

Aparecida Célia Paula dos Santos

**“CONTRIBUIÇÕES À GENÉTICA E
MELHORAMENTO DE ALFACES
MEDIANTE CRUZAMENTOS E
CULTURA DE TECIDOS”**

Uberlândia - MG -Brasil

1996

581.169
S237c
TES

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**“CONTRIBUIÇÕES À GENÉTICA E
MELHORAMENTO DE ALFACES MEDIANTE
CRUZAMENTOS E CULTURA DE TECIDOS”**

APARECIDA CÉLIA PAULA DOS SANTOS

581.169 S237c TES/FU
DIRBI - UFU UMU 00625/97



1000167409

Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências para
obtenção do Título de MESTRE EM
GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Uberlândia - MG - Brasil
- 1996 -

11-0

APARECIDA CÉLIA PAULA DOS SANTOS

**“CONTRIBUIÇÕES À GENÉTICA E
MELHORAMENTO DE ALFACES MEDIANTE
CRUZAMENTOS E CULTURA DE TECIDOS”**

ORIENTADOR: Prof. Dr. *WARWICK ESTEVAM KERR*

Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte das exigências para
obtenção do Título de MESTRE EM
GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Uberlândia - MG - Brasil
- 1996 -



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Campus Umuarama Bloco 2E Sala 37

38.400-902, UBERLÂNDIA - MG

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

1 - TÍTULO DA TESE: Contribuições à Genética e Melhoramento de Alfaces Mediante Cruzamentos e Cultura de Tecidos

2 - ALUNO: Aparecida Célia de Paula Santos

3 - PROFESSOR ORIENTADOR: Warwick Estevam Kerr

4 - DATA: 06 / 12 / 96

5 - BANCA EXAMINADORA:

Titular Warwick Estevam Kerr

Titular Fernando Antonio Reis Filgueira

Titular Manuel G. C. Churata Masca

Suplente Júlio Cesar Viglione Penna

Suplente José Magno Queiroz

6 - APRESENTAÇÃO: Início - 14:30h Término - 15:20h

7 - TEMPO DE ARGUIÇÃO: Início - 15:25h Término - 17:20h

8 - CONCEITO ATRIBUÍDO POR EXAMINADOR:

1º Membro da Banca A

2º Membro da Banca A

3º Membro da Banca A

Conceito Final: A

9 - OBSERVAÇÕES: _____

10 - ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA:

Warwick Estevam Kerr
Fernando Antonio Reis Filgueira
Manuel G. C. Churata Masca

11 - RESERVADO AO COLEGIADO

Ao Prof. Kerr,
um exemplo de vida científica e
humanitária

Dedico

Ao Geraldo
companheiro e amigo

Dedico

Aos meus pais, Aldair e Eurípedes

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus pelas graças concedidas durante essa caminhada tortuosa.

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr, pela confiança em mim depositada, amizade e brilhante orientação.

Ao Geraldo, pelo companheirismo e apoio constantes, que não foram poucas as vezes que abdicou de suas horas de folga para ajudar-me nos pesados trabalhos de campo (inclusive nas madrugadas) e que suportou minha ausência as noites, feriados e finais de semana em que eu trabalhava no laboratório da UFU ou na Fac. Eng. Alimentos, em Campinas.

Aos Professores Doutores: do Curso de Pós-Graduação Ana Maria Bonetti, Luiz Ricardo Goulart Filho, Warwick Estevam Kerr, Maria Inês Brandeburgo, Amélia Hamaguchi, Nilson Penha da Silva, Denise Garcia de Santana, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Campaner do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo pela identificação dos Heteropteros.

Ao Prof. Dr. Júlio César Viglioni Penna, pelas correções na redação da Tese e pela participação na Banca como suplente.

Aos Professores Doutores: Ana Maria Coelho Carvalho, Ana Maria Oliveira Cunha, Inês Luci Machado Carrijo, Glen Monteiro de Araújo, Ivan Schiavini da Silva, Cecília Lomônaco de Paula pelo incentivo e ajuda.

Aos funcionários da Fazenda do Glória pelo auxílio nos trabalhos de campo.

Ao Sr. João dos Reis de Paiva, técnico da área experimental do Campus Umuarama pelo auxílio neste último ano de trabalho de campo.

Ao Técnico Agrícola Francisco Raimundo da Silva pela valiosa ajuda nos trabalhos de campo.

Ao Secretário do Departamento de Genética Gerson Mamede pela indispensável ajuda na diagramação da Tese.

Ao laboratorista Roberto Rezende dos Santos da UFU que tantas vezes, sem questionar, colaborou para a realização do experimento.

À Dra. Helena Teixeira de Godoy da Fac. Eng. Alimentos, em Campinas por todas as vezes que recebeu-me para a realização dos testes de Vitamina A.

Ao acadêmico Paulo Rabelo pelo auxílio prestado nos trabalhos de campo.

Ao Prof. Dr. Fernando Antônio Reis Filgueira, pela participação na Banca e pela presteza com que me auxiliou nas correções finais desta tese.

Ao Prof. Dr. Manuel G. C. Churata-Masca, pela participação na Banca Examinadora desta defesa de Tese e pelas valiosas contribuições na redação final.

Ao Prof. Jonas Jäger Fernandes pelo auxílio nos testes de virose.

Ao Marcos meu cunhado e Graça minha irmã pelo auxílio e paciência na montagem das pranchas fotográficas.

Ao Departamento de Geografia, especialmente ao Prof. Washington Luiz Assunção pela colaboração com os dados climatológicos e geográficos.

Aos encarregados Enon Lannes Bernardes (*in memoriam*), Jeová L. Cardoso e Daniel Vilela Moura pela coleta e fornecimento dos dados Meteorológicos do 5^o Distrito de Meteorologia Estação Parque do Sabiá.

Aos meus amigos Waldemar J. Costa, Luzia Almeida e Vivette A.R. Cabral pela amizade e incentivo inclusive financeiro.

Ao meu amigo Agrônomo, Cícero Dozinetti, pela amizade, ensinamentos, auxílio nos trabalhos de campo, e acima de tudo, pela sua beleza interior.

À Terezinha Teixeira Cabral que se revelou uma amiga e conselheira nesta caminhada.

Ao colega Gustavo, pelo auxílio nas fotos apresentadas.

Ao colega Walter Vieira da Cunha pelo auxílio na confecção dos gráficos.

Aos colegas Vânia, Gislene, Rosana e Cristiano por ter-me ajudado a superar algumas dificuldades principalmente na área de computação.

Aos meus colegas Agrônomos Adailton e Gismar pela contribuição e incentivo nesses dois anos de curso sem demonstrarem, um só minuto, preconceito contra a Bióloga.

Aos colegas do laboratório de genética, Vanessa, Syomara, Adelmo, Valentin, Max Wendell, Ana Paula, Marta, Frederico e Alcione pelo convívio e amizade.

À coordenadoria de Apoio e Pesquisa do Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos para a realização do Curso de Mestrado.

À Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de aprendizagem.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA.

Aos meus pais, Aldair e Eurípedes

Dedico

ÍNDICE

1. RESUMO	i
2. INTRODUÇÃO.....	1
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Origem.....	4
3.2. Descrição	4
3.3. Genética.....	5
3.4. Problemas que Afetam a Cultura da Alface	7
3.4.1. Clima e pH.....	7
3.4.2. Doenças	8
3.5. Vitamina A	9
3.6. Cultