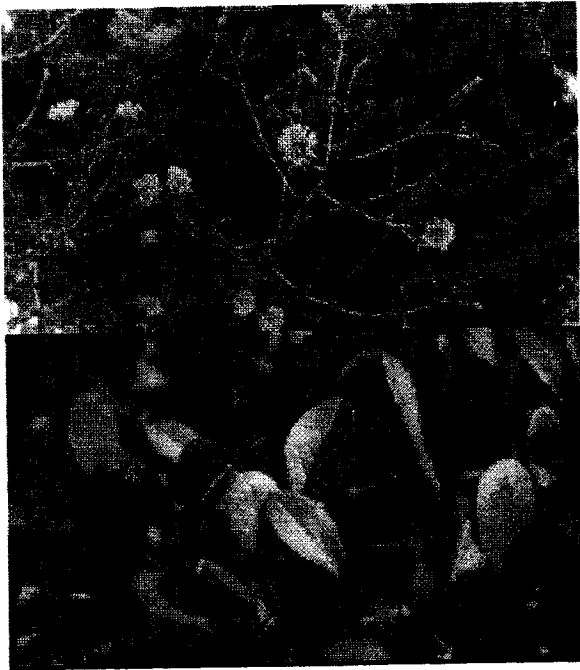


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DEFINIÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA MORFOGÊNESE
INDIRETA EM ALFACE VARIEDADES VERÔNICA E MAIOBA**



Ana Paula de Oliveira Ribeiro

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia -MG
Dezembro - 1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DEFINIÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA MORFOGÊNESE
INDIRETA EM ALFACE VARIEDADES VERÔNICA E MAIOBA**



Ana Paula de Oliveira Ribeiro

Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr
Orientador

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia -MG
Dezembro - 1999

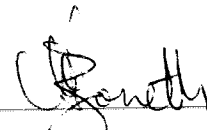
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DEFINIÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA MORFOGÊNESE
INDIRETA EM ALFACE VARIEDADES VERÓNICA E MAIOBA**


Ana Paula de Oliveira Ribeiro

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 22/12/99

NOTA: 100



Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti
Substituta do Orientador



MSc. Cícero Donizete Pereira
Co-orientador

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ANEXO I - TÍTULO DE ORIENTADOR
PROF. DR. JOSÉ MAGNO QUEIROZ LUZ
CO-ORIENTADOR
CÍCERO DONIZETE PEREIRA
CO-ORIENTADOR
ANA PAULA DE OLIVEIRA RIBEIRO
ALUNO

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz
Co-orientador

Uberlândia, 22 de dezembro de 1999

Dedicatória

Dedico este trabalho ao Theodoro, Eliana, Enilce e Dinair, pessoas que com amor me incentivaram e contribuíram para a execução deste trabalho.

Agradecimentos

Neste momento gostaria de demonstrar humildemente minha gratidão, MUITO OBRIGADA.

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, pela confiança, conselhos, amizade e “puxões de orelha” que recebi durante estes 4 anos de jornada.

Ao Cícero Donizete Pereira, amigo que em todos os momentos de desespero (foram muitos) e alegria estava ao meu lado, apoiando e ensinando a fazer Ciência.

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti, pelo carisma, confiança e como não podia faltar os “ralas”, “mãezinha” do PET e da Ciência.

À MSc. Maria Eugênia Lisei de Sá que me acolheu em seu laboratório e com paciência corrigiu erros ainda não percebidos durante os “anos de pesquisa” e orientou parte da pesquisa desenvolvida em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz, que apesar de um “pouco tarde” me aconselhou, sempre presente nos momentos necessários (principalmente nas horas de “tirar dúvidas”).

Aos amigos, do PET: Barbrinha, Carlim, Elis, Kaila, Wilson, Laiena, Londe, Raquel, Jackie, Fran, Braynner, Bruninho, Cris, Dani, Fer Biase, Fer Lourenço, Kátia, Lu, Magno, Pri, Rod, que direta ou indiretamente (escutando minhas reclamações) estavam sempre presentes. Vocês foram muito importantes...

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos: Célia e Alcione que me apresentaram o Laboratório, a querida Tininha, Frederico e Katiere, companheiros de jornada e amigos.

À Rosana que me aconselhou em muitas situações, pela correção da mesma e amizade.

Aos companheiros da Genética:, Soraya, Vânia, Gislene, Colleto, Tininha(s), Ana Paula, Flavinha, Viviane, Juliana Côbo, Brunnão, Maurício (s), Leo, e tantas outras pessoas, que mesmo a distância (em outros laboratórios) me ajudaram, aconselharam e, principalmente reclamaram na minha ausência.

Ao Victor (especialmente, por não me deixar desistir de um Sonho), Adriano e Wesley, pessoas que não tem a mesma formação acadêmica ou trabalham com Genética, mas nem por isso deixaram de ser importantes e estar presentes durante a coleta de dados, organização e confecção desta, com correções e críticas.

Aos técnicos João, Paulo e Francisco que sempre me ajudaram em momentos tão difíceis, principalmente para mim, no campo...

Aos companheiros de sala: Fabiane, Francislene, Taty, Andréia, Vanessa, Felipe, Adriana, Leonardo Brasil, Luciene e tantos outros.

À CAPES, que permitiu que eu fizesse parte de um grupo tão importante para minha formação e financiou este e outros projetos.

E claro quem não poderia faltar, à DEUS, por simplesmente me permitir viver todas essas coisas e sempre estar ao meu lado...

Resumo

O Objetivo do presente trabalho foi determinar um protocolo eficiente de regeneração *in vitro* da cultivar de *L. sativa* Maioba, como suporte para o uso na produção de plantas resistentes à septoriose. Verificar a melhor composição hormonal, com diferentes concentrações de 6-BAP (6 - Benzilaminopurina) e ANA (Ácido Naftalenoacético) para explantes foliares de alface variedade Verônica; e selecionar a posição do explante foliar no meio de cultura para regeneração de Verônica, *in vitro*. Folhas de alface vr. Verônica e sementes e folhas da vr. Maioba, foram desinfestadas, seccionadas e cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura. Os meios básicos utilizados consistiram de sais e vitaminas de Murashigue & Skoog (1962), suplementados com 3% de sacarose e 0,7% de ágar. Foram adicionadas diferentes combinações de concentrações de ANA e 6-BAP. Para indução de brotação, foi utilizado meio básico sem reguladores de crescimento ou com 0.05mgL⁻¹ de ANA e 0.2mgL⁻¹ de 6-BAP. Os brotos obtidos na vr. Verônica foram cultivados em meio básico livre de hormônios. Foram avaliados e recultivados no meio de indução de brotação. Em 30 dias, as brotações com folhas diferenciadas foram transferidas para meio de enraizamento. Com a vr. Maioba não foram obtidos brotos, apenas calos, durante os experimentos. Houve altas taxas de contaminação na bateria I vr. Verônica, mas pôde-se verificar diferentes respostas entre os mesmos, sendo os mais responsivos os tratamentos de números 14, 15 e 16. Em relação à melhor posição do explante em contato com o meio, o desenvolvimento se deu na região abaxial, independente do contato com o meio. As folhas de plântulas estabelecidas *in vitro*, apresentaram baixa resposta em elevado tempo. O melhor resultado na vr. Maioba foi obtido com MS16, que produziu 1.5 calo/placa em 12 dias. Devido ao número e tamanho dos calos obtidos e a não obtenção de brotos, foi feito um novo experimento utilizando-se o Tratamento 1, como Controle Negativo, o Tratamento 16 como positivo e os Tratamentos Ma e Sa. Obteve-se resposta melhor em tempo menor, quando comparado com a bateria II de experimentos. Para brotação utilizou-se o meio MSbI, desprovido de reguladores de crescimento. Como a resposta foi negativa a este tratamento, transplantou-se os calos para MSbII (0.2mg/L de BAP e 0.05mg/L de ANA). Os explantes mantiveram a resposta, não havendo formação de parte aérea.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Alface – <i>Lactuca sativa</i>	01
1.2. Melhoramento de plantas	06
1.3. Septoriose – <i>Septoria lactucae</i>	08
1.4. Cultura de Tecidos	10
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Protocolo para organogênese indireta de explantes foliares retirados de plantas cultivadas em campo, de alface vr. Verônica	14
3.2. Protocolo para organogênese indireta de explantes foliares retirados de plântulas estabelecidas <i>in vitro</i> de alface, vr. Maioba	16
3.3. Protocolo para organogênese indireta de explantes foliares retirados de plantas adultas em pendramento cultivadas em condições de campo, de alface vr. Maioba	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Organogênese indireta de alface vr. Verônica	20
4.2. Organogênese indireta de alface vr. Maioba	25
4.3. Organogênese indireta de alface vr. Maioba	27
5. CONCLUSÕES	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
7. ANEXO	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alface (*Lactuca sativa*)

A alface pertence a Família Asteraceae, Subfamília Lactuceae, ao Gênero *Lactuca*, e Espécie *Lactuca sativa*, Linnaeus (1754). A partir de células de antera fixadas pelo método de Carnoy, MENEZES (1943) encontrou, para a variedade Romana, n=9 cromossomos. LADRY *et al.* (1987) encontraram 9 grupos de ligação para alface, cultivares Calmar e Kordaat, confirmando que o número do conjunto haplóide é igual a 9 cromossomos.

A origem da alface cultivada é um assunto discutido por vários autores. LINDQVIST (1960) levantou quatro possibilidades sobre a origem desta, a saber: a partir de formas silvestres de *Lactuca sativa*; a partir de *L. serriola*; a partir de híbridos entre *L. sativa* e *L. serriola* e, ainda, a partir da hibridação entre as diferentes espécies da secção. Este autor sugere que a hipótese mais provável é a última, o que dificulta a exata localização da origem da espécie cultivada.

A alface parece ter-se originado no Velho Mundo, há cerca de 11.000 a 5.000 anos atrás, sendo o Mediterrâneo o seu principal centro. O primeiro registro dessa hortaliça veio do Egito e seu cultivo espalhou-se para a Grécia, Roma e, posteriormente, para a China. Existem registros de *L. sativa* no Egito, na forma semi-silvestre. A população local utiliza suas sementes para a extração de óleo e suas folhas para alimentar animais (LINDQVIST, 1960; HANCOCK, 1992).

O mecanismo de polinização é cleistógamo, ou seja, com autopolinização anterior a abertura das flores. HANCOCK (1992) afirma que ocorre a autofecundação devido à proximidade entre as anteras e pistilos,

nas flores hermafroditas. Além disso, nessa espécie as flores nunca se abrem completamente, dificultando a polinização cruzada.

SANTOS (1996) afirma que cerca de 24 horas antes da antese, as brácteas que circundam o capítulo começam a abrir-se no topo devido ao desenvolvimento dos botões florais. As flores abrem-se em um único dia, iniciando o processo às 5h da manhã, durante uma a duas horas; as anteras depositam o pólen sobre a inflorescência e os estigmas se alongam tornando-se receptivos e polinizados. Após duas horas a corola fecha-se firmemente sobre a flor e não se abre mais. Em dois ou três dias as corolas, estames, estiletes e estigmas estão murchos. A ponta do jovem fruto alonga-se e eleva as cerdas em seu crescimento. As sementes são formadas em um período de aproximadamente 20 dias após a fecundação dos óvulos.

Em todo o mundo a alface é uma hortaliça popular, sendo uma das mais importantes do ponto de vista econômico. A alface foi introduzida no Brasil pelos portugueses há mais de 400 anos. Neste país as folhas são utilizadas na alimentação, consumidas geralmente cruas e em alguns locais, são refogadas ou passadas em azeite (HANCOCK, 1992; SANTOS, 1996). O seu consumo *in natura* favorece o aproveitamento de vitaminas e sais minerais, pelo organismo humano (SONNEMBERG, 1985 *apud* HEREDIA ZÁRATE *et al.*, 1997).

É uma das hortaliças folhosas mais consumida *in natura*, no Brasil. Segundo NADAL *et al.* (1986) *apud* PEREIRA (1998) a alface, no Brasil, é a sexta hortaliça em termos de importância econômica, ou seja, valor de produção e a oitava em relação ao volume produzido. O Estado de São Paulo é o maior produtor, apresentando uma produção de 52,4% do total do país.

No Centro Estadual de Armazéns Gerais do Estado de São Paulo (CEAGESP) a média anual de comercialização de alface, entre 1992 e 1996, foi de 24.814 toneladas (AGRIANUAL, 1998).

A alface é uma planta anual que, na região do Cerrado, floresce em qualquer época do ano, independente da temperatura. No início do florescimento, a planta emite um pendão floral que forma uma inflorescência ramificada com numerosos capítulos florais, de cor amarelo intenso (SANTOS, 1996). As raízes são do tipo pivotante, atingindo até 60 cm de

profundidade, com ramificações delicadas, finas e curtas, que exploram, essencialmente, 25 cm do solo, sendo considerada uma cultura de raízes densas e superficiais (FILGUEIRA, 1982).

A alface não é tolerante a solos ácidos, exige pH entre 6.0-6.8, para boa produção. Devido ao ciclo de vida curto, à grande área foliar, à delicadeza e superficialidade de seu sistema radicular, produz melhor em solos areno-argilosos, bem soltos, ricos em matéria orgânica, com alta disponibilidade em nutrientes nas camadas superficiais e com teor de água útil mantido acima de 90% (FILGUEIRA, 1982).

É uma hortaliça que apresenta ciclo de vida curto, por isso é considerada exigente em nutrientes e destina-se à produção de folhas para consumo respondendo, preferencialmente, ao fornecimento de nitrogênio (FERREIRA *et al.*, 1993 *apud* VIDIGAL *et al.*, 1997). A adubação excessiva com nitrogênio, independente da fonte ser mineral ou orgânica, leva ao acúmulo nas folhas, representando ameaça aos consumidores (CASTRO & FERRAZ JR., 1998).

O seu cultivo concentra-se nas proximidades dos grandes centros urbanos, dada a sua alta perecibilidade pós-colheita, alto custo do transporte e perdas de qualidade com a movimentação a grandes distâncias. A característica observada pelos consumidores é o diâmetro médio da cabeça, sendo também utilizada na classificação para comercialização. O aumento no número de folhas e ganho de peso fresco são desejáveis na produtividade.

É uma cultura de inverno, produzindo melhor sob temperatura amena, sendo que temperaturas mais elevadas (20 a 30°C) aceleram o ciclo cultural e resultam em plantas com caules alongados e folhas de tamanho e número reduzidos, ou seja, com menor produtividade e, também, com presença de um indesejável sabor amargo, impróprias para o consumo (HERKLOTS, 1972; FILGUEIRA, 1982; DUARTE *et al.* 1991).

No Sul do Brasil o seu cultivo, ao longo do ano, passa por dois períodos desfavoráveis, devido às condições meteorológicas, sendo o primeiro nos meses de inverno, com temperaturas inferiores à 10°C e precipitações pluviométricas prolongadas que retardam o crescimento e danificam as

plantas, e, o segundo, no verão, que apresenta temperaturas elevadas, acima de 20°C e elevada intensidade de radiação solar, favorecendo o pendoamento precoce das plantas (SEGOVIA *et al.*, 1997). Na Zona Geográfica do Triângulo Mineiro, também, é uma das hortaliças mais importantes, produzida o ano todo e, largamente, consumida.

Durante séculos, a alface vem sendo selecionada pelo homem de acordo com o tipo de semente, gosto, tamanho, cor e formato. Mais recentemente, programas de melhoramento controlados vem sendo desenvolvidos procurando resgatar características importantes que podem ter sido perdidas durante o processo de seleção não controlado. Características como resistência a doenças, teor nutricional, tolerância à variações climáticas, formação de cabeça e florescimento tardio podem ser encontradas em ancestrais das plantas cultivadas (SANTOS, 1996).

Outras características importantes a serem selecionadas são a adaptação ao clima local, resistência ao calor e moléstias, aumento de produção e pendoamento tardio. Observa-se, também, a exuberância dos sistemas radiculares pois, esse é um fator indispensável, já que raízes volumosas são base de maior sustentação da planta e de melhor aproveitamento de nutrientes do solo (CHARCHAR & MOITA, 1996).

A alface pode ser produzida em pequena ou grande escala. Seu plantio é fácil e pode ser feito em áreas pequenas. Com o melhoramento, obteve-se alfaves tolerantes a solos ácidos, o que facilitou seu plantio nas regiões de Cerrado (KERR *et al.*, 1990). Com os investimentos em estufas e hidroponia, o produtor pode produzir alface de boa qualidade o ano inteiro (SANTOS, 1996).

Uma nutrição insuficiente, notadamente, em nitrogênio, promovem ganho em peso, pois reduzem a fotossíntese, ocorre menor crescimento e absorção de água e, conseqüentemente, as folhas são menores e com um maior teor de matéria seca (VIDIGAL *et al.*, 1997).

A vr. Maioba é tipo Romana, ou seja, suas folhas são crespas, consistentes, soltas, sem formarem cabeça, como a Grand Rapid e suas seleções. É uma cultivar desenvolvida no Maranhão, a partir de um mutação para verde-escuro e várias seleções visando maior tamanho e pendoamento

tardio. Apresenta sistema radicular bem desenvolvido, adaptado aos solos ácidos e condições climáticas da ilha. Suas sementes são pretas com aproximadamente 4.2mm, com excelente germinação (cerca de 1.1/dia), possui 6.500 UI de vitamina A e o dobro de vitamina C da cultivar inicial (KERR *et al.*, 1986; KERR *et al.*, 1990; CARNELOSSI *et al.* 1995).

No grupo de folhas soltas e crespas também está a cultivar Verônica, que é indicada para condições de Verão, sendo a cultivar mais plantada no sistema de hidroponia.

1.2. Melhoramento de Plantas

As plantas são importantes para o homem em diversos setores, por exemplo: na alimentação, no vestuário, em medicamentos e em materiais de construção. Possuem na nossa vida uma importância primordial e, por isso, é natural que os homens tenham, desde longa data, se preocupado em desenvolver tipos mais adequados as suas necessidades (ALLARD, 1971).

Com o melhoramento, uma ciência muito antiga, que surgiu junto com a civilização, as plantas foram modificadas de diferentes maneiras devido ao cultivo e a maioria tem pequena semelhança com suas ancestrais. Essas modificações tem origem na seleção de características específicas feita pelas populações, durante vários anos (SANTOS, 1996).

Darwin e Mendel estabeleceram os princípios da hereditariedade e as regras que governam a variação nas espécies e os geneticistas tornaram as técnicas de melhoramento refinadas, rápidas, precisas e produtivas. Entretanto, não existem receitas prescritas para o desenvolvimento de novas cultivares. Para tal, o melhorista deve avaliar de forma crítica cada situação, otimizar os recursos disponíveis e observar a relação custo-benefício (BORÉM, 1997).

O melhoramento é um processo que necessita de suporte, tais como os dados biológicos referentes à planta estudada: época de floração, tipo de polinização e polinizador, tipo de sementes e metodologia para o armazenamento. Segundo Carnelossi *et al.* (1995) informações sobre a germinação das sementes de novas cultivares orientam os trabalhos de seleção e melhoramento, pois revelam características de origem genéticas, além das condições ecológicas a que a planta-mãe é submetida durante a formação das sementes, bem como as condições de armazenamento.

