(a)	71,5% ^a	54,5% ^b

CV%^(b) = 19,2

Observação: ^(a) Médias, seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente a 5% de probabilidade segundo o teste de Duncan.
^(b) = coeficiente de variação em porcentagem.

1.2.2. Germinação convencional

Em virtude da provável ocorrência de dormência em sementes de determinados cultivares de alface, promoveu-se a estratificação para quebra de dormência (5 a 7°C, por 72 horas), antes do processo de germinação. As taxas de germinação dos mesmos 5 cultivares, obtidas pelo teste convencional (Quadro 2) foram elevadas, sendo descartada a possibilidade da irregularidade da

germinação *in vitro* anterior ser devida ao baixo vigor das sementes testadas (Figura 1-B).

QUADRO 2. Porcentagens de germinação, em teste convencional, observadas em sementes de 5 cultivares de alface.

Cultivares	nº de sementes testadas	Porcentagem de germinação		
		Emissão de radícula	radícula e parte aérea	Total de sementes germinadas
White Boston"	400	23,50	66,25	89,75
"Romana Ballon"	400	29,00	62,25	91,25
"Brasil-303"	400	2,00	95,00	97,00
"Grand Rapids"	400	24,50	68,00	92,50
"Great Lakes"	400	27,50	63,25	90,75

A partir desses resultados, em todos os experimentos posteriores, as sementes foram previamente estratificadas e, na germinação *in vitro* das mesmas, utilizou-se o meio de cultura de ágar-água.

1.3. Indução de organogênese somática

1.3.1. Utilização de hipocótilos como fontes de explantes

a) Indução de calos e regeneração de plantas (efeito de cinetina)

A eficiência dos 2 meios de cultura empregados, quanto à indução de calos em explantes dos 3 cultivares testados, foi praticamente semelhante (amplitude de variação de tamanho de calo induzido de 2,75 a 3,23 - meio H₁ e de 3,01 a 3,32 - meio H₂ (Quadro 3), como comprovado por análise estatística. Assim, as concentrações de cinetina utilizadas (0,1 e 0,5 mg/l) não foram suficientes para promover diferenças no tamanho dos calos induzidos.

Embora o delineamento experimental (inteiramente casualizado) e a metodologia empregada (20 repetições, porém com 1 explante/frasco) não tenham permitido a análise estatística dos resultados para os caracteres calos com morfogênese, calos com regeneração de plantas e número de plantas regeneradas/explante, observou-se que o cultivar "Great Lakes" apresentou os melhores resultados de morfogênese e de parte aérea nos calos obtidos (de 70 a 90%). Entretanto, a morfogênese de parte aérea + raízes foi muito reduzida em todos os cultivares, variando de zero a 15%, sendo o meio H₃ (contendo 0,5 mg/l de cinetina) o mais adequado, em todos os casos.

Quanto à porcentagem de calos com regeneração de plantas, os resultados, aparentemente, concordam com os relatados por **SASAKI** (1982), para os cultivares "Great Lakes" e "Romana Ballon", onde a associação H₂/H₄ mostrou-se superior enquanto no cultivar "Maravilha das-quatro-estações" a associação H₁/H₃ revelou o melhor desempenho.

Quanto ao número de plantas regeneradas por explante, os resultados obtidos foram inconclusivos. Apenas pode-se observar maiores valores, em média, para a característica nos cultivares "Great Lakes" e "Romana Ballon" do que os obtidos para o cultivar "Maravilha-das-quatro-estações".

QUADRO 3. Indução de calos, morfogênese e regeneração de plantas, a partir de hipocótilos de 3 cultivares de alface com a utilização de 2 meios de cultura para a indução de calos (H₁ e H₂) e 2, para a regeneração de plantas (H₃ e H₄).

Cultivar	Meios (^a) Indução de calos	Tamanho (¹) médio de calos	Meios de (^b) Regeneração de plantas	Calos com morfogênese de		Calos com rege- neração de plantas	nº de plantas regen./ explante
				parte aérea	parte aérea + raízes		
"Great " Lakes"	H1	3,15	H3	90%	10%	30%	11,5
			H4	70%	0%	40%	9,5
	H2	3,32	H3	90%	10%	30%	5,6
			H4	80%	5%	55%	12,8
"Romana Ballon	H1	2,75	H3	55%	5%	20%	11,2
			H4	45%	0%	30%	8,3
	H2	3,01	H3	70%	15%	25%	11,6
			H4	30%	0%	45%	6,5
"Maravilha- "Maravilha-das quatro-estações	H1	3,23	H3	45%	5%	50%	6,3
			H4	60%	0%	20%	6,5
	H2	3,03	H3	70%	10%	35%	8,7
			H4	50%	0%	15%	7,0

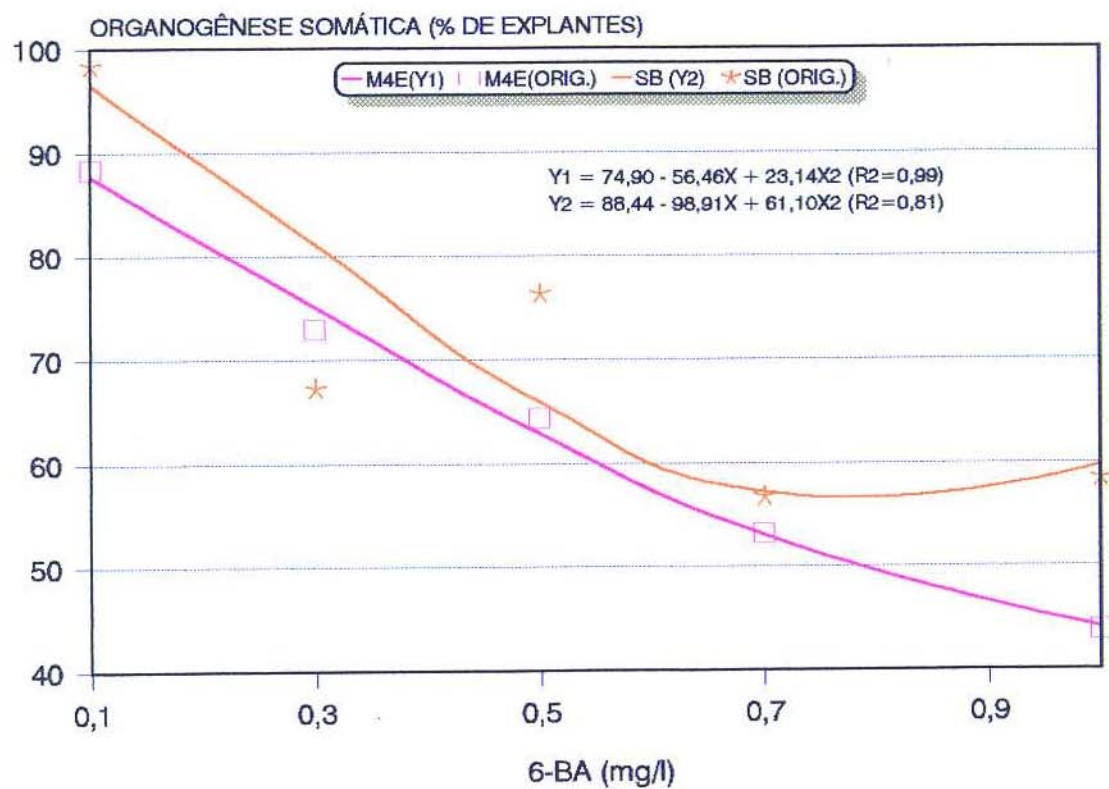
Observações: (^a) H1 = MS completo + 0,1 mg/l 2,4D + 0,1 mg/l cinetina; H2 = MS completo + 0,1 mg/l 2,4D + 0,5 mg/l cinetina; (^b) H3 = MS completo + 0,1 mg/l cinetina; H4 = MS completo + 0,5 mg/l cinetina; (¹) Tamanho de calos (escala de notas de 1 a 4, onde 1 = ausência de calo; 2 = calo pequeno, na periferia do explante; 3 = calo bem desenvolvido, com explante ainda visível; 4 = calo bem desenvolvido, cobrindo totalmente o explante).

b) indução de calos e regeneração de plantas (efeito de 6-BA)

As curvas de regressão quadrática ajustadas aos dados obtidos para os caracteres porcentagens de explantes com organogênese e número de brotos/explante (Figuras 2 e 3, respectivamente), em relação a 6 concentrações de 6-BA, mostraram claramente, em ambos os casos, a superioridade da concentração de 0,1mg/l do fitorregulador em relação às demais. As magnitudes dos coeficientes de determinação estimados ($R^2 = 0,99$ e $R^2 = 0,81$ - caráter % de explantes com organogênese, para os cultivares “Maravilha-das-quatro-estações” e “Salad Bowl” , respectivamente; $R^2 = 0,95$, para ambos os cultivares, para o caráter número de brotos/explante) atestam a confiabilidade dos resultados obtidos. Entretanto, **WEBB et al.**, 1984, em experimento semelhante utilizando o cultivar “Grand Rapids”, concluíram que a concentração de 0,5 mg/l de 6-BA foi a mais adequada para a regeneração de plantas.

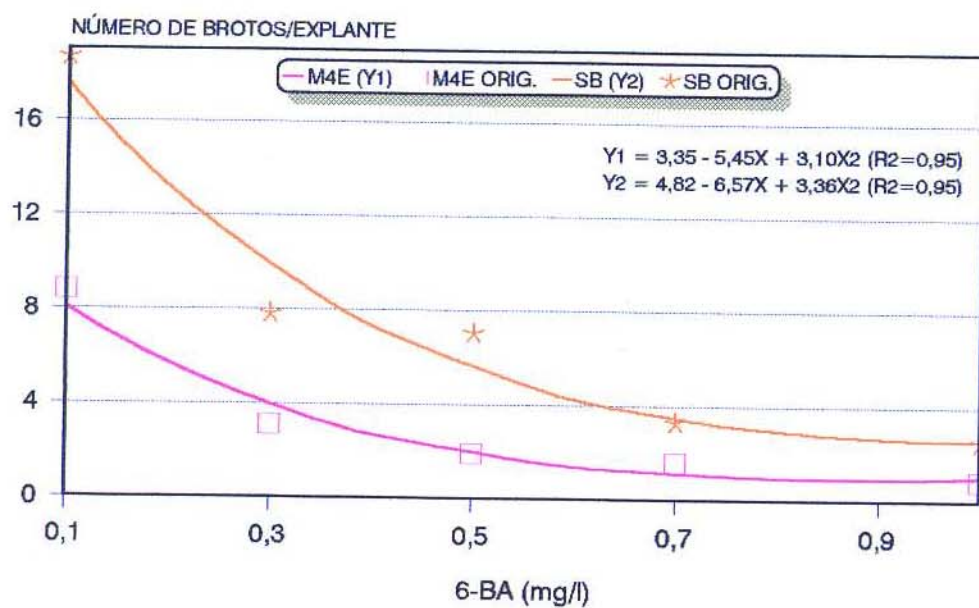
1.3.2. Utilização de folhas cotiledonares como fonte de explantes

Os explantes cotiledonares proximais promoveram, em média, maior desenvolvimento de calo do que os distais nos meios de cultura 1 e 2, não ocorrendo diferenças para o caráter no meio de cultura 3 (Quadro 4). Comparando-se explantes proximais nos 3 meios de cultura, não ocorreu diferença significativa para a característica, ao contrário do observado para os distais, quando o meio de cultura 3 foi superior aos demais. Considerando-se os explantes proximais e distais como um único, os meios de cultura não provocaram diferenças no caráter.



OBS. M4E = Cv "MARAVILHA -DAS- QUATRO-ESTAÇÕES "; SB = Cv "SALAD BOWL "; ORIG. = VALORES ORIGINAIS

FIGURA 2: CURVA DOSE-RESPOSTA DE 6-BA PARA O CARÁTER ORGANOGENESE SOMÁTICA, A PARTIR DEEXPLANTES DE HIPOCÓTILO, EM DOIS CULTIVARES DE ALFACE



OBS. M4E = Cv "MARAVILHA DAS QUATRO ESTAÇÕES" SB = Cv "SALAD BOWL"; ORIG. = VALORES ORIGINAIS

FIGURA 3. CURVAS DOSE-RESPOSTA DE 6-BA PARA O CARÁTER NÚMERO DE BROTO/EXPLANTE DE HIPOCÓTILO, EM DOIS CULTIVARES DE ALFACE

QUADRO 4. Avaliação de 5 cultivares de alface quanto ao desenvolvimento de calo (escala de notas de 1 a 6), empregando-se 3 diferentes meios de cultura e 2 tipos de explantes cotiledonares (proximal e distal).

CULTIVAR									
Meio de cultura ^(a)	Tipo de explante cotiledonar ^(b)	Desenvolvimento de calo ^(c)							
		"Grand Rapids"	"White Boston"	"Brasil-48"	"Brasil-221"	"Brasil-304"	Médias		
1	P	2,5a ^(d) a ^(e)	3,6a a	B	4,1a a	AB 3,5a a	B 4,5a a	A 3,6a a	3,3 ns
	D	3,2a a ^(f)	3,2a a	A	3,3 b	a A 2,5 b	a A 3,5a	a A 3,1 b	b
2	P	2,7a a	4,2a a	A	4,0a a	AB 2,9a a	B 3,6a b	AB 3,5a a	3,2 ns
	D	2,9a a	3,3 b	a AB	3,4a a	a A 2,6 b	a C 2,6 b	b C 2,9 b	b
3	P	2,7a a	3,4a a	A	3,8a a	A 3,5a a	A 3,6a b	A 3,4a a	3,4 ns
	D	2,9a a	3,9a a	A	3,3a a	a A 3,5a a	a A 3,5a a	a A 3,4a a	a
Médias	P	2,6a	3,7a	A	3,9a	A 3,3a	B 3,9a	A 3,5a	
	D	3,0a	3,4a	A	3,3a	A 2,8a	B 3,2 b	AB 3,1 b	
	X	2,8	3,5	A	3,6	A 3,0	B 3,5	B	

CV(%) = 7,5

Observações: 1. ^(a) Meios de cultura: 1=MS completo + 5,0mg/l de IAA + 0,5mg/l de cinetina; 2=MS completo + 5,0mg/l de IAA + 0,5mg/l de 6-BA + 40mg/l de adenina; 3=MS completo + 5,0mg/l de IAA + 0,5mg/l de 6-BA; ^(b) tipos de explantes cotiledonares: P=proximal e D=distal; ^(c) Desenvolvimento de calo - escala de notas: 1=ausência de calos; 2=calo pequeno, na periferia do explante; 3=calo mais desenvolvido com explante mais visível; 4=calo bem desenvolvido, envolvendo todo o explante; 5=calo pouco visível, quase totalmente coberto por organogênese; 6=calo totalmente envolvido por organogênese.

2. ^(d) Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna (dentro de cada meio de cultura); ^(e) médias seguidas de letras minúsculas diferentes (cor verde), na mesma coluna (explante proximal, dentro de cada meio de cultura); ^(f) médias seguidas de letras minúsculas diferentes (cor vermelha), na mesma coluna (explante distal, dentro de cada meio de cultura) e ^(g) médias de letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, segundo o teste de Duncan.

3. CV(%) = Coeficiente de variação.

Para os explantes proximais, os melhores resultados foram obtidos para os cultivares “White Boston”, “Brasil-48” e “Brasil-304” enquanto que para os distais, apenas o cultivar “Brasil-221” apresentou desempenho inferior aos demais para o desenvolvimento de calo.

Generalizando, os explantes cotiledonares proximais foram estatisticamente superiores aos congêneres distais quanto ao caráter estudado.

DOERSCHUG & MILLER (1967) e **WEBB et al.**, (1984) também utilizaram explantes cotiledonares, mas não os dividiram em proximais e distais, tendo sucesso na regeneração *in vitro* de alface.

Quanto à característica porcentagem de explante com morfogênese, os resultados obtidos, no mesmo experimento, são apresentados no quadro 5. Para esse caráter, os explantes cotiledonares proximais produziram, em média, maiores valores para a característica do que os distais, nos meios de cultura 1 e 3, não ocorrendo diferenças entre os mesmos no meio de cultura 2.

Tanto entre explantes proximais como entre os distais, nos 3 meios de cultura, não ocorreram diferenças significativas quanto à porcentagem de explantes com morfogênese. Entretanto, considerando-se os dois tipos de explantes como um único, o meio de cultura 1 revelou superioridade (76,3%) em relação aos outros (61,8% e 62,8%). Embora o meio de cultura 3 não tenha se sobressaído nesse caso observou-se visualmente a ocorrência de maior número de brotos/explante, concordando com os resultados obtidos por **WEBB et al.**, (1984). Estes autores relataram a superioridade do fitorregulador 6-BA em relação à cinetina quanto à regeneração de plantas *in vitro* de alface. Assim, a

QUADRO 5. Avaliação de 5 cultivares de alfaca quanto à porcentagem de calos que apresentaram morfogênese somática, empregando-se 3 diferentes meios de cultura e 2 tipos de explantes cotiledonares (proximal e distal).

CULTIVAR									
Meio de cultura ^(a)	Tipo de explante cotiledonar ^(b)	% de explantes com morfogênese							
		"Grand Rapids"	"White Boston"	"Brasil-48"	"Brasil-221"	"Brasil-304"	Médias		
1	P	92,5a ^(d) a ^(e) A ^(h)	90,0a a A	100,0a a A	77,5a a A	90,0a a A	90,0a	ns	76,3 a ^(g)
	D	85,0a a ^(f) A	75,5a a A	63,3 b A	45,0 b a AB	45,0 b a B	62,7 b	ns	
2	P	83,3a a A	76,7a a A	72,5a a A	50,0a b A	77,5a a A	72,0a	ns	61,8 b
	D	76,7a a A	83,3a a A	50,0a a AB	23,3a b C	25,0 b a C	51,7a	ns	
3	P	82,5a a A	76,7a a AB	82,5a a A	52,5a b B	60,0a b B	70,8a	ns	62,8 b
	D	82,5a a A	70,0a a AB	57,5 b a BC	32,5 b a BC	27,5 b a C	54,9 b	ns	
Médias	P	86,1a	81,1a	85,0a	60,0a	75,8a	AB		77,6a
	D	81,4a	76,1a	56,9 b	33,6 b	32,5 b	B		56,1 b
	X	83,7	78,6	70,9	46,8	54,1	C		BC

CV(%)^(c)=25,62

Observações: 1. ^(a) Meios de cultura: 1=MS completo + 5,0mg/l de IAA + 0,5mg/l de cinetina; 2=MS completo + 5,0mg/l de IAA + 0,5mg/l de 6-BA + 40mg/l de adenina; 3=MS completo + 5,0mg/l de IAA + 0,5mg/l de 6-BA; ^(b) Tipos de explantes cotiledonares: P=proximal; D=distal; ^(c) CV(%)=coeficiente de variação em porcentagem.

2. ^(d) Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna (dentro de cada meio de cultura); ^(e) médias seguidas de letras minúsculas diferentes (cor verde), na mesma coluna (explante proximal, dentro de cada meio de cultura); ^(f) médias seguidas de letras minúsculas diferentes (cor vermelha), na mesma coluna (explante distal, dentro de cada meio de cultura); ^(g) médias seguidas de letras minúsculas diferentes (cor azul), na mesma coluna (entre meios de cultura) e ^(h) médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, segundo o teste de Duncan.

partir dessas observações, os experimentos seguintes enfatizaram o emprego de 6-BA.

Além disso, o cultivar “Brasil-221” revelou desempenho inferior aos demais quanto ao caráter (explantes proximais) enquanto os cultivares “Grand Rapids” e “White Boston” foram os melhores quanto aos explantes distais.

Novamente, em média, verificou-se o melhor desempenho dos explantes proximais (77,6%) em relação aos distais (56,1%), na expressão do caráter.

Os resultados obtidos quando do emprego de 5 concentrações de 6-BA, adicionadas a meio de cultura básico, quanto à porcentagem de explantes com organogênese e número médio de brotos/explante, para os cultivares “Grand Rapids”, “Salad Bowl”, “Brasil-303” e “Maravilha-das-quatro-estações” são apresentados nos quadros 6 e 7, respectivamente.

Em todos os meios de cultura, os explantes cotiledonares proximais foram superiores aos distais quanto ao caráter porcentagem de explantes com organogênese (Quadro 6), o mesmo ocorrendo para a característica número médio de brotos/explante (Quadro 7). Na comparação dos resultados de explantes proximais, entre os meios de cultura estudados, as concentrações de 6-BA de 0,1 e 0,3 mg/l conduziram aos maiores valores para o caráter porcentagem de explantes com organogênese enquanto que, para os distais, é evidente a superioridade de concentração de 0,1 mg/l de 6-BA (Quadro 6), o mesmo ocorrendo para número médio de brotos/explante proximais e distais (Quadro 7).

QUADRO 6. Resultados de organogênese somática (expressa em porcentagens de explantes com organogênese), obtidas em 4 cultivares de alface, empregando-se explantes cotiledonares de 2 tipos (proximal e distal), submetidos a 5 meios de cultura diferindo nas concentrações de 6-BA (6-benzilaminopurina).

Meio de cultura ^(a) Tipo de explante cotiledonar ^(b)	CULTIVAR				Análise Conjunta	
	"Grand Rapids"	"Salad Bowl"	"Brasil-303"	"Maravilha-das quatro-estações"	Médias	
	% de explantes com organogênese					
1	P	100,0a ^(d) a ^(e)	A ^(h) 100,0a	A 100,0a	A 90,4a	91,6a ^(g)
	D	100,0a	a ^(h) 100,0a	A 88,3 b	A 54,5 b	85,7 b
2	P	100,0a	A 96,7a	A 95,0a	A 90,0a	95,4a
	D	95,0a	ab 98,3a	a 8,3 b	b 56,5 b	64,5 b
3	P	100,0a	A 95,0a	A 86,7a	AB 68,9 a	87,6a
	D	79,8 b	b 78,3 b	b A 30,0 b	bc B 18,8 b	51,7 b
4	P	95,2a	A 76,7a	B 78,3a	B 65,5a	78,9a
	D	35,9 b	c A 55,0 b	b A 0,0 b	c B 13,3 b	26,0 b
5	P	75,8a	A 51,7a	c AB 18,3a	C 43,3a	47,3a
	D	25,7 b	c A 21,7 b	c A 0,0 b	c B 3,3 b	12,7 b
Médias	P	94,2a	A 84,0a	B 75,7a	C 71,6a	81,3a
	D	67,3 b	A 70,7 b	A 25,3 b	B 29,3 b	48,1 b
CV(% ^(c))	X	80,7	A 77,3	A 50,5	B 50,4	19,7

Observações: 1. ^(a) Meios de cultura: MB=meio de cultura básico (MS completo + 5,0mg/l IAA + 30g/l de sacarose + 6g/l de ágar); 1=MB + 0,1mg/l 6-BA; 2=MB + 0,3mg/l 6-BA; 3=MB + 0,5mg/l 6-BA; 4=MB + 0,7mg/l 6-BA; 5=MB + 1,0mg/l 6-BA; ^(b) Tipos de explantes: P=proximal e D=distal; ^(c) CV=coeficiente de variação.

2. ^(d) Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna (dentro de cada meio de cultura); ^(e) Médias seguidas de letras minúsculas diferentes (cor verde), na mesma coluna (explante distal, dentro de cada meio de cultura); ^(g) Médias seguidas de letras minúsculas diferentes (cor azul), na mesma coluna (entre meios de cultura) e ^(h) Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, segundo o teste de Duncan.

QUADRO 7. Resultados de regeneração de plantas, (número médio de brotos/explante), obtidos em 4 cultivares de alface, empregando-se explantes cotilédones de 2 tipos (proximal e distal), submetidos a 5 meios de cultura, diferindo nas concentrações de 6-BA (6-benzilaminopurina).

Meio de cultura ^(a)	Tipo de explante cotilédonar ^(b)	CULTIVAR				Análise Conjunta	
		"Grand Rapids"	"Salad Bowl"	"Brasil-303"	"Maravilha-das quatro-estações"	Médias	
		número médio de brotos/explantes					
1	P	17,3a ^(d) a ^(e)	A ^(b) 14,5a a	AB 18,5a a	A 11,1a a	B 15,3a a	22,9 a ^(g)
	D	11,4 b	a ^(b) 10,8a a	A 5,3 b	a B 2,7 b	C 7,6 b	a
2	P	14,7a a	A 11,0a a	AB 9,4a b	B 5,2a b	C 10,1a b	7,1 b
	D	6,6 b	b A 8,1a a	A 0,3 b	b B 1,4 b	ab B 4,1 b	b
3	P	6,6a b	A 5,3a b	AB 4,8a c	AB 3,2a bc	B 4,9a c	3,4 c
	D	3,4 b	c A 3,0a b	A 1,0 b	b B 0,3 b	bc B 1,9 b	c
4	P	4,8a b	A 3,4a bc	AB 2,8a c	AB 2,3a c	B 3,3a d	2,0 d
	D	0,9 b	d AB 1,6a bc	A 0,0 b	b B 0,2 b	bc B 0,7 b	d
5	P	2,3a c	A 1,9a c	AB 0,6a d	B 0,7a d	B 1,4a e	0,9 e
	D	0,4 b	d A 0,5 b	c A 0,6a	b A 0,0a	c A 0,4 b	d
Médias	P	9,1a	A 7,2a	B 7,2a	B 4,5a	C 7,0a	
	D	4,5 b	A 4,8 b	A 1,4 b	B 0,9 b	B 2,9 b	
	X	6,8	A 6,0	A 4,3	B 2,7	C	
CV(%) ^(c)		14,6	11,6	15,9	19,9	15,9	

Observações: 1. ^(a) Meios de cultura: MB=meio de cultura básico (MS completo + 5,0mg/l IAA + 30g/l de sacarose + 6g/l de ágar); 1=MB + 0,1mg/l 6-BA; 2=MB + 0,3mg/l 6-BA; 3=MB + 0,5mg/l 6-BA; 4=MB + 0,7mg/l 6-BA; 5=MB + 1,0mg/l 6-BA; ^(b) Tipos de explantes: P=proximal e D=distal; ^(c) CV=coeficiente de variação.

2. ^(d) Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna (dentro de cada meio de cultura); ^(e) médias seguidas de letras minúsculas diferentes (cor verde), na mesma coluna (explante proximal, dentro de cada meio de cultura); ^(f) médias seguidas de letras minúsculas diferentes (cor vermelha), na mesma coluna (explante distal, dentro de cada meio de cultura); ^(g) médias seguidas de letras minúsculas diferentes (cor azul), na mesma coluna (entre meios de cultura) e ^(h) médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, segundo o teste de Duncan.

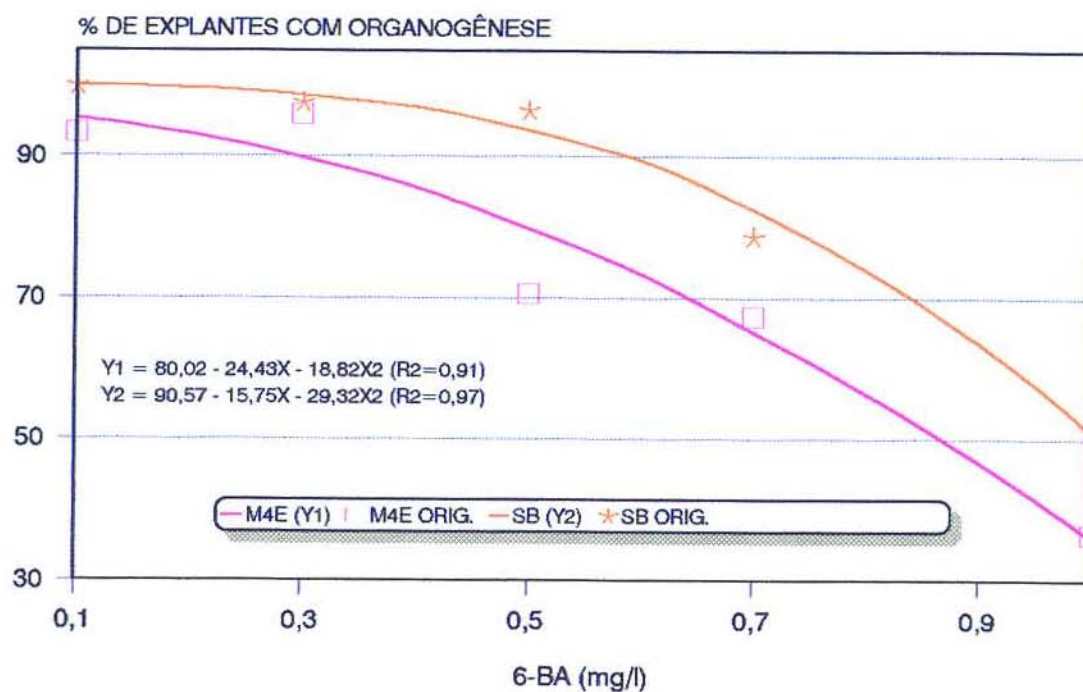
Desconsiderando-se o efeito de posição (proximal/distal), a concentração de 0,1mg/l de 6-BA foi, novamente, superior às demais quanto à indução de maiores valores para os caracteres estudados.

Por outro lado, o cultivar “Grand Rapids” revelou porcentagem de explantes com organogênese e número médio de brotos/explante estatisticamente superiores àqueles observados para os demais cultivares (explantes proximais) e, juntamente com o cultivar “Salad Bowl”, manteve o bom desempenho quando empregaram-se explantes distais (Quadros 6 e 7).

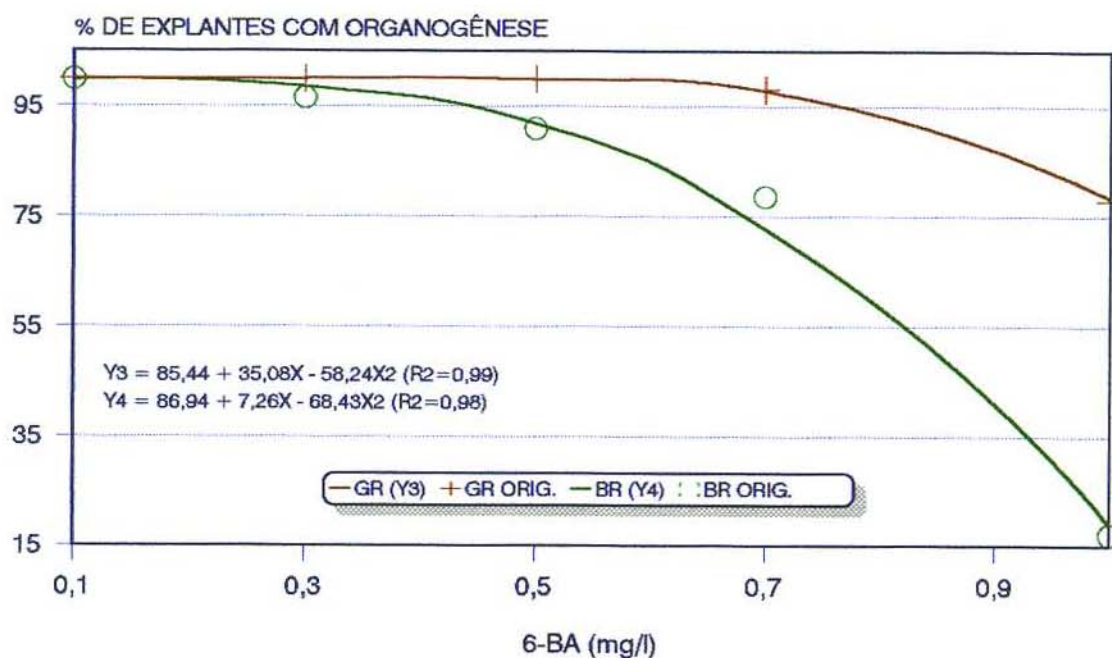
De modo semelhante ao observado no experimento anterior, os explantes cotiledonares proximais apresentaram resultados médios de porcentagens de explantes com organogênese (81,3%) e número médio de brotos/explante (7,0) muito superiores aos obtidos com os explantes distais para os mesmos caracteres (48,1% e 2,9, respectivamente).

Esse fato pode ser devido aos teores endógenos de auxinas e citocininas dos explantes cotiledonares. **EDLUND et al** (1995) estudaram a distribuição da auxina IAA (ácido indol acético) em folhas jovens, em desenvolvimento, de *Nicotiana tabacum* L. e verificaram um aumento dos níveis de IAA, no sentido do ápice para a base das folhas. Um padrão de distribuição semelhante foi encontrado para as citocininas em folhas em desenvolvimento de *Capsicum annum* L. (**ULVSKOV et al.**, 1992).

As curvas de regressão quadrática, ajustadas aos dados de porcentagem de explantes com organogênese e número médio de brotos/explantes (Figuras 4 e 5, respectivamente), em relação a 5 concentrações de 6-BA, novamente

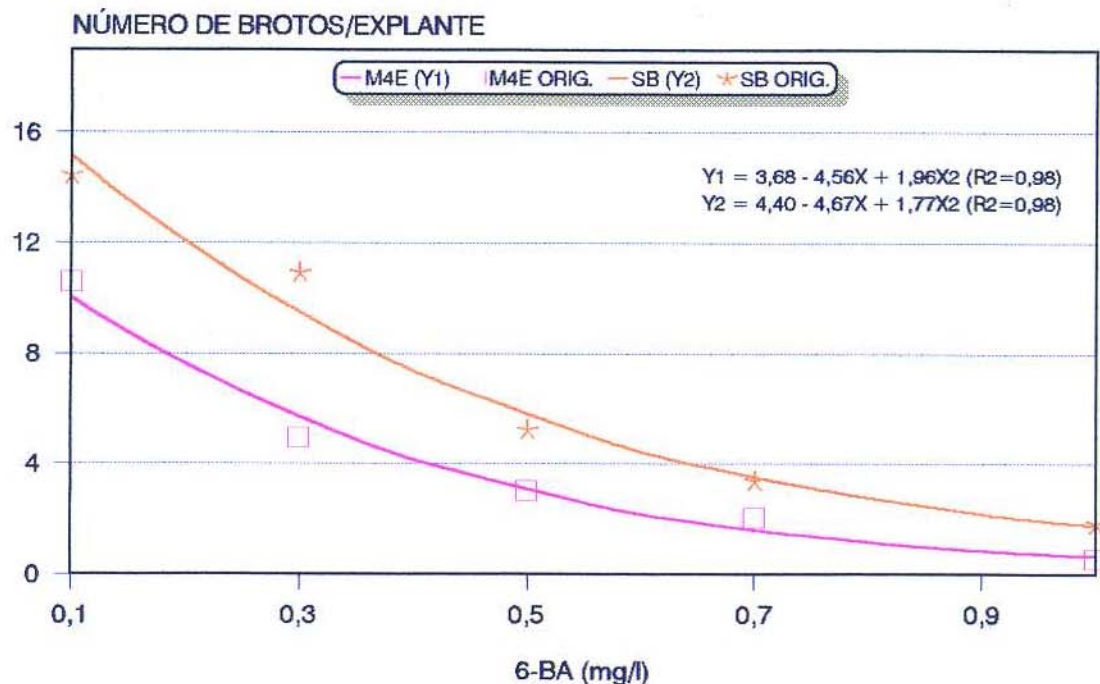


OBS. M4E = Cv "MARAVILHA DAS QUATRO ESTAÇÕES"; SB = Cv "SALAD BOWL"
; ORIG. = VALORES ORIGINAIS

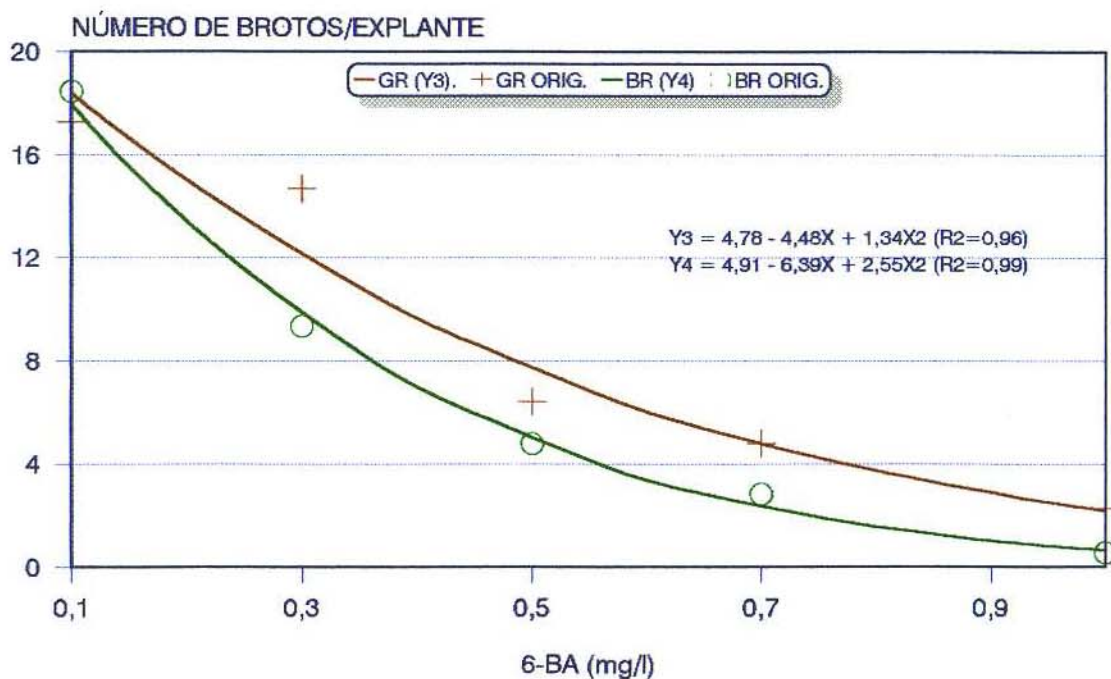


OBS: GR = Cv "GRAND RAPIDS"; BR = Cv "BRASIL 303"; ORIG. = VALORES
ORIGINAIS

FIGURA 4. CURVAS DE DOSES- RESPOSTA DE 6-BA PARA O CARÁTER % DE EXPLANTES COTILEDONARES PROXIMAIS COM ORGANOGÊNESE SOMÁTICA, EM QUATRO CULTIVARES DE ALFACE



OBS. M4E = Cv "MARAVILHA DAS QUATRO; ESTAÇÕES "; SB = Cv "SALAD BOWL "; ORIG. = VALORES ORIGINAIS



OBS: GR = Cv "GRAND RAPIDS "; BR = Cv "BRASIL 303 "; ORIG. = VALORES ORIGINAIS

FIGURA 5. CURVAS DOSE-RESPOSTA DE 6-BA PARA O CARÁTER NÚMERO DE BROTO/EXPLANTE COTILEDONAR PROXIMAL, EM QUATRO CULTIVARES DE ALFACE

confirmaram a superioridade da concentração de 0,1 mg/l do fitorregulador, em relação aos demais para todos os cultivares. Elevados coeficientes de determinação foram estimados ($R^2 = 0,91$; 0,97; 0,99 e 0,98 - porcentagens de explantes com organogênese; $R^2 = 0,98$; 0,98; 0,96 e 0,99 - número de brotos/explante) para os cultivares “Maravilha-das-quatro-estações”, “Salad Bowl”, “Grand Rapids” e “Brasil-303”, respectivamente.

A análise conjunta dos experimentos conduzidos com os cultivares “Regina”, “Glória”, “Great Lakes”, “Babá”, “Brasil-48” e “White Boston”, mostrou que, para o caráter porcentagem de explantes com organogênese, não houve diferença entre os explantes proximais e distais quanto à expressão do caráter. Entretanto, o efeito de posição do explante originou diferenças médias, para a característica, entre explantes proximais, nos 3 meios de cultura testados, o mesmo ocorrendo quanto aos distais, e quando considerou-se o explante cotiledonar como único. Por outro lado, os cultivares não mostraram diferenças significativas para a característica, quando do emprego de explantes proximais. Todavia, quando utilizaram-se explantes distais, os cultivares “Brasil-48” e “Babá” revelaram os piores desempenhos (Quadro 8).

Quanto ao caráter número médio de brotos/explante, os explantes proximais foram superiores aos distais nas duas concentrações de 6-BA (0,1 e 0,3 mg/l). Diferenças significativas entre explantes proximais e entre distais foram detectadas em diferentes meios de cultura assim como quando considerou-se o explante cotiledonar como único. Nesse caso, a concentração de 0,1mg/l foi, novamente, a mais eficiente. Os cultivares “Regina” e “Great Lakes” foram

QUADRO 8. Resultados de organogênese somática (expressa em porcentagens de explantes com organogênese), obtidos em 3 cultivares de alfafa, empregando-se explantes cotiledonares de 2 tipos (proximal e distal), submetidos a 3 meios de cultura diferindo nos teores de 6-BA (6-benzilaminopurina).

Meio de cultura ^(a)	Tipo de explante cotiledonar ^(b)	CULTIVAR					Análise Conjunta			
		"Regina"	"Glória"	"Great Lakes"	"Babá"	"Brasil-48"	"White Boston"	Médias		
		% de explantes com organogênese								
1	P	0,0a ^(d)	0,0a ^(e)	A	0,0a	A	0,0a	A	0,0a	0,0
	D	0,0a ^(f)	0,0a	bA	0,0a	bA	0,0a	bA	0,0a	0,0a
2	P	100,0a	A	93,3a	A	100,0a	A	96,7a	A	100,0a
	D	96,7a	A	96,7a	A	93,3a	A	26,7	B	40,0
3	P	100,0a	A	100,0a	A	96,7a	A	80,0a	BC	60,0a
	D	86,7a	A	80,0a	AB	86,3a	AB	0,0	B	6,7
Médias	P	66,7a	A	66,7a	A	63,3a	A	58,9a	A	53,3a
	D	61,1a	A	58,9a	A	59,8a	A	15,5	B	48,9a
	X	63,9	A	62,8	A	61,5	AB	37,2	C	51,1

CV(%)(^c)

12,5 12,0 16,9 31,0 34,3 35,8 29,2

Observações: 1. ^(a) Meios de cultura: MB=meio de cultura básico (MS completo + 5,0mg/l de IAA + 30g/l de sacarose + 6g/l de ágar); 1=MB + zero g/l de 6-BA; 2=MB + 0,1mg/l 6-BA; 3=MB + 0,3mg/l 6-BA; ^(b) Tipos de explantes cotiledonares: P=proximal; D=distal; ^(c) CV(%)=coeficiente de variação em porcentagem.

2. ^(d) Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna (dentro de cada meio de cultura); ^(e) médias seguidas de letras minúsculas diferentes (cor verde), na mesma coluna (explante proximal, dentro de cada meio de cultura); ^(f) médias seguidas de letras minúsculas diferentes (cor vermelha), na mesma coluna (explante distal dentro de cada meio de cultura); ^(g) médias seguidas de letras minúsculas diferentes (cor azul), na mesma coluna (entre meios de cultura) e ^(h) médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, segundo o teste de Duncan.

superiores aos demais quanto ao caráter (explante proximal) e os mesmos cultivares, junto com o “Glória” e “White Boston”, para o explante distal.

Novamente, os explantes cotiledonares proximais promoveram maiores números de brotos/explante (10,6) do que os distais (4,4), confirmando os resultados de experimentos anteriores (Quadro 9).

Na ausência de 6-BA, nos dois casos, não ocorreu organogênese para nenhum dos cultivares em estudo, confirmando a importância desse fitorregulador no processo.

No quadro 10, são apresentados os resultados de regeneração de plantas do cultivar “Brasil-303”, induzida a partir de explantes cotiledonares proximais e distais, extraídos em cinco diferentes estádios de desenvolvimento (3, 4, 5, 6 e 7 dias após a germinação), cultivados em meio de cultura MS completo + 5,0 mg/l de IAA + 30g/l sacarose + 6g/l ágar + 0,1 mg/l de 6-BA .

QUADRO 9. Resultados de regeneração de plantas (número médio de brotos/explante), obtidos em 6 cultivares de alfafa, empregando-se explantes cotilédones de 2 tipos (proximal e distal), submetidos a 3 meios de cultura diferindo nos teores de 6-BA (6-benzil-aminopurina).

Meio de cultura ^(a)	Tipo de explante cotilodonar ^(b)	CULTIVAR						Análise Conjunta	
		"Regina"	"Glória"	"Great Lakes"	"Babá"	"Brasil-48"	"White Boston"	Médias	
		número médio de brotos/explantes							
1	P	0,0a ^(d)	A ^(h) 0,0a	A 0,0a	A 0,0a	A 0,0a	A 0,0a	A 0,0a	0,0 ^(g)
	D	0,0a	C ^(h) A 0,0a	C A 0,0a	C A 0,0a	C A 0,0a	C A 0,0a	C A 0,0a	0,0 ^(g)
2	P	30,7a	A 22,7a	A 25,7a	A 15,9a	B 14,2a	B 13,5a	B 20,4a	14,4a
	D	10,3b	A 14,3b	A 12,2a	A 0,7b	B 2,1b	B 10,7a	A 8,4b	8,4a
3	P	20,7a	A 14,7a	A 18,4a	A 8,4a	B 3,8a	C 3,0a	C 11,5a	7,45b
	D	4,4b	A 4,9b	A 7,2b	A 0,0b	B 0,1b	B 4,2a	A 3,4b	3,4b
Médias	P	17,1a	A 12,4a	B 14,7a	AB 8,1a	C 6,0a	CD 5,5a	D 10,6a	
	D	4,9b	A 6,4b	A 6,4b	A 0,2b	B 0,7b	B 4,9a	A 3,9b	
	X	11,0	A 9,4	A 12,2	A 4,1	C 3,3	C 5,2	B	
CV(%) ^(c)		16,8	15,3	7,8	15,1	31,7	26,1	19,6	

Observações: 1. ^(a) Meios de cultura: MB=meio de cultura básico (MS completo + 5,0mg/l de IAA + 30g/l de sacarose + 6g/l de ágar); 1=MB + zero g/l de 6-BA; 2=MB + 0,1mg/l 6-BA; 3=MB + 0,3mg/l 6-BA; ^(b) Tipos de explantes cotilédones: P=proximal e D=distal; ^(c) CV(%)=coeficiente de variação em porcentagem.

2. ^(d) Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna (dentro de cada meio de cultura); ^(e) médias seguidas de letras minúsculas diferentes (cor verde), na mesma coluna (explante proximal, dentro de cada meio de cultura); ^(f) médias seguidas de letras minúsculas diferentes (cor vermelha), na mesma coluna (explante distal dentro de cada meio de cultura); ^(g) médias seguidas de letras minúsculas diferentes (cor azul), na mesma coluna (entre meios de cultura) e ^(h) médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma linha, diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, segundo o teste de Duncan.

QUADRO 10. Regeneração de plantas (expressa em número médio de brotos/explante) no cultivar "Brasil-303", empregando-se 2 tipos de explantes (proximal e distal), em 5 estádios de desenvolvimento (3, 4, 5, 6, 7 dias após a germinação), em meio de cultura acrescido de 0,1 mg/l de 6-BA.

Tipo de (ª) explante	Estádios de desenvolvimento (dias após a germinação)					Média
	3	4	5	6	7	
	nº médio de brotos/explante					
P	33,7a ^(c)	25,8a	16,9a	10,3a	7,5a	18,8a
D	11,9b	6,5 b	6,4 b	3,8 b	2,2 b	6,2 b

CV (^b) = 11,6%

Observação: (^a) Tipos de explante: P = proximal; D = distal, (^b) CV = coeficiente de variação (em %), (^c) médias na mesma coluna, seguida de letras diferentes, são estatisticamente diferentes entre si, de acordo com o teste de Duncan a 5% de probabilidade.

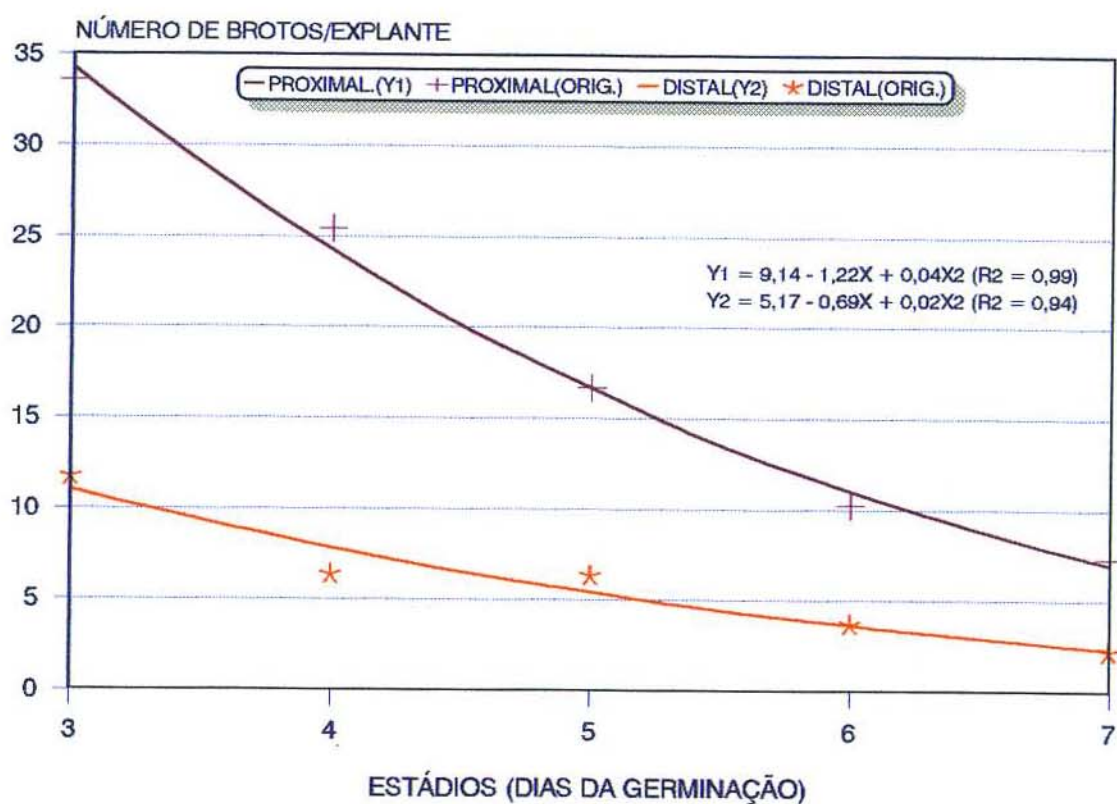
Novamente, neste caso, os explantes proximais foram sempre superiores aos distais quanto à regeneração somática observada, em todos os estádios de desenvolvimento testados. É também evidente o decréscimo de número médio de brotos/explante à medida que aumenta o número de dias da germinação em que os explantes foram excisados. Esses resultados diferem dos obtidos por **WEBB** et al (1984) que, estudando os efeitos de interações entre reguladores de

crescimento e estágio de desenvolvimento fisiológico de explantes cotiledonares do cultivar de alface “Grand Rapids”, concluíram que a produção de brotos/explante foi menor no estágio de desenvolvimento de 3 dias do que no de 4 dias após a germinação. Porém, os autores também obtiveram diminuição da produção de brotos/explante, com o aumento da idade do explante, a partir do estágio de 5 dias após a germinação.

Curvas de regressão quadrática, ajustadas aos dados obtidos para explantes cotiledonares proximais e distais, quanto aos seus efeitos no caráter número de brotos/explante, em 5 estádios de desenvolvimento da planta doadora são apresentados na Figura 6. Elevados coeficientes de determinação ($R^2 = 0,99$ - explante proximal e $R^2 = 0,94$ - explante distal) atestam a confiabilidade dos resultados. O melhor estágio de desenvolvimento da fonte de explante foi o de 3 dias após a germinação (protusão da radícula).

As combinações possíveis entre 6 concentrações de 6-BA e 3 concentrações de IAA foram avaliadas, quanto à produção média de brotos/explante cotiledonar, no cultivar “Brasil-303”.

Os resultados obtidos, apresentados no quadro 11, mostraram que, também nesse caso, os explantes proximais foram em média, sempre superiores aos distais, nas 3 concentrações de IAA estudadas (2,5; 5,0 e 7,5 mg/l). Para os explantes proximais, a concentração de 5,0 mg/l foi a mais eficiente enquanto que para os distais não ocorreram diferenças significativas, para o caráter, entre as concentrações estudadas. Considerando-se o explante como único, também a concentração de 5,0 mg/l de IAA foi superior às demais.



OBS: ORIG. = DADOS ORIGINAIS

FIGURA 6. REGRESSÕES QUADRÁTICAS ENTRE NÚMERO DE BROTOS/EXPLANTE COTILEDONAR (PROXIMAL E DISTAL) E DIVERSOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO (DIAS APÓS A GERMINAÇÃO), NO CULTIVAR "BRASIL 303"

QUADRO 11. Resultados obtidos de regeneração de plantas, (número médio de brotos/explante), em explantes cotilédonares proximais e distais do cultivar Brasil-303, em 18 meios de cultura (combinações possíveis entre 6 concentrações de 6-BA e 3 concentrações de IAA e 6-BA).

IAA (mg/l)	Tipo de explante cotiledonar ^(a)	6-BA (mg/l)						Médias	
		0,0	0,025	0,05	0,1	0,3	0,5		
		número médio de brotos/explante							
2,5	P	0,0a ^(c)	2,6 a	5,3a a	4,0 a	3,5 a	3,2a b	3,1a b	1,7 b ^(f)
	D	0,0a ^(e)	0,3 b	1,5 b a	0,17 b	0,0 b	0,0 b a	0,3 b a	
5,0	P	0,0a	3,1 a	6,8a a	7,4 a	7,0 a	2,7a a	4,5a a	2,8 a
	D	0,0a	0,7 b	1,5 b a	4,4 b	0,0 b	0,0 b a	1,1 b a	
7,5	P	0,0a	1,1 a	4,7a a	4,7 a	3,1 a	3,7a a	2,9a b	1,7 b
	D	0,0a	0,17a	1,4 b a	1,4 b	0,03 b	0,0 b a	0,5 b a	
Médias	P	0,0a	2,3 a	5,6a	5,4 a	4,5 a	3,2a	3,5a	
	D	0,0a	0,4 b	1,5 b	2,0 b	0,01 b	0,0 b	0,6 b	
	X	0,0	1,3	3,6	3,7	2,3	1,6		

CV(%)^(b)=24,7

Observação: ^(a) Tipos de explantes cotilédonares: P=proximal e D=distal; ^(b) CV=Coefficiente de variação, em porcentagem; ^(c) médias (explante proximal), seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma coluna (dentro de cada concentração de IAA); ^(d) médias (explante distal), seguidas de letras minúsculas (cor verde) diferentes, na mesma coluna (explante proximal, dentro de cada concentração de IAA); ^(e) médias seguidas de letras minúsculas (cor vermelha) diferentes, na mesma coluna (explante distal, dentro de cada concentração de IAA); ^(f) médias seguidas de letras minúsculas (cor azul) diferentes, na mesma coluna, diferem entre si a 5% de probabilidade, segundo o teste de Duncan.

Para se determinar a combinação IAA x 6-BA mais apropriada para a produção de maior número de brotos/explante, curvas de regressão quadrática foram realizadas (Figura 7). Nota-se, claramente, que a combinação 0,5 mg/l de IAA e 0,1 mg/l é superior às demais combinações estudadas. A veracidade dessa afirmativa é comprovada pelos altos coeficientes de determinação calculados ($R^2 = 0,92$; $0,92$ e $0,90$ para as concentrações de 2,5; 5,0 e 7,5 mg/l de IAA, respectivamente).

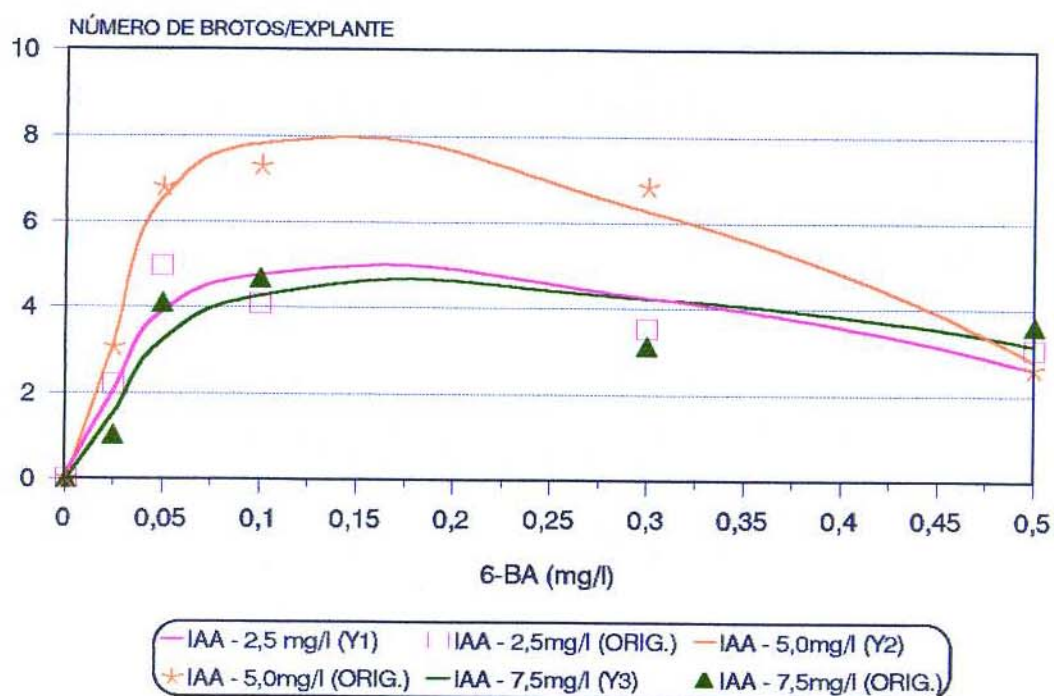
2. Fase de casa-de-vegetação

O substrato solo comum acrescido de matéria orgânica (esterco de curral curtido), em vasos, propiciou a melhor aclimação das plantas em casa-de-vegetação, que os demais substratos testados.

Plantas R_0 , dos cultivares “Maravilha-das-quatro-estações”, “Salad-Bowl” e “Grand Rapids”, foram aclimatadas e suas sementes colhidas (progênes R_1).

Obtiveram-se 18 progênes R_1 do cultivar “Maravilha-das-quatro-estações”; 21 progênes R_1 , do cultivar “Grand Rapids” e 13 progênes R_1 , do cultivar “Salad-Bowl”.

Mesmo em condições de cultivo *in vitro*, observou-se a ocorrência de antocianina nas folhas, em indivíduos de plantas regeneradas do cultivar “Grand Rapids” (Figura 8-J). Por outro lado, em condições de campo, alguns indivíduos R_1 (cultivar “Salad Bowl”) mostraram elevado vigor de parte aérea (Figura 8-K); outros do cultivar “Grand Rapids”, apresentaram folhas mais recortadas do que o



$$Y1 = 0,79 + 0,96X - 0,15X^2 \quad (R^2=0,92)$$

$$Y2 = 0,69 + 1,49X - 0,25X^2 \quad (R^2=0,92)$$

$$Y3 = 0,67 + 0,89X - 0,13X^2 \quad (R^2=0,90)$$

FIGURA 7: CURVAS DOSE-RESPOSTA DE 6-BA PARA O CARÁTER NÚMERO DE BROTO/EXPLANTE, EM DIFERENTES NÍVEIS DE IAA (Cv BRASIL 303 ; EXPLANTE COTILEDONAR PROXIMAL)

FIGURA 8



FIGURA 8

J - Presença de antocianina observada em plantas regeneradas *in vitro* do cultivar "Grand Rapids", de folhas originalmente verdes;

K - Planta de progênie regenerada *in vitro* do cultivar "Salad Bowl", que além de desenvolvimento precoce, mostrou indivíduos de elevado vigor;

L - Folhas de plantas do cultivar "Grand Rapids", sendo: a) cultivar original e b) progênie de planta regenerada *in vitro* (folhas com bordas bem recortadas);

M - Plantas diferentes da mesma progênie, oriunda de planta regenerada *in vitro* do cultivar "Grand Rapids", observando-se diferente formação de "cabeça" ("miolo");

N - Indivíduos pertencentes à mesma progênie, oriunda de regeneração *in vitro*, de planta do cultivar "Grand Rapids": observa-se a diferença em vigor e coloração das folhas (comparar a e b); idem para o cultivar "Maravilha-das-quatro-estações" (comparar c e d).

cultivar original (Figura 8-L). Neste último cultivar, algumas progênes R_1 revelaram indivíduos com diferentes tipos de “cabeça” (Figura 8-M).

Finalmente, o cultivar “Grand Rapids” apresentou planta variegada com menor desenvolvimento e vigor, em uma de suas progênes e o cultivar “Maravilha-das-quatro-estações” apresentou várias plantas de uma mesma progênie com desenvolvimento e vigor bem prejudicados (Figura 2-N), sugerindo a possível ocorrência de problemas cromossômicos, o que não pôde ser comprovado por análises citológicas, devido à morte prematura das plantas.

3. Fase de Campo

No quadro 12 são apresentadas as médias gerais de caracteres agronômicos quantitativos (diâmetro, altura e peso de “cabeça”; comprimento e largura de folha basal; número de folhas e comprimento do pendão floral), de plantas R_1 e dos controles intercalares. As progênes de autofecundação de plantas regeneradas *in vitro* não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre si quanto aos caracteres acima citados, em nenhum dos cultivares em estudo. Este fato pode ter sido devido a dois fatores principais: a) número relativamente pequeno de progênes testadas em cada cultivar e b) emprego de médias de progênes para a análise estatística dos resultados, que é uma exigência do modelo estatístico empregado.

Apesar disso, foram observadas, no campo, variações de tipo, forma e coloração de folha; mosaicismo; florescimento precoce, etc.

QUADRO 12. Resultados obtidos de avaliação de 3 cultivares de alface, regenerados de cultura de tecidos *in vitro*, quanto a diversos caracteres quantitativos.

Caráter	Cultivares					
	"Grand Rapids"		"Maravilha-das-quatro-estações"		"Salad-Bowl"	
	Média	C.V. (^a)	Média	C.V.	Média	C.V.
Diâmetro de "cabeça" (cm)	33,95	5,17	36,32	3,25	40,04	4,51
x ^(b)	33,71		34,87		36,14	
Altura de "cabeça" (cm)	16,18	20,88	18,71	1,75	25,86	6,28
x	15,93		17,78		22,56	
Peso de "cabeça" (g)	353,09	12,50	346,29	15,79	285,64	9,95
x	325,81		328,25		206,02	
Compr. de folha basal (cm)	20,00	17,49	18,98	2,74	19,46	8,57
x	19,93		18,15		16,88	
Largura de folha basal (cm)	19,00	23,68	13,58	5,90	-	-
x	18,83		13,61		-	-
Nº de folhas	35,38	2,34	62,64	4,52	41,63	3,07
x	34,36		62,85		38,98	
Compr. do pendão floral (cm)	63,99	12,08	58,16	0,34	48,19	11,58
x	66,42		54,22		46,53	

Observação: (^a) = CV = coeficiente de variação (%); x = média de controle intercalar..

Por outro lado, para as características quantitativas acima indicadas, houve um efeito mascarador ao se trabalhar com as médias de progênies, o que não permitiu a detecção de diferenças estatísticas entre elas.

Entretanto, quando foram estimados diversos parâmetros genéticos a partir de variâncias genéticas e ambientais, isoladas no mesmo modelo estatístico (Quadro 13), observou-se notável variação entre os mesmos (coeficiente de herdabilidade; coeficiente de determinação genotípico; ganho de seleção absoluto e ganho de seleção relativo), para os 3 cultivares em avaliação.

Para o caráter número de folhas os coeficientes de herdabilidade foram de elevada magnitude (42,23%; 89,79% e 91,20% para os cultivares “Maravilha-das-quatro-estações”, “Salad-Bowl” e “Grand Rapids”, respectivamente). Estes níveis de herdabilidade permitiram a detecção de bons ganhos relativos de seleção por ciclo (4,26%; 16,29% e 12,22%, respectivamente).

De maneira semelhante, os coeficientes de herdabilidade estimados foram também expressivos para o caráter comprimento do pendão floral (60,71%, 88,57% e 99,86%, para os cultivares “Grand Rapids”, “Salad Bowl” e “Maravilha-das-quatro-estações”, respectivamente, com os seguintes ganhos relativos estimados: 17,55%; 51,37% e 15,57%.

QUADRO 13. Parâmetros genéticos estimados (coeficiente de herdabilidade, no sentido amplo; coeficiente de determinação genotípico, ganho de seleção absoluto e ganho de seleção relativo) em sete caracteres agrônômicos de progênies de autofecundação, previamente regenerados *in vitro*, de três cultivares de alface.

Caráter	Parâmetros (^a) Genéticos	Cultivares		
		"Grand Rapids"	"Maravilha-das- -quatro-estações"	"Salad Bowl"
Diâmetro de "cabeça" (cm)	H ²	10,27	42,65	79,98
	b	0,34	0,86	2,00
	Gs	0,32	1,12	5,30
	Gs (%)	0,95	3,10	13,66
	x	33,95	36,32	40,04
Altura de "cabeça" (cm)	H ²	0,00	91,13	52,08
	b	0,00	3,21	1,47
	Gs	0,00	1,68	2,45
	Gs (%)	0,00	9,07	9,86
	x	6,18	18,71	25,86
Peso de "cabeça" (g)	H ²	57,57	0,00	56,10
	b	1,16	0,00	1,13
	Gs	64,93	0,00	36,46
	Gs (%)	18,71	0,00	14,26
	x	353,09	346,29	285,64
Compr. de folha basal (cm)	H ²	0,00	80,14	61,50
	b	0,00	2,01	1,26
	Gs	0,00	1,57	2,68
	Gs (%)	0,00	8,35	14,38
	x	20,00	18,98	19,46
Largura de folha basal (cm)	H ²	0,00	14,26	-
	b	0,00	0,41	-
	Gs	0,00	0,21	-
	Gs (%)	0,00	1,54	-
	x	19,00	13,58	-
Nº de folhas	H ²	91,20	42,23	89,79
	b	3,22	0,85	2,97
	Gs	4,30	2,67	6,64
	Gs (%)	12,22	4,26	16,29
	x	35,38	62,64	41,63
Compr.do pendão floral (cm)	H ²	60,71	99,86	88,57
	b	1,24	0,34	2,78
	Gs	11,33	8,90	24,48
	GS (%)	17,55	15,57	51,37
	x	63,99	58,16	48,19

Observações: (^a) H² = coeficiente de herdabilidade, no sentido amplo; b = coeficiente de determinação genotípico; Gs + ganho de seleção esperado; GS (%) = ganho de seleção relativo.

Esses dados sugerem que a probabilidade de sucesso é grande tanto para a seleção para o aumento do número de folhas, o que é comercialmente desejável, quanto para a redução significativa de incidência de florescimento durante a fase vegetativa, uma das metas prioritárias de programas atuais de melhoramento.

Para os demais caracteres quantitativos, observa-se que o cultivar “Grand Rapids” pouco ou nada responderá à seleção para diâmetro e altura de “cabeça”, comprimento e largura de folha basal, visto que as variâncias genéticas disponíveis foram reduzidas ou nulas, nas condições experimentais presentes. A única exceção foi para o caráter peso de “cabeça”, com coeficiente de herdabilidade de 57,57% e ganho de seleção relativo de 18,71%.

Os outros dois cultivares (“Salad Bowl” e “Maravilha-das-quatro-estações”) apresentaram estimativas de parâmetros genéticos de elevada magnitude para as características diâmetro e altura de “cabeça” e comprimento de folha basal, permitindo prever resposta favorável à futura seleção. Entretanto, embora o cultivar “Salad Bowl” tenha apresentado altos coeficientes de herdabilidade e ganho relativo de seleção para o caráter peso de “cabeça” (56,10% e 14,26%, respectivamente), o cultivar “Maravilha-das-quatro-estações” mostrou ausência de ganho genético.

Em pesquisa semelhante **CÔNSOLI et al** (1993) compararam diversas progênes (população R_0), originárias de plantas regeneradas *in vitro* da leguminosa forrageira *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. com outras progênes (população R_1) oriundas através de sementes, das plantas da população original. Diversos caracteres de interesse agrônomo foram avaliados, além de vários

parâmetros genético-estatísticos (coeficiente de herdabilidade, ganho de seleção esperado e outros).

Para alguns dos caracteres estudados, houve aumento de variabilidade genética da população regenerada em relação à da população original, ocorrendo o inverso para outros. Como não ocorreu aumento na variabilidade genética para os caracteres peso de massa verde (PMV) e peso de massa seca (PMS), que os autores consideram como principais no programa de melhoramento dessa forrageira, concluíram que a variação somaclonal não deve ser usada, no caso, como fonte nova de variação.

Em resumo, em nossa pesquisa, os resultados obtidos, em condições de campo, evidenciaram que o processo de regeneração de plantas *in vitro* originou variabilidade genética para caracteres qualitativos e, especialmente, quantitativos, de intensidade variável de acordo com o genótipo e caráter avaliado, passível de ser explorada em programas de seleção, visando a obtenção de novos cultivares de alface.

CONCLUSÕES

- Não ocorreram diferenças significativas entre os 3 tratamentos de desinfestação de sementes utilizados, para os cultivares de alface testados;
- As sementes dos cultivares de alface germinadas *in vitro* apresentaram diferentes graus de dormência (mais acentuada no cultivar “White Boston”), sendo descartada a hipótese inicial de baixo vigor de sementes;
- Usando-se hipocótilos como fontes de explantes e avaliando-se o efeito da cinetina, o cultivar “Great Lakes”, dentre os testados, apresentou o melhor desempenho quanto à porcentagem de calos com morfogênese de parte aérea;
- Também com a utilização do mesmo tipo de explante (hipocótilo) e avaliando-se o efeito do 6-BA, observou-se que a dose de 0,1mg/l deste fitoregulador foi considerada ótima para os cultivares testados, o que foi confirmado por regressão polinomial;
- Por outro lado, empregando-se folhas cotiledonares como explantes, subdivididos em partes distintas (proximal e distal) e testando-se diferentes doses de 6-BA, os maiores valores para os caracteres porcentagem de explantes com organogênese somática e número médio de brotos por explante foram observados no meio de cultura básico com 0,1 mg/l de 6-BA (semelhante ao ocorrido para hipocótilo) e com explante cotiledonar do tipo proximal;
- O melhor estágio de desenvolvimento da plântula para a excisão de explantes do tipo cotiledonar, tanto proximal como distal, foi o de 3 dias após o início da germinação das sementes (protusão da radícula) para o cultivar “Brasil-303”;

- A combinação 0,5 mg/l de IAA/0,1mg/l de 6-BA foi a mais eficiente quanto à produção de brotos/explante, para o cultivar “Brasil-303”.
- Comparações entre progênies, derivadas de regeneração somática *in vitro* (dentro de cada cultivar), não mostraram diferenças estatisticamente significativas quanto a diversos caracteres quantitativos (diâmetro, altura e peso de “cabeça”; comprimento e largura da folha basal; número de folhas e comprimento do pendão floral). Entretanto, em diversas plantas individuais das progênies analisadas, foram observadas variações acentuadas em caracteres qualitativos (presença/ausência de antocianina nas folhas; formato e coloração de folha; formação de “cabeça” , entre outros);
- Os caracteres número de folhas e comprimento do pendão floral, com elevados coeficientes de herdabilidade e bons ganhos relativos de seleção, presentes nos 3 cultivares, permitem prever o sucesso da seleção para o aumento do número de folhas e redução significativa da incidência de florescimento durante a fase vegetativa;
- Para os demais caracteres quantitativos estudados, ocorreu variação acentuada, entre os cultivares testados, quanto aos coeficientes de herdabilidade e ganhos de seleção esperados;
- A variação somaclonal, oriunda do processo de regeneração *in vitro*, promoveu a ocorrência de variabilidade genética, em maior ou menor intensidade, de acordo com o cultivar e o caráter avaliado, mostrando que pode ser explorada em futuros programas de melhoramento de alface.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBERGER, L.A.; PALMER, R.G. & SHOEMAKER, R.C. (1992). Analysis of culture-induced variation in soybean. *Crop Science*, 32(5): 1103-1108.
- BABCOCK, E.B.; STEBBINS, G.L. & JENKINS, G.A. (1937). Chromosomes and phylogeny in some genera of the *Crepidinae*. *Cytologia*, 1: 188-210.
- BARROS, I.B.I. (1988) . Reação de *Lactuca* sp. ao *Sclerotinia minor*. Jager e hibridação interespecífica no gênero *Lactuca*. Piracicaba, 167p. (Doutorado - ESALQ).
- BRAGA, M.R. & DIETRICH, S.M.C. (1985). Hormônios vegetais. In: Anais do III Seminário de Biotecnologia Agrícola, p. 123-148.
- BRANQUINHO, R. (1993). Estudo de um sistema indutor de mutação em milho. Dissertação de Mestrado, UNICAMP. 131p.
- BRASIL. (1992). Ministério de Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília, 365p.
- BROWN, C.; LUCAS, J.A.; CRUTE, I.R.; WALKEY, D.G.A. & POWER, J.B. (1986). An assessment of genetic variability in somacloned lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) and their offspring. *Annals of Applied Biology*, 109: 391-407.
- CHENG, X.Y.; GAO, M.W.; LIANG, Z.Q.; LIU, G.Z. & HU, T.C. (1992). Somaclonal variation in winter wheat: frequency, occurrence and inheritance. *Euphytica*, 64 (1-2): 1-10.
- CHOWDHURY, M.K.U. & VASIL, I.K. (1993). Molecular analysis of plants regenerated from embryogenic cultures of hybrid sugarcane cultivars (*Saccharum* spp). *Theoretical and Applied Genetics*, 86 (2-3): 181-188.