Atualmente, a tendência é a diminuição do uso de agrotóxicos com o objetivo de proteger o ambiente. Para tal, desenvolvem-se programas de melhoramento, visando resistência às pragas e doenças. O impacto de pesticidas e produtos químicos no meio tenderá a diminuir muito com o lançamento no mercado, de cultivares resistentes, que vem sendo selecionados pelos geneticistas (SANTOS, 1996). A incidência de doenças

leva a grande perda, contribuindo para o desequilíbrio da demanda e da oferta de alimentos em todo o mundo. No melhoramento convencional, 25% dos recursos são destinados ao melhoramento, visando aumentar a resistência das cultivares, reduzindo os custos e o impacto ambiental de tais produtos (BORÉM, 1997).

1.3. Septoriose (*Septoria lactucae*)

A septoriose é uma importante doença na cultura de alface, provocada pelo *Septoria lactucae* Passerini, fungo que pertence à Classe Deuteromiceto. Esse fungo possui como estrutura somática, hifas septadas e só são conhecidas as estruturas de reprodução assexual, os conídeos. O fungo é transmitido pela semente, por conídios aderentes a sua superfície (GALLI, 1980).

Os conídios são disseminados, principalmente, pela água de chuva, o que implica na necessidade de alta umidade para a disseminação da doença. A temperatura ótima para o patógeno situa-se entre 20 e 25°C, embora sua amplitude possa variar entre os 10 e 28°C (GALLI, 1980).

É uma doença de importância econômica, por resultar na perda das plantas contaminadas. É comum nas regiões de temperatura amena, ocorrendo, principalmente, em épocas chuvosas, sendo bastante disseminada no centro-sul do Brasil, especialmente em São Paulo. As plantas afetadas apresentam, em suas folhas, numerosas manchas necróticas de tamanho e formas irregulares (GALLI, 1980; PINTO *et al.*, 1995; SANTOS, 1996; KIMATI *et al.*, 1997).

As manchas necróticas apresentam o centro da lesão escuro, oliváceo para negro e numerosos corpos de frutificação de *S. lactucae* na sua parte central. O tecido necrosado das lesões pode se romper e cair. A incidência de muitas manchas resulta no crestamento e conseqüente perda das folhas afetadas, geralmente, as mais velhas e externas. A doença é, especialmente, importante em plantas destinadas à produção de sementes, uma vez que o crestamento das folhas resulta na morte da planta (GALLI, 1980).

GALLI (1980) afirma que existe uma correlação entre o desenvolvimento da doença e a ocorrência de condições ótimas para o desenvolvimento do patógeno, que se multiplicará e disseminará por meio de reprodução assexual, importante, portanto, para a identificação pelos fitopatologistas.

Exemplos de condições limitantes para a sobrevivência de *S. lactucae* são a falta chuva e a baixa umidade, pois a dispersão dos esporos depende disso (SANTOS, 1996).

A resistência, o crescimento e produção das plantas é uma característica genética altamente influenciada pelo ambiente. O metabolismo vegetal depende dos nutrientes minerais disponíveis à planta. Considerando-se a tendência mundial em minimizar o uso de defensivos agrícolas, com base na preservação do meio e da saúde humana, a nutrição mineral pode ser considerada como uma alternativa viável para aumentar a resistência das plantas às doenças. Os elementos funcionam como parte de um complexo sistema de relações interdependentes, os quais influenciam a patogênese e dependem das características físicas e químicas do solo, clima, fontes e quantidades dos nutrientes usados.

A resistência tem como base, modificações na anatomia das células epidérmicas: mais grossas, lignificadas e/ou silificadas, e nas propriedades fisiológicas e bioquímicas, como a produção de substâncias inibidoras ou repelentes, ou ainda, quando nutrientes essenciais à atividade patogênica estão ausentes. Esses efeitos são geralmente visualizados em plantas consideradas parcialmente resistentes.

A Maioba é uma alface suscetível a septoriose e o seu controle fitossanitário de plantas cujas folhas são consumidas *in natura* em saladas, deve ser praticado com cuidado especial. Outras alternativas para o controle dessa doença são as medidas de controle aplicadas na dependência das condições locais, são: utilização de sementes sadias; rotação de cultura por 3 a 4 anos; pulverizações com fungicidas à base de tiocarbamatos durante os primeiros estágios de desenvolvimento da planta (SANTOS, 1996).

Ultimamente, vários trabalhos de pesquisa têm voltado a atenção para a transformação genética de plantas, visando a obtenção de plantas transgênicas resistentes à doenças, pragas, herbicidas e com melhor qualidade nutricional. Há, portanto, necessidade de se desenvolver protocolos de regeneração *in vitro*, que são imprescindíveis para o sucesso da técnica.

1.4. Cultura de Tecidos Vegetais

A Cultura de Tecidos são técnicas que visam obter plantas a partir de explantes, os quais podem ser: meristemas, partes de folha, raízes, caules, anteras ou protoplastos. Essa técnica baseia-se na totipotencialidade celular, ou seja, na capacidade de uma célula qualquer da planta regenerar uma nova planta, visto que possui toda a informação genética necessária para isso.

Os explantes são estabelecidos em meios nutritivos conhecidos como meio de cultura, esses podem apresentar Reguladores de Crescimento ou fitohormônios, substâncias que regulam o comportamento *in vitro* da planta. O balanço dessas substâncias indica a provável resposta do explante, pois essas exercem funções vitais, estimulando ou inibindo processos bioquímicos e/ou fisiológicos, necessários para a manutenção da vida da planta. Essas substâncias são as citocininas, auxinas, giberelinas, etileno e inibidores que, *in vivo*, são produzidas em quantidades ínfimas e em determinadas regiões da planta. SKOOG e MILLER (1957) descrevem que o balanço destas substâncias causam respostas, tais como: quando a taxa de auxina é alta ocorre o enraizamento dos brotos; proliferam-se brotos quando a concentração de citocinina é alta e quando encontram-se em concentrações intermediárias, há uma proliferação de calos.

Calos são tecidos diferenciados e não organizados que são utilizados em alguns experimentos. Este tecido apresenta uma alta taxa de mutação chamada de variação somaclonal a qual é semelhante à mutação natural. Segundo MCCLINTOCK (1984) *apud* PHILLIPS (1994) os estresses induzem respostas que levam um genoma a se modificar quando em confronto com condições não naturais. O crescimento e a regeneração, são indicativos de baixo nível de estresse celular, que é refletido na, relativamente, baixa frequência de mutação.

PARDUE (1991) *apud* PHILLIPS (1994) hipotetizou que a estabilidade genômica é resultado de um padrão de balanços e reparos. A mutação ocorre, principalmente, quando envolve condições desfavoráveis de cultura

que podem causar falha no controle celular, levando a numerosas modificações nos indivíduos regenerados.

Atualmente, Cultura de Tecidos é usada como alternativa nos programas de melhoramento e, muitas vezes, é a única solução para alguns problemas (TORRES *et al.*, 1998). Pode-se obter um número maior de clones em espaço de tempo menor, propagar plantas livres de doenças (resolvendo problemas fitossanitários importantes), economizar custos e espaço, minimizar o efeito da estação, obter mutantes sólidos, obter, rapidamente, plantas homozigotas, que serão utilizadas como progenitores no cruzamento e obtenção de híbridos (PARANHOS, *et al.*, 1996; TORRES *et al.*, 1998).

De acordo com os objetivos do melhoramento, pode-se utilizar essas técnicas para conservação de germoplasma *in vitro*, aumentar a variabilidade genética por meio de cruzamentos interespecíficos ou intergenéricos; multiplicar genótipos para análise; obter variantes somaclonais; obter transformantes via engenharia genética; quebrar barreiras de incompatibilidade e transferir genes de interesse para espécies alvo, por meio de introgressão (ILLG & SIQUEIRA, 1984; TORRES *et al.*, 1998).

As principais desvantagens das técnicas de cultura de tecidos são instabilidade genética em alguns casos; enraizamento difícil em plantas lenhosas; aclimação complicada; perda da capacidade regenerativa após repetidas subculturas, principalmente, em culturas de calos e suspensão de células.

As plantas, durante o processo de regeneração, podem apresentar recalitrância, fenômeno desvantajoso no qual os explantes não respondem aos estímulos externos apesar de apresentarem toda a informação genética necessária; outros fatores, igualmente importantes para a regeneração, não foram completamente determinados. MANTELL *et al.* (1994) afirmam que a regeneração de algumas espécies pode ser muitas vezes esporádica e transitória e, além disso, após algumas repicagens as culturas podem perder o seu potencial de desenvolvimento.

Os vários fatores que influenciam na resposta de um explante, tanto no tipo de expressão da morfogênese quanto nos ritmos de proliferação são: o seu estado fisiológico e o das plantas doadoras, a composição dos meios de

cultura, as condições ambientais dentro e fora da cultura, os genótipos usados na propagação e, ainda, vários problemas técnicos associados com a contaminação persistente do meio por microorganismos e com a estabilidade contínua da capacidade regenerativa das culturas (MANTELL *et al.*, 1994).

As células apresentam um comportamento resultante de complexa cascata de programas genéticos que são sensíveis a modificações devido à condições de estresses bióticos e abióticos, que ocorrem quando o fragmento de tecido é excisado da planta e estabelecido *in vitro* (PHILLIPS *et al.*, 1994).

Varição somaclonal ocorre em plantas regeneradas de cultura de tecidos, principalmente quando utiliza-se formação de calos. Essa apresenta uma alta frequência de variação, de 10 até 100%. A grande maioria dessas variações não são herdáveis, podendo ser consideradas variações epigenéticas ou transitórias, causadas pelo próprio estresse fisiológico, os quais estão submetidas os explantes (ILLG, 1990).

2. OBJETIVOS

- ♦ Obter um Meio de Cultura ótimo e verificar a posição do explante foliar no meio de cultura para regeneração da vr. Verônica, *in vitro*;
- ♦ Determinar um protocolo de regeneração, *in vitro*, da vr. Maioba, como suporte para seleção de indivíduos resistentes à septoriose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais da Fazenda Experimental Getúlio Vargas - EPAMIG na cidade de Uberaba-MG e do Departamento de Genética e Bioquímica, no *Campus* Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, na cidade de Uberlândia - MG.

3.1. Protocolo para organogênese indireta a partir de explantes foliares retirados de plantas cultivadas em campo, de alface vr. Verônica

No Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais - EPAMIG/Uberaba, testou-se 16 tratamentos com combinações hormonais de 6-BAP (6-Benzilaminopurina) e ANA (Ácido Naftalenoacético) em alface vr. Verônica.

Folhas, com aproximadamente 20cm de comprimento, provenientes de cultivo em hidroponia, foram utilizadas como fonte de explantes. Estas foram desinfestadas sob câmara de fluxo laminar horizontal, em etanol a 70% por um minuto e em solução de hipoclorito de sódio 0.6%, durante 10 minutos. Em seguida, foram lavadas com água estéril 3 vezes subsequentes. Com auxílio de um vazador de 1cm de diâmetro, os explantes foram retirados e cultivados em Placas de Petri, contendo meio de cultura. Foram inoculados 5 explantes em cada placa. Os tratamentos constituíram-se de 4 placas com explantes cultivados com a parte abaxial em contato com o meio e outras 4, com a parte adaxial. Cada placa foi considerada uma parcela.

Os meios básicos utilizados foram constituídos de sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGUE & SKOOG, 1962) suplementados com 3% de sacarose e 0,7% de ágar (ANEXO I). As soluções foram preparadas em Erlenmeyer e, após autoclavagem a 121°C e 1,5atm, durante 15 minutos, foram distribuídas alíquotas de 30ml em Placas de Petri de 10cm de diâmetro, em câmara de fluxo laminar. Foram adicionadas, ao meio de cultura, diferentes combinações de concentrações de ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (6-BAP) a saber: 0.0, 0.1, 0.3 e 0.5mgL⁻¹ (Tabela I). Para indução de brotação foi adicionado ao meio básico 0.05mgL⁻¹ de ANA e 0.2mgL⁻¹ de 6-BAP (TORRES *et al.*, 1993). Os brotos foram cultivados em meio básico, livre de hormônios. O pH dos meios foi ajustado para 5.7.

A avaliação da taxa de contaminação foi realizada de 7 em 7 dias, nos cultivos *in vitro*. Na terceira semana, os explantes foram avaliados pelo diâmetro de cada um. Após este período, os mesmos foram recultivados no meio de indução de brotação. Em 30 dias, as brotações com folhas diferenciadas foram colocadas em meio de enraizamento.

Tabela I – Combinações de concentrações [] de 6-BAP (Benzilaminopurina) e ANA (Ácido Naftalenoacético) em mgL⁻¹, para indução de calogênese na bateria I de experimentos, utilizando explantes foliares de *L. sativa* vr. Verônica.

[6-BAP] \ [ANA]	[ANA]			
	0	0,1	0,3	0,5
0	1 0	2 0,1	3 0,3	4 0,5
0,1	5 0	6 0,1	7 0,3	8 0,5
0,3	9 0	10 0,1	11 0,3	12 0,5
0,5	13 0	14 0,1	15 0,3	16 0,5

3.2. Protocolo para organogênese indireta de explantes foliares retirados de plântulas estabelecidas *in vitro*, de alface vr. Maioba

Esta parte do trabalho foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Uberlândia.

Para obtenção de plantas doadoras de explantes, sementes foram desinfestadas em etanol 70% por 1 minuto e, posteriormente, em solução de hipoclorito de sódio 0.8% acrescido de 2 gotas de Tween 20, por 25 minutos. Após 3 lavagens em água estéril, foram estabelecidas em meio MS, desprovido de reguladores de crescimento, (MS1) e acrescido de 3% de sacarose, solidificado com ágar a 0,8% e autoclavado por 20 minutos. O pH do meio foi ajustado para 5.9. As sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri dentro da câmara de fluxo laminar horizontal. Durante o processo, os instrumentos metálicos foram constantemente flambados.

Os frascos foram colocados para germinar em Câmara de Crescimento sob luz fria de intensidade de 3000lux e temperatura variando de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16horas.

Após as plântulas atingirem cerca de 8cm, por volta de 39 a 44 dias, estas foram seccionadas e estabelecidas, com o auxílio de pinça e bisturi cirúrgico estéreis, em meios de cultura MS, também, estéreis, com diferentes concentrações de reguladores de crescimento (Tabela II).

Tabela II – Combinações de concentrações [] de 6-BAP (Benzilaminopurina) e ANA (Ácido Naftalenoacético) em mgL^{-1} , para indução de calogênese, utilizando explantes foliares de alface vr. Maioba.

		[ANA]			
		0	0,1	0,3	0,5
[6-BAP]	1	0	14 0,1	15 0,3	16 0,5
		0	0,5	0,5	0,5

Cuidou-se para que os explantes provenientes de uma plântula sempre estivessem estabelecidos em tratamentos diferentes. Para isso, a folha foi seccionada e 5 explantes colocados em uma placa de cada tratamento. Em seguida, as Placas de Petri foram vedadas com película de PVC e colocadas em ausência de luz, a cerca de 25°C, na Câmara de Crescimento.

Os calos formados após 50 dias de estabelecimento, foram transferidos para MS16 (Tabela II). Após 25 dias, foram reestabelecidos em meio para brotação MSbl, desprovido de reguladores de crescimento (SANTOS, 1996).

A avaliação foi realizada semanalmente, determinando-se o número de calos e brotos formados.

3.3. Protocolo para organogênese indireta de explantes foliares retirados de plantas adultas em pendoamento cultivadas em condições de campo, de alface vr. Maioba

Folhas de plantas saudáveis, com aproximadamente 70 dias, em fase de pendoamento, foram seccionadas dos indivíduos, levadas ao laboratório e lavadas em água corrente. Em seguida, esterilizadas com uma imersão em etanol 70%, seguindo-se 5 minutos em solução de hipoclorito de sódio 0.5 % acrescido de 2 gotas de Tween 20, sob câmara de fluxo laminar horizontal. Após a desinfestação as folhas foram lavadas em água estéril por 3 vezes.

Os explantes foram seccionados com auxílio do vazador, de pinças e bisturi cirúrgico. Os utensílios utilizados foram autoclavados a 120°C e 1.5atm por 20 minutos e os instrumentos metálicos foram constantemente flambados durante o plantio.

Os explantes foliares foram colocados para desdiferenciar em Placas de Petri contendo meio MS completo e sólido, com diferentes concentrações de hormônios para indução de calogênese (Tabela III), acrescido de 3% de sacarose, 0,8% de ágar e o pH ajustado para 5.9, utilizando HCl e NaOH. As Placas de Petri foram vedadas com película de PVC e levadas à câmara de crescimento, em ausência de luz à cerca de 25°C.

Tabela III – Combinações de concentrações [] de 6-BAP (Benzilaminopurina) e ANA (Ácido Naftalenoacético) em mgL^{-1} , para indução de calogênese, utilizando explantes foliares de alface vr. Maioba.

Meio	[6-BAP]	[ANA]
MS 1	0	0
MS 16	0.5 mgL^{-1}	0.5 mgL^{-1}
MS Ma	3 mgL^{-1}	0.2 mgL^{-1}
MS Sa	0.1 mgL^{-1}	5 mgL^{-1}

Os calos formados foram reestabelecidos em um novo meio contendo as mesmas concentrações, após 36 dias. Ao atingirem cerca de 2cm, em 54 dias, os explantes foram estabelecidos em meio MSbi (SANTOS, 1996), sem

reguladores de crescimento, para início de organogênese. Com o resultado negativo obtido, transferiu-se novamente os calos para o meio MSbII (TORRES *et al.*, 1993), com 27 dias.

A avaliação foi realizada semanalmente, determinando-se o número de calos e brotos formados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Organogênese indireta de alface vr. Verônica (bateria I)

No primeiro experimento ocorreram altas taxas de contaminação nos tratamentos, principalmente nos de números 4, 5, 6, 8, 9, 11 e 12, mas pode-se verificar diferentes respostas entre os mesmos sendo os mais responsivos os de números 14, 15 e 16 (Tabela II). Um aumento na concentração de 6-BAP levou a um aumento no diâmetro dos calos, de tal forma que não houve calogênese quando sua concentração foi igual a zero. Para as concentrações de 0.1 e 0.3mgL⁻¹ de 6-BAP constatou-se um aumento médio de 3mm, sendo que devido a contaminação não pode ser comparado todos os tratamentos. Os Tratamentos mais responsivos foram 14, 15 e 16 com 0.5mgL⁻¹ de 6-BAP, apresentando um aumento médio de 6mm (Figura I e II).

Tabela II – Parâmetros como Média do diâmetro, número de amostras e contaminação, observados na totalidade dos explantes, na primeira bateria de experimentos de alface vr. Verônica.