- COMPTON, M.E. & GRAY, D.J. (1994). Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of tetraploid watermelon. *HortScience*, 29 (3): 211-213.
- CÔNSOLI, L.; GARCIA, A.F.A.; SOUZA JR., C.L.; VIEIRA, M.L.C. (1993). Análise da variação somaclonal para caracteres quantitativos em populações de *Stylosanthes guianensis*. Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal, I, Brasília. Resumos.
- D'AMATO, F. (1952). Polyploidy in the differentiation and function of tissues and cells in plants. *Caryologia*, 4: 311-378.
- D'AMATO, F. (1985). Cytogenetics of plant cell and tissue culture and their regenerates. *CRC Critical Reviews in Plant Science*, 3: 73-112.
- DAVIES, L.J. & COHEN, D. (1992). Phenotypic variation in somaclones of *Paspalum dilatatum* and their seedlings offspring. *Canadian Journal of Plant Science*, 72 (3): 773-784.
- DIKALOVA, A.E.; DUDAREVA, N.A.; KUBALOKOVA, M. & SALGANIK, R.I. (1993). Rearrangements in sugar beet mitochondrial DNA induced by cell suspension, callus cultures and regeneration. *Theoretical and Applied Genetics*, 86 (6): 699-704.
- DOERSCHUG, M.R. & MILLER, C.O. (1967) Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa* explants. *American Journal of Heredity*, 75: 426-430.
- EDLUND, A.; EKLÖF, S.; SUNDBERG, B.; MORITZ, T. & SANBERG, G. (1995). A microscale technique for gas chromatography - mass spectrometry

- measurements of picogram amounts of indole-3-acetic acid plant tissues. *Plant Physiology*, 108: 1043-1047.
- ENGLER, D.E. & GROGAN, R.G. (1984). Variation in lettuce plants regenerated from protoplasts. *Journal of Heredity*, 75: 426-430.
- EVANS, D.A. & SHARP, W.R. (1986). Somaclonal and gametoclonal variation. In: Evans, D.A.; Sharp, W.R. & Ammirato, P.V. (eds) *Handbook of plant cell culture*. New York, Macmillan, p. 97-132.
- FARRARA, B.F.; ILOTT, T.W. & MICHELMORE, R.W. (1987). Genetic analysis of factors for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in species of lettuce (*Lactuca sativa* and *L. serriola*). *Plant Pathology*, 36 (4): 499-514.
- FILGUEIRA, F.A.R. (1982). Alface. In: Manual de Olericultura, cultura e comercialização de hortaliças, 2: 77-86.
- HANG, A. & BREGITZER, P. (1993). Study of β -amylase isozyme in mature grains of two-rowed barley and its hybrids. *Acta Genetica Sinica.*, 19(2): 122-130.
- HOAGLAND, D.R. & ARON, D.I. (1950). The water-culture method for growing plantas without soil. Univ. Calif. Agr. Expt. Sta., Berkeley - Ca. , p. 347.
- HOLLIDAY, R. (1987). The inheritance of epigenetic defects. *Science*, 238: 163-170.
- HULBERT, S.H. & MICHELMORE, R.W. (1988). DNA restriction fragment lenght polymorphism and somatic variation in the lettuce downy mildew fung *Bremia lactucae*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 1 (1): 17-24.

- ISABEL, N.; TREMBALY, L.; MICHAUD, M.; TREMBALY, F.M. & BOUSQUET, J. (1993). RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. *Theoretical and Applied Genetics*, 86(1): 81-87.
- JAIN, S.M. (1993). Somaclonal variation in *Begonia x elatior* and *Saintpaulia ionantha* L. *Scientia Horticulturae*, 54(3): 221-231.
- JOACHIMIAK, A.; PRZYWARA, L.; ILNICKI, T. & KOWALSKA, A. (1993). Megachromosomes in tissue culture of *Allium*. *Genética*, 90 (1): 35-40.
- KAEPLER, S.M. & PHILLIPS, R.L. Tissue culture induced DNA methylation variation in maize. *Proceedings of Natural Academy of Science (USA)*, 90 (19): 8773-76.
- KARP, A. & BRIGHT, S.W.J. (1985). On the causes and origins of somaclonal variation. *Plant Molecular and Cell Biology*, 2: 199-234.
- KATHAL, R.; BHATNAGAR, S.P. & BHOJWANI, S.S. (1994). Plant regeneration from the callus derived from root explants of *Cucumis melo* L. cv. Pusa sharbati. *Plant Science*, 96 (1-2): 137-142.
- KEIMER, L. 1924. Garden Plants in Ancient Egypt. Hamburg and Berlin.
- LANDRY, B.S.; KESSELI, R.V.; FARRARA, B. & MICHELMORE, R.W. (1987). A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics*, 116(2): 331-337.

- LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. (1981). Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60: 197-214.
- LEBEDA, A. (1989). Response of lettuce cultivars carrying the resistance gene DM11 to isolates of *Bremia lactucae* from *Lactuca serriola*. *Plant Breeding*, 102(4): 331-316.
- LINACERO, R. & VAZQUEZ, A.M. (1992). Genetic analysis of chlorophyll - deficient somaclonal variants in rye. *Genome*, 35 (6): 981-984.
- LINDQVIST, K. (1960). Inheritance studies in lettuce. *Hereditas*, 46: 387-470.
- MALUF, W.R.; MIRANDA, J.E.C. & FERRARA, P.E. (1983). Broad-sense heritabilities of root and vine traits in sweet potatoes (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Revista Brasileira de Genética*, 6 (3): 443-451.
- MICHELMORE, R.W. & EASH, J.A. (1986). Lettuce. In: Handbook of plant cell culture. Techniques and applications (Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V., eds). Macmillan, New York, p. 512-551.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- NAGAI, H. (1979). Alfaca. In: 31º Congresso Brasileiro de Olericultura, 1991, p. 126-127.
- NAGAI, H. (1989). PI 342517, uma introdução de alface com resistência ao vírus do "vira-cabeça". *Horticultura Brasileira*, 7 (1): 66.

- NAGAI, H. (1993). Alface tipo manteiga. In: Melhoramento de plantas do Instituto Agronômico de Campinas (A.M.C.Furlani & G.P. Viegas, eds), p. 204-221.
- NETZER, D.; GLOBERSON, D.; WEINTAL, C. & ELYASSI, R. (1985). Sources and inheritance of resistance to *Stemphylium* leaf spot of lettuce. *Euphytica*, 34(2): 393-396.
- OCHOA, O.; DELP, B. & MICHELMORE, R.W. (1987). Resistance in *Lactuca spp* to *Microdochium panattoniana* (Lettuce anthracnose). *Euphytica*, 36(2): 609-614.
- OLIVEIRA, S.A. (1984). Estudos genéticos sobre alface (*Lactuca sativa* L.). In: Seminários de Olericultura, vol. X (Heredia., M.C.V. & Casali, V.W.D., eds), Viçosa - MG, p. 01-21.
- PARAN, I.; KESSELI, R. & MICHELMORE, R. (1991). Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. *Genome*, 36(6): 1021-1027.
- PESCHKE, V.M. & PHILLIPS, R.L. (1992). Genetic implications of somaclonal variation in plants. In: Advances in Genetics, vol. 30 (Scandalios, J.G.; Wright, T.R.F., eds), p.41-75.
- PHILLIPS, R.L.; KAEPLER, S.M. & PESCHKE, V.M. (1990). Do we understand somaclonal variation? In: VIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture Proceedings, p. 131-141.

- PINK, D.A.C.; LOT, H. & JOHNSON, R. (1992). Novel pathotypes of lettuce mosaic virus-break down of a durable resistance? *Euphytica*, 63 (1-2): 169-174.
- PINTO, C.A.B.P. Melhoramento de Hortaliças. Piracicaba, 1977. 1-23 p. (mimeografado).
- POTTER, R. & JONES, M.G.K. (1991). An assessment of genetic stability of potato *in vitro* by molecular and phenotypic analysis. *Plant Science*, 76: 239-248.
- PUNIA, M.S.; BEHL, R.K. & SINGH, H. (1993). Plant regeneration in *Brassica species* - effect of genotype and culture medium. *Annals of Biology*, 9 (2): 230-234.
- RAO, I.M.; ROCA, W.M.; AYARZA, M.A.; TABARES, E. & GARCIA, R. (1992). Somaclonal variation in plant adaptation to acid soil in the tropical forage legume *Stylosanthes guianensis*. *Plant and Soil*, 146 (1-2): 21-30.
- RICK, C.M. (1978). The tomato. *Scientific American*, 239 (2): 67-76.
- ROBINSON, R.W.; MCCREIGHT, J.D. & RYDER, E.J. (1982). The genes of lettuce and closely related species. In: *Plant Breeding Reviews*, 1, p. 267-293.
- RYDER, E.J. & WHITAKER, T.W. (1976). Lettuce *Lactuca sativa*. (Compositae). In: *Evolution of Crop Plants*, N.W. Simmonds (ed.) p. 39-41.
- RYDER, E.J. (1985). Use of early flowering genes to reduce generation time in backcrossing, with specific application to lettuce breeding. *Journal of American Society Horticultural Science*, 110(4): 570-573.

- RYDER, E.J. (1989). Studies of three new genes, linkage, and epistasis in lettuce. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 114(1): 129-133.
- SASAKI, H. (1982). Effect of temperature and light on adventitious bud formation of lettuce hypocotyl tissue cultured *in vitro*. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science*, 51:187-194.
- SECOR, G.A. (1983). Variation in plants regenerated from protoplasts. *Phytopathology*, 73(5): 772-773.
- SIBI, M. (1976). La notion de programme genetique chez les vegetaux superieurs. II. Aspect experimental. Obtention de variants par culture de tissues *in vitro* sur *Lactuca sativa* L. apparition de vigueur chez les croisements. *Annales de L'amélioration des Plantes*, 26(4): 523-547.
- SIBI, M. (1984). Heredity of epigenetic variant plants from culture *in vitro*. In: Proceedings of the 10th Congress of the European Association for Research on Plant Breeding (Lange, W.; Zeven, A.C.; Hogenboom, N.G., eds.), p. 196-198.
- SILVAROLLA, M.B. (1987). Plant genomic alteration due to tissue culture. *Ciência e Cultura*, 44(5): 329-335.
- SITA, G.L. (1991). Tissue-cultured sandalwood. *Current Science*, 61(12):794.
- SKIRVIN, R.M., NORTON, M. & McPHEETERS, K.D. (1993). Somaclonal variation: Has it proved useful for plant improvement? *Acta Horticulturae*, 336: 333-340.

- SPRINGER, W.D.; GREEN, C.E. & KHON, K.A. (1979). A histological examination of tissue culture initiation from immature embryos of maize. *Protoplasma*, 101, 269-281.
- SWEDLUND, B. & VASIL, I.K. (1985). Cytogenetic characteristics of embryogenic callus and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. *Theoretical and Applied Genetics*, 69: 575-581.
- ULVSKOV, P.; NIELSEN, T.H.; SEIDEN, P. & MARCUSSEN, J. (1992). Cytokinins and leaf development in sweet pepper (*Capsicum annum* L.). *Planta*, 188: 70-77.
- VANDEMARK, G.J.; STANGHELLINI, M.E.; RASMUSSEN, S.L. & MICHELMORE, R.W. (1992). Inheritance of resistance in lettuce to *Plasmopara lactucae - radicis*. *Phytopathology*, 82(3): 273-274.
- WATTANASIRI, C. & WALTON, P.D. (1993). Effects of growth regulators on callus cell growth, plant regeneration, and somaclonal variation of smooth brome grass (*Bromus inermis* Leyss.). *Euphytica*, 69(1-2): 77-82.
- WAUGH, R. & POWELL, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotechnology*, 10(6): 186-191.
- WAYCOTT, W. & TAI, L. (1991). Phenotypic characterization of lettuce dwarf mutants and their response to applied gibberelins. *Plant Physiology*, 95(4): 1162-68.
- WEBB, D.T.; TORRES, L.D. & FOBERT, P. (1984). Interactions of growth regulators, explant age, and culture environment controlling organogenesis

from lettuce cotyledons *in vitro*. *Canadian Journal of Botany*, 62(3): 586-590.

ZATARIN, M. (1985). Comportamento de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) em diferentes épocas de plantio. Piracicaba, 90 p. (Mestrado - ESALQ).

ZHANG, X.R. & CONNER, A.J. (1992) Genotypic effects on tissue culture response of lettuce cotyledons. *Journal of Genetics and Breeding*, 46(3): 287-290.