Parâmetros	Tratamentos															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Média do diâmetro (mm)	10.0	10.0	10.0	0.0	0.0	0.0	13.0	0.0	0.0	12.8	0.0	0.0	13.1	16.2	16.3	14.3
Amostras	10.0	10.0	10.0	0.0	0.0	0.0	6.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	15.0	10.0	21.0	10.0
Contaminação (%)	75.0	75.0	75.0	100	100	100	85.0	100	100	75.0	100	100	62.5	75.0	47.5	75.0

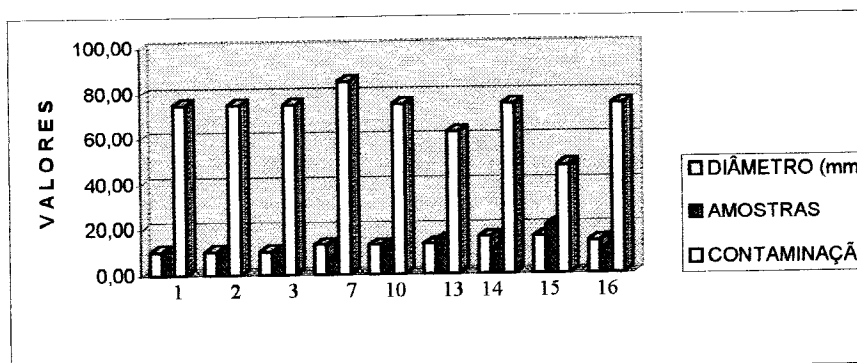


Figura I - Diâmetro (mm) dos explantes de alface vr. Verônica após 21 dias de cultivo *in vitro*, número de amostras e porcentagem (%) de contaminação observados nos tratamentos úteis na bateria I de experimentos.

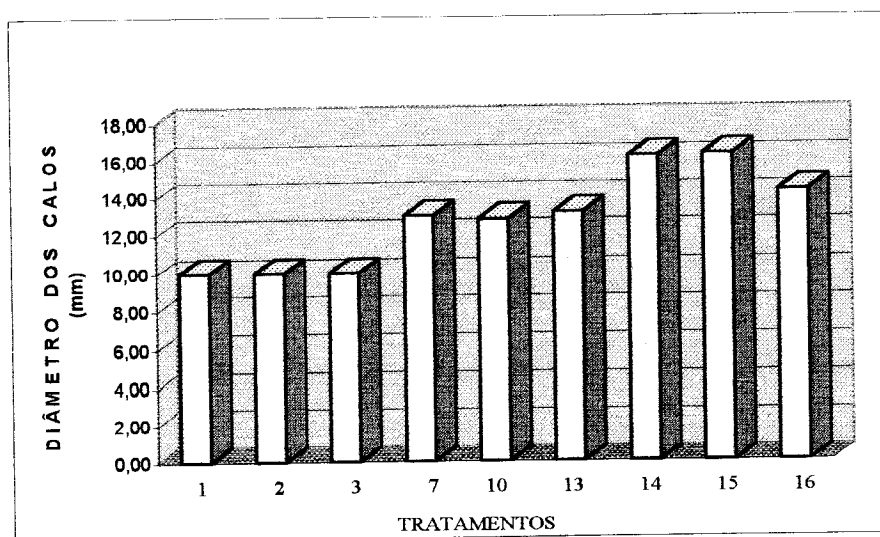


Figura II - Diâmetro (mm) dos calos observados nos explantes de alface vr. Verônica dos tratamentos úteis na bateria I de experimentos.

Os testes revelaram que a ausência de 6-BAP nos tratamentos 1 a 4, independente da concentração de ANA, influenciou negativamente no

desenvolvimento dos explantes, não havendo nenhuma diferenciação (Figura III). Similarmente, GUYLAI *et al.* (1995) observaram em discos foliares de fumo que, na ausência de auxinas ou citocininas, não ocorreu morfogênese.

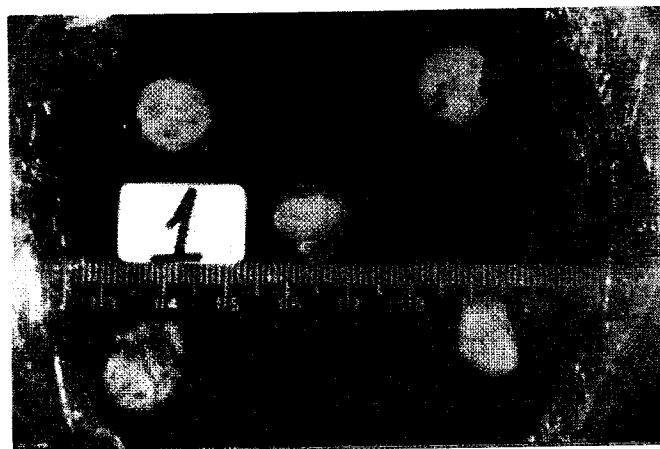


Figura III – Resposta observada no 21º dia do tratamento 1 (Controle negativo) na bateria I de experimentos de alface, vr. Verônica.

Antes da manifestação de agentes contaminantes nos tratamentos de números 5 (0 mgL⁻¹ BAP e 0.1 mgL⁻¹ ANA), 6 (0.1 mgL⁻¹ BAP e 0.1 mgL⁻¹ ANA), 8 (0.1 mgL⁻¹ BAP e 0.5 mgL⁻¹ ANA), 11 (0.3 mgL⁻¹ BAP e 0.3 mgL⁻¹ ANA) e 12 (0.3 mgL⁻¹ BAP e 0.5 mgL⁻¹ ANA), estes iniciaram um processo de calogênese na primeira semana e, aos poucos, foram escurecendo até atingirem a necrose total. Portanto, é possível que, além do balanço hormonal, a contaminação tenha sido também um fator limitante para a continuidade do desenvolvimento dos calos.

Os tratamentos de números 7 (0.1 mgL⁻¹ BAP e 0.3 mgL⁻¹ ANA), 10 (0.3 mgL⁻¹ BAP e 0.1 mgL⁻¹ ANA), 13 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0 mgL⁻¹ ANA), 14 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.1 mgL⁻¹ ANA), 15 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.3 mgL⁻¹ ANA) e 16 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.5 mgL⁻¹ ANA) revelaram respostas mais positivas, apresentando calos mais desenvolvidos e mais vigorosos em relação aos demais (Figura IV).

Destes, o tratamento de número 14 foi o que mais se destacou, pois apresentou um crescimento constante dos calos, sem necrose, sendo que um dos explantes apresentou um processo de organogênese logo na segunda semana.

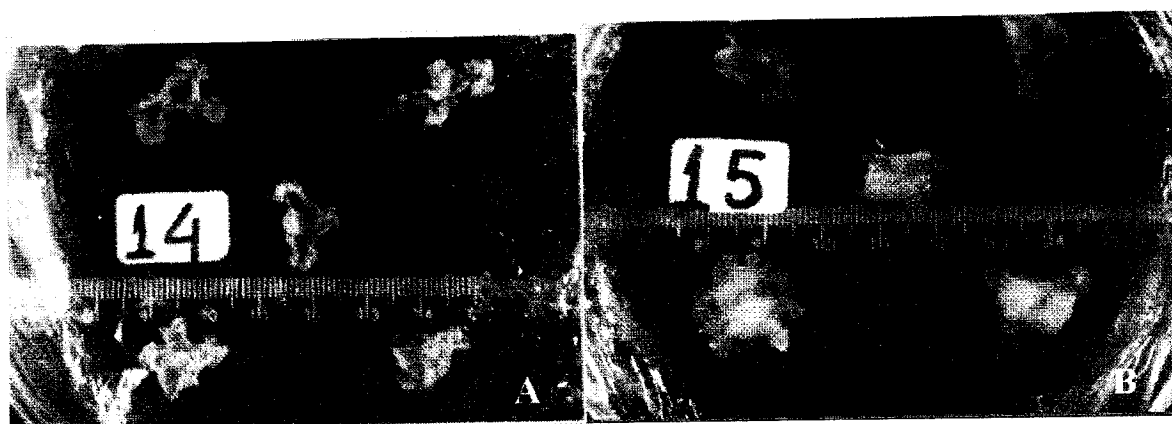


Figura IV – Resposta observada no 21º dia na bateria I de experimentos de alface vr. Verônica. **A** – tratamento 14 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.1 mgL⁻¹ ANA), **B** – tratamento 15 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.3 mgL⁻¹ ANA).

Em relação à melhor posição do explante em contato com o meio, os resultados obtidos foram o desenvolvimento de fototropismo positivo quando a parte adaxial se encontrava em contato com o meio e negativo em relação à parte abaxial, ou seja, o desenvolvimento para explante foliar de alface se dá na região abaxial, independente do contato com o meio.

Ao final de 3 semanas, os explantes foram transferidos para o meio de brotação (MSbII/TORRES *et al.*, 1993), onde foram avaliados após 30 dias (Figura V). Nos tratamentos onde havia iniciado a formação de calos, 7 (0.1 mgL⁻¹ BAP e 0.3 mgL⁻¹ ANA), 10 (0.3 mgL⁻¹ BAP e 0.1 mgL⁻¹ ANA), 13 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0 mgL⁻¹ ANA), 14 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.1 mgL⁻¹ ANA) e 15 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.3 mgL⁻¹ ANA), os explantes foram divididos ao meio no momento da transferência (Figura VI). Os que não haviam se diferenciado, 1 (sem reguladores) e 3 (0 mgL⁻¹ BAP e 0.3 mgL⁻¹ ANA) não foram divididos. Nessas condições, foi observado que os tratamentos de números sem

reguladores) e 2 (0 mgL⁻¹ BAP e 0.1 mgL⁻¹ ANA) continuaram sem alteração, enquanto que o tratamento 3 (0 mgL⁻¹ BAP e 0.3 mgL⁻¹ ANA) desenvolveu calos bem pequenos ao redor do explante. Nos tratamentos de números 7 (0.1 mgL⁻¹ BAP e 0.3 mgL⁻¹ ANA), 10 (0.3 mgL⁻¹ BAP e 0.1 mgL⁻¹ ANA), 13 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0 mgL⁻¹ ANA) e 16 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.5 mgL⁻¹ ANA) os calos que haviam formado anteriormente necrosaram e novos calos de aspecto mais friável, começaram a surgir nas outras extremidades. Os tratamentos de números 14 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.1 mgL⁻¹ ANA) e 15 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.3 mgL⁻¹ ANA) continuaram com os calos em desenvolvimento e, a partir destes, formaram-se inúmeras brotações com folhas bem diferenciadas, porém sem surgimento de raiz.

Em seguida, os aglomerados de plântulas foram divididos em 4 partes e cultivados em meio nutritivo sem hormônios, para indução de raízes. Após 3 semanas foi possível isolar plântulas devidamente enraizadas.

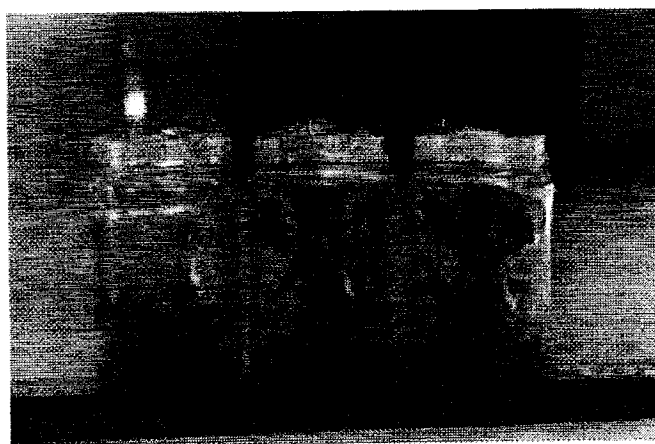


Figura V – Regeneração *in vitro* do tratamento 15: desenvolvimento da parte aérea após 30 dias em meio para indução de brotação (MSbII), na bateria I de experimentos na vr. Verônica.



Figura VI – Repicção do explante, com brotação bem desenvolvida em câmara de fluxo laminar, para estabelecimento em meio sem suplementos hormonais para desenvolvimento de raízes, na bateria I de experimentos na vr. Verônica.

4.2. Organogênese indireta de alface vr. Maioba (bateria II)

Devido a boa resposta da vr. Verônica, utilizou-se os tratamentos de números 14 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.1 mgL⁻¹ ANA), 15 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.3 mgL⁻¹ ANA) e 16 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.5 mgL⁻¹ ANA) para a vr. Maioba, obtendo-se os resultados listados na Tabela III.

Tabela III – Resultados obtidos do cultivo *in vitro* da bateria II observados com a vr. Maioba.

Tratamento	1	14	15	16
Estabelecimento	31/05/98	31/05/98	31/05/98	05/06/98
Contaminação (%)	0	0	0	0
Formação de calo	-	21/07/98	06/07/98	28/06/98
Número de calos em 21/07/98	0	1	4	9
MSbI (16/08/98) Número de brotos	-	0	0	0
Descarte	23/07/98	27/09/98	27/09/98	27/09/98

As plântulas estabelecidas *in vitro*, com cerca de 44 dias, foram estabelecidas nos tratamentos para indução de calogênese, apresentando uma resposta baixa e elevado tempo, sendo encontrada no Tratamento MS16 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.5 mgL⁻¹ ANA), a melhor resposta, com 1.5 calo/placa. Em relação ao tempo (dias) gasto para a formação de calo, foi o maior encontrado, sendo o melhor o tratamento MS14 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.1 mgL⁻¹ ANA) (Figuras VII, VIII e IX).

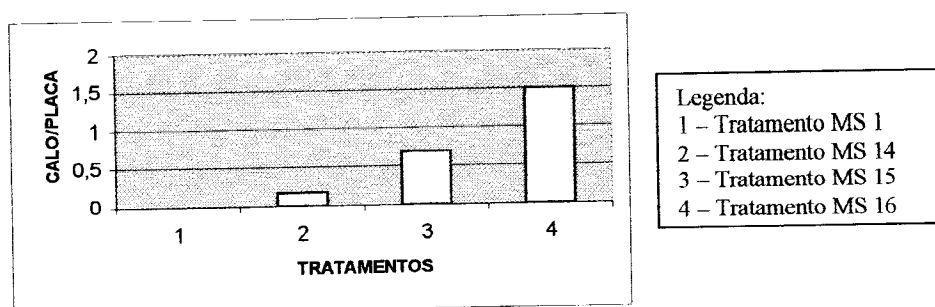


Figura VII – Número de calos por placa, observados na bateria II de experimentos, vr. Maioba

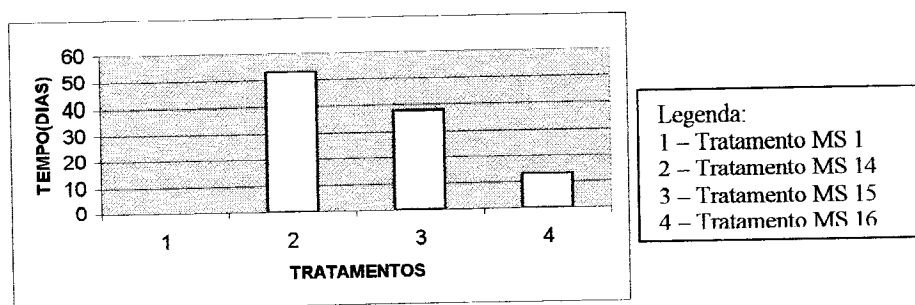


Figura VIII – Tempo necessário para o início da calogênese por tratamento, observados na bateria II de experimentos, vr. Maioba.

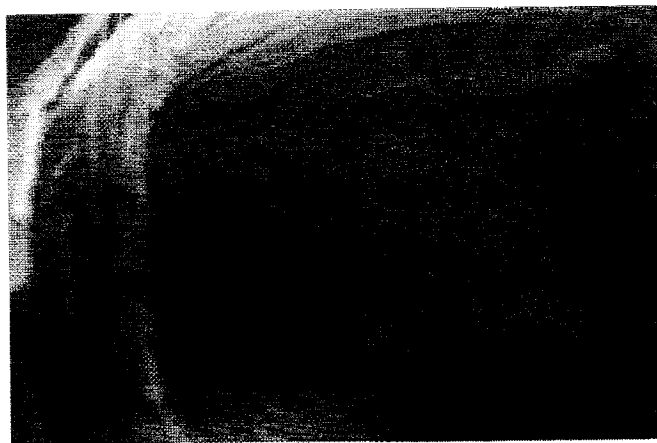


Figura IX – Resposta observada no tratamento 16 (0.5 mgL^{-1} BAP e 0.5 mgL^{-1} ANA), na bateria II de experimentos de alface, vr. Maioba.

4.3. Organogênese indireta de alface vr. Maioba (bateria III)

Devido ao pequeno número e tamanho dos calos obtidos e a não obtenção de brotos, foi feito um novo experimento utilizando-se duas novas concentrações hormonais (MANTELL *et al.*, 1994; SANTOS, 1996). Iniciou-se outro experimento para Maioba (tabela IV), utilizando o Tratamento 1 (desprovido de reguladores), como controle negativo, o Tratamento 16 (0.5 mgL^{-1} BAP e 0.5 mgL^{-1} ANA) como positivo e os Tratamentos Ma com 3 mgL^{-1} BAP e 0.2 mgL^{-1} ANA (MANTELL *et al.*, 1994) e Sa com 0.1 mgL^{-1} BAP e 5 mgL^{-1} ANA (SANTOS, 1996). Obteve-se uma resposta melhor em tempo menor, quando comparado com a bateria II de experimentos (Figuras X e XI).

O tempo necessário para a obtenção da resposta variou nos tratamentos. Sendo que o mais rápido o MS 16 (0.5 mgL^{-1} BAP e 0.5 mgL^{-1} ANA), seguido do MSSa (0.1 mgL^{-1} BAP e 5 mgL^{-1} ANA), após o MSMa (3 mgL^{-1} BAP e 0.2 mgL^{-1} ANA).

O meio MSMa (3 mgL^{-1} BAP e 0.2 mgL^{-1} ANA), sugerido para indução de brotos para medula de fumo. Pode ser uma explicação para a baixa resposta, encontrada neste experimento. Este meio foi sugerido para uma planta de outro gênero, podendo ser o balanço hormonal totalmente diferente.

Os meios utilizados para indução de parte aérea não foram efetivos, mas apresentaram uma resposta positiva em relação ao crescimento dos calos.

Tabela IV – Resultados obtidos do cultivo *in vitro* da bateria III, observado em alface cv. Maioba com diferentes meios de cultura.

Meio de Cultura	MS 1	MS 16	MS Ma	MS Sa
Estabelecimento	11/07/98	11/07/98	11/07/98	11/07/98
Calogênese	-	22/07/98	12/08/98	24/07/98
N. de placas (30/07/98)	13	16	15	13
Taxa de contaminação (%)	35	20	25	35
Reestabelecimento	16/08/98	16/08/98	16/08/98	16/08/98
n. de placas em 24/08/98	4	11	6	9
n. de calos em 24/08/98	0	28	14	24
MSb I (08/10/98) Número de brotos em 04/11/98	0	0	0	0
MSb II (04/11/98) Número de brotos em 05/12/98	-	0	0	0
Descarte	20/09/99			

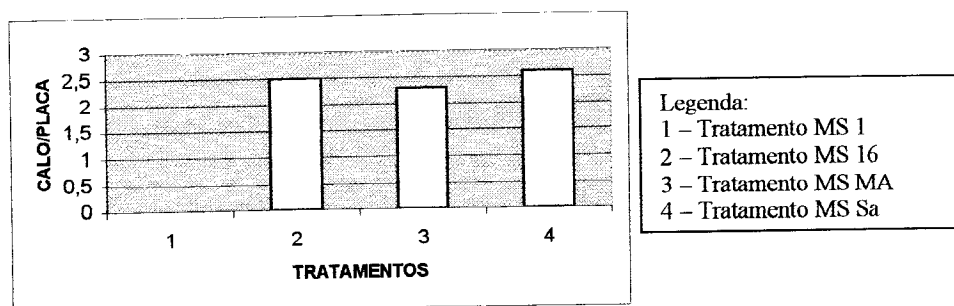


Figura X – Número de calos por placa, observados na bateria III de experimentos, vr. Maioba.

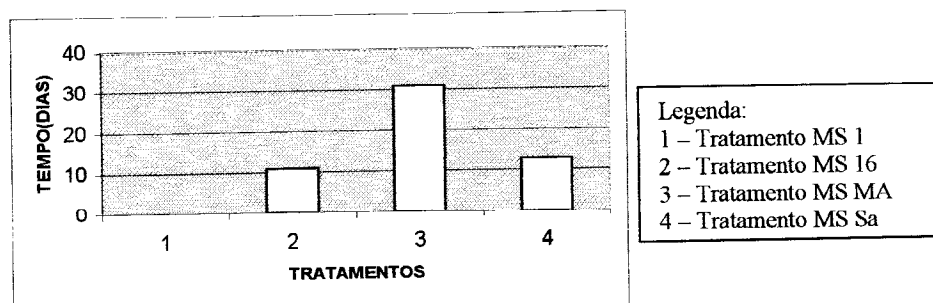


Figura XI - Tempo (dias) necessário para o início da calogênese por tratamento, observados na bateria III, vr. Maioba.

Para brotação utilizou-se o meio MSbI, desprovido de reguladores de crescimento (SANTOS, 1996). Como a resposta foi negativa a este tratamento, transplantou-se os calos para MSbII (0.2mg/L de BAP e 0.05mg/L de ANA) (TORRES *et al.*, 1993). Os explantes mantiveram a resposta, não havendo formação de parte aérea.

Outros meios para indução de brotação foram utilizados, sem resultado positivo, não estão sendo considerados, neste trabalho, pois exige repetições.

A ausência de resposta morfogênética e os diferentes ritmos de proliferação dos explantes encontrados, podem ter sido influenciados por 5 fatores principais: o estado fisiológico dos explantes e plantas doadoras; a composição do meio de cultura; as condições ambientais internas e externas da cultura; os genótipos que foram propagados e vários problemas técnicos (MANTELL *et al.*, 1994).

A idade das plantas doadoras, também, influencia a resposta, quanto mais jovens os explantes utilizados melhor a resposta obtida. Deve-se preferir utilizar cotilédones ao invés de folhas velhas. Folhas jovens de plantas susceptíveis apresentam uma taxa de contaminação menor, portanto, uma idade ideal deve ser estabelecida em estudos posteriores. Além da idade, outro fator determinante é o genótipo da planta, facilmente perceptível, no caso da vr. Verônica. As melhores respostas apresentadas

pela vr. Verônica, foram nos tratamentos de números 14 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.1 mgL⁻¹ ANA) e 15 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.3 mgL⁻¹ ANA), já na vr. Maioba, foi no tratamento de número 16 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.5 mgL⁻¹ ANA).

Os reguladores de crescimento são substâncias com efeito de controlar o crescimento e diferenciação dos tecidos, são adicionados aos meios para determinar a resposta morfogênética. Em alguns tecidos como o meristema, mesmo em sua ausência pode haver diferenciação, pois esse é um tecido formado por células não diferenciadas. Outros tipos de tecidos e órgãos, como as folhas, dependem da concentração e do balanço dos diferentes tipos de reguladores, para diferenciar e multiplicar. O MS1 (Tabela I) para indução de calo é um controle negativo, pois a ausência da citocinina (6-BAP) e da auxina (ANA) determina a ausência de calogênese. Não foi determinada a concentração ideal para organogênese.

A resposta morfogênética depende das condições internas e externas às quais estão submetidos os explantes. A presença de agentes polimerizantes (ágar) no meio pode levar à ausência da resposta desejada, pois forma gradientes de compostos, dificultando o acesso dos explantes a essas substâncias e ao oxigênio (PINTO, 1997). São necessários estudos posteriores, para verificar se a presença de ágar induz ou não ausência de resposta do explante.

A irradiação é outro fator de importância, para vr. Verônica, a presença de luz induziu bons resultados, já para a cv. Maioba, em bateria na qual os explantes foram colocados na ausência de irradiação, a calogênese foi rápida, com calos vigorosos. Segundo PIERIK (1997) a calogênese pode ser efetiva no escuro ou no claro, dependendo do genótipo utilizado.

Outra possível explicação, para a ausência de resposta na vr. Maioba, é que as células do parênquima clorofiliano das folhas, originárias de sementes germinadas *in vitro*, encontravam-se em estresse hídrico e nutricional, devido ao alto tempo em um mesmo meio, dificultando a sua regeneração. A idade da planta mãe, outro fator determinante (ENGLER & GROGAN, 1983; PINTO, 1997) não produziu, em nossos ensaios, os resultados esperados, pois plantas mais jovens, com cerca de 40 dias apresentaram resposta menos efetiva do que plantas com cerca de 70 dias.

Algumas substâncias são essenciais para regeneração. DOERSCHUG & MILLER (1967) relataram que, para formação de calo em *L. sativa*, são necessárias Cinetina e AIA, sendo que meio de cultura sem uma delas, apresentou pequena resposta e na ausência de ambas não houve calogênese. Assim, estudos para verificação de substância essencial para a formação de brotos, são necessários.

Fragmentos da planta, já possuem fitohormônios que regulam a função da célula e do tecido na planta. PEDROSO & PAIS (1995) determinaram regiões na folha de *Camellia japonica* com respostas diferentes a um meio para indução de embriogênese direta; obtiveram desde região não morfogênica, passando por regiões com formação de calos não-organogênico, calo organogênico, calo embriogênico e regiões de embriogênese direta. MEKBIB *et al.* (1997) mostraram um gradiente de resposta de cultura de folhas de *Eragrostis tef* para indução de calos, sendo que a formação decresce com o aumento da distância da base da folha. O controle hormonal interno pode explicar as respostas dos tratamentos de números 3 (0 mgL⁻¹ BAP e 0.3 mgL⁻¹ ANA), 7 (0.1 mgL⁻¹ BAP e 0.3 mgL⁻¹ ANA), 12 (0.3 mgL⁻¹ BAP e 0.5 mgL⁻¹ ANA), 13 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0 mgL⁻¹ ANA) e 16 (0.5 mgL⁻¹ BAP e 0.5 mgL⁻¹ ANA), vr. Verônica que, quando colocados em meio para indução de brotos, formaram calos.

ENGLER & GROGAN (1983) observaram que a densidade alta de protoplastos diminui a formação de calos, devido à liberação de substâncias fenólicas e auxinas, no meio. LUZ *et al.* (1998) discutem a degenerescência de calos embriogênicos de anteras de pimentão, ao longo de 60 dias, devido à liberação de etileno, formado a partir de intensa atividade mitótica e respiração celular dos explantes. Parece que, esses fatores interferiram nos presentes experimentos, havendo uma modificação do meio, pois ao se transferir os calos, pôde-se observar o crescimento dos mesmos.

A diferença na taxa de contaminação observada, foi devida à forma de obtenção dos explantes, na bateria com 0% de contaminação, foram utilizadas plantas que encontravam-se *in vitro*, como doadoras de explantes. Nas outras baterias observou-se uma taxa de contaminação alta (próximo a 100%) e uma média (com cerca de 30%), respectivamente, e isso deve-se

principalmente ao fato de que esses foram coletados no campo, com manuseio e metodologia de desinfestação que não surtiram resultados. É importante ressaltar que não basta aumentar a concentração e o tempo em etanol e hipoclorito de sódio, pois a fonte de explante, a folha de alface, é frágil, podendo ser facilmente danificada, com a perda do explante. Foi preciso encontrar a concentração e o tempo ideal para diminuir ao máximo a contaminação e danificar o mínimo as fonte de explantes.

TORRES *et al.* (1993) determinaram um protocolo de regeneração, via direta para cotilédones de alface, e ressaltam que raramente houve formação de brotos via indireta, ou seja, a partir de calos; os explantes seguiram, provavelmente, a indução hormonal presente no meio. Dependendo do objetivo do pesquisador pode ser interessante utilizar o protocolo sugerido por TORRES *et al.* (1993). Nesse trabalho, a variação somaclonal induzida pela calogênese seria interessante, pois o melhoramento apoiar-se-ia nessa variação, regenerando regiões sadias de folhas contaminadas com *Septoria lactucae*, buscando mutações naturais ou variações somaclonais, que dificultassem ou impedissem a contaminação por esse fungo ou que, ainda, fornecessem subsídios para estudos moleculares da resistência.

Concomitantemente, foram realizados estudos, no campo, com a variedade Uberlândia 10.000, buscando plantas resistentes à Septoriose, com avaliações de porcentagem de contaminação. Nenhum indivíduo totalmente resistente foi encontrado, mas houve respostas diferentes que podem ser devidas à características hereditárias ou à variações no ambiente, como disponibilidade de nutrientes no solo ou, ainda, maior quantidade de esporos em determinadas regiões.

5. CONCLUSÕES

- ♦ A taxa de contaminação foi muito variável.
- ♦ O genótipo tem alta influência na resposta do explante pois, mesmo em concentrações idênticas de reguladores de crescimento, houve respostas diferentes para as variedades Maioba e Verônica. Para uma definição da concentração hormonal, é necessário realizar uma bateria completa e não, somente selecionar uma das concentrações que apresentou um bom resultado em outro experimento.
- ♦ As melhores concentrações para indução de calos em alface vr. Verônica foram encontradas para os tratamentos de números 14 e 15, que utilizaram 0.1mgL^{-1} e 0.3mgL^{-1} de ácido naftalenoacético, respectivamente, e 0.5mgL^{-1} de 6-Benzilaminopurina. Para indução de brotos o meio utilizado por TORRES *et al.* (1993) foi efetivo. Já para a vr. Maioba o meio utilizado por SANTOS (1996) foi efetivo na formação de calos e não se encontrou a combinação de reguladores de crescimento para indução de brotação.
- O desenvolvimento para explante foliar de alface, vr. Verônica, se dá na região abaxial, independente de qual região está em contato com o meio de cultura.
- Não houve formação de brotos de alface vr. Maioba.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL 98. 1998. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo-SP, FNP Consultoria e Comércio:90-92.
- ALLARD, R. W. 1971. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. (Tradução de Almiro Blumenschein, Ernesto Paterniani, José T. do Amaral Gurgel e Roland Vencovsky). São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda, 379p.
- BORÉM, A. 1997. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa-MG, Editora da UFV, 547p.
- CARNELOSSI, M. A. G.; LAMOUNIER, L. & RANAL, M. A. 1995. Efeito da luz, hipoclorito de sódio, escarificação e estratificação na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), cv. Maioba e Moreninha-de-Uberlândia. Brasília. **Pesq. Agropec. Bras.**, **30** (6): 779-787.
- CASTRO, S. R. P. & FERRAZ JR., A. S. L. 1998. Teores de nitrato nas folhas e produção da alface cultivada com diferentes fontes de nitrogênio. Brasília. **Hortic. Bras.** **16**(1): 65-68.
- CHARCHAR, J. M. & MOITA, A. W. 1996. Reação de cultivares de alface à infecção por mistura populacionais de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica* em condições de campo. Brasília. **Hortic. Bras.** **14**(2): 185-189.

- DOERSCHUG, M. R. & MILLER, C. O. 1967. Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa* explants. **Amer. J. Bot.** **54** (4): 410-413.
- DUARTE, R. L. R.; SETÚBAL, J. W.; ANDRADE JÚNIOR, A. S.; SOBRINHO, C. A.; SILVA, P. H. S. & RIBEIRO, V. Q. 1991. Introdução e Avaliação de Cultivares de Alface (*Lactuca sativa* L.) nos Períodos Seco e Chuvoso em Teresina-P. Brasília, **EMBRAPA**: 1-8.
- ENGLER, D. E. & GROGAN, R. G. 1983. Isolation, culture and regeneration of lettuce leaf mesophyll protoplasts. **Plant. Science Letters** **28**: 223-229.
- FILGUEIRA, F. A. R. 1982. **Manual de Olericultura: cultura e comercialização de hortaliças**. 2 ed., São Paulo, Agronômica Ceres: 77-86.
- GALLI, F. 1980. **Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas**, 2 ed, São Paulo-SP, Ed. Agronômica CERES Ltda, 587p.
- GUYLAI, G.; KISS, J.; JEKKEL, Z.; KISS, E. & HESZKY, L. E. 1995. A selective auxin and cytokinin bioassay based on root and shoot formation *in vitro*. **Journal Plant Physiology** **145**: 379-382.
- HANCOCK, J. F. 1992. **Plant Evolution and the Origin of crop species**. New Jersey, Prentice-Hall Inc., 305p.
- HEREDIA ZÁRATE, N. A.; VIEIRA, M.C. & CABEÇAS JR., O. 1997. Produção de alface em função de doses e formas de aplicação de cama de aviário semi-decomposta. Brasília. **Hortic. Bras.** **15** (1): 65-67.

- HERKLOTS, G. A. C. 1972. **Vegetables in South-East Asia**. Hong Kong. South China Morning Post Ltd.: 132-136.
- ILLG, R. D. & SIQUEIRA, W. J. 1984. Variabilidade Genética Induzida Através da Cultura de Tecidos. **I Colóquio sobre Citogenética e Evolução de Plantas**. Piracicaba-SP, Sociedade Brasileira de Genética: 125-135.
- KERR, W. E.; CAMPOS, F. I. & BARROS, M. J. B. 1986. Notas sobre os recursos naturais da horticultura na Amazônia. **Anais do I Simpósio do Trópico Úmido 6**: 451-456.
- KERR, W. E.; ALMEIDA JR, E. L.; CAMPOS, F. J. & SANTOS-FILHO, J. R. 1990. Maioba: nova cultivar de alface para solos ácidos. **Hortic. Bras. 8** (2): 33-34.
- KIMATI, H.; AMORIM, A.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. & REZENDE, J. A. M. 1997. **Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas (vol 2)**, São Paulo – SP, Agronômica Ceres Ltda: 18-25.
- LADRY, 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**: 331-337.
- LINDQVIST, K. 1960. On the origin of cultivated lettuce. **Hereditas 46**: 319-350.
- LUZ, J. M. Q.; PINTO, J. E. B. P.; EHLERT, P. A. D. & CERQUEIRA, E. S. 1998. Indução in vitro de embriões em anteras de pimentão. Brasília. **Hortic. Bras. 16** (1): 56-60.

- MANTELL, S. H.; MATHEWS, J. A. & MacKEE, R. A. 1994. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas.** (Tradução de João L. de Azevedo, Margarida L. R. A. Percin e Natal A. Velho). Ribeirão Preto-SP, Sociedade Brasileira de Genética, 334p.
- MENEZES, O. B. 1943. Número de cromossômios em *Brassica* e *Lactuca*. Rio de Janeiro. **Rev. de Agricultura 18:** 277-278.
- MEKBIB, F.; MANTELL, S. H. & BUCHANAN-WOLLASTON, V. 1997. Callus induction and *in vitro* regeneration of Tef [*Eragrostis tef* (Zucc.)Trotter] from leaf. **J. Plant Physiol. 151:** 368-372.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant. 15:** 473-497.
- PARANHOS, J. T.; PERRANDO, E.; FRANCO, E. T. H. & AITA, A. 1996. Regeneração *in vitro* das cultivares de tomate Empire e Monte Carlo. Brasília. **Hortic. Bras. 14** (2): 203-207.
- PEDROSO, M. C. & PAIS, M. S. 1995. Factors controlling somatic embryogenesis. Cell wall changes as na *in vivo* marker of embryogenic competence. **Plant Cell Tissue and Organ Culture 43:** 147-154.
- PEREIRA, E. J. 1998. **Avaliação de cultivares de alface no outono-inverno em Uberlândia.** Monografia apresentada ao Curso de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo, 21p.

- PHILLIPS, R. L.; KAEPLER, S. M. & OLHOFT, P. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. USA. **Proc. Natl. Acad. Sci.:** 5222-5226.
- PIERIK, R. L. M. 1997. **In Vitro Culture of Higher Plants**. London, Kluwer Academic Publishers, 348p.
- PINTO, C. M. F.; PAULA-JÚNIOR, T. J. & MIZUBUTI, E. S. G. 1995. Doenças de Alcachofra, Alface, Chicória, Morango e Quiabo. **Informe Agropec. 17** (182): 5-13.
- PINTO, J. E. B. P. 1997. **Cultivo de Células Vegetais: cultura de calos e suspensão de células**. Apostila do módulo Fermentação do IX Curso de Fundamentos de Biotecnologia. Uberlândia-MG, 11p.
- SANTOS, A. C. P. 1996. **Melhoramento de Alfaces Ricas em Vitamina A**. Tese de Mestrado apresentada à Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, 84p.
- SEGOVIA, J. F. O.; ANDRIOLO, J. L.; BURIOL, G. A. & SCHNEIDER, F. M. 1997. Comparação do crescimento e desenvolvimento da alface (*Lactuca sativa* L.) no interior e exterior de uma estufa de polietileno em Santa Maria, RS. Santa Maria. **Ciência Rural 27** (1): 37-41.
- SKOOG, F. & MILLER, C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology 11:** 118-130.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. 1998. **Cultura de Tecidos e Transformação de Plantas**. Vol I, Brasília - DF, EMBRAPA, 509p.
- TORRES, A. C.; CANTLIFFE, D. J.; LAUGHNER, B.; BIENIEK, M.; NAGATA, R.; ASHRAF M. & FERL R. J. 1993. Stable transformation of

lettuce cultivar south bay from cotyledon explants. Netherlands. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 34:** 279-285.

VIDIGAL, S. M.; SEDIYAMA, M. A. N.; GARCIA, N. C. P. & MATOS, A. T.
1997. Produção de alface cultivada com diferentes compostos orgânicos e dejetos suínos. Brasília. **Hortic. Bras. 15** (1): 35-39.

7. ANEXOS

TABELA 2 - Soluções estoques do meio de MURASHIGE & SKOOG (1962).

Solução Estoque	Compostos	Concentração Final (mg/l)
A	NH ₄ NO ₃	1.650,000
B	KNO ₃	1.900,000
C	H ₃ BO ₃	6,200
	KH ₂ PO ₄	170,00
	KI	0,830
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,250
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
D	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	440,00
E	MgSO ₄ · 7H ₂ O	370,000
	MnSO ₄ · 4H ₂ O	16,891
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,600
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
F	Na ₂ EDT · 2H ₂ O	37,250
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,850
Hexitol	Mio-inositol	100,00
Vitaminas	Tiamina HCl	0,100
	Piridoxina	0,500
	Ácido nicotínico	0,500
Aminoácido	Glicina	2,000
Açúcar	Sucrose (3%)	30.000,000
Ágar (0,7%)	-	7.000,000
pH ajustado para 5,7		
± 0,1		
Hormônios		2-3ml de Hcl
		0,5 N
Citocininas	BAP	x
Auxina	ANA	x
	AIA	x

Obs: O meio básico utilizado em todas as baterias foi o meio MS, havendo apenas variações nas concentrações dos reguladores de crescimento, citocininas e auxinas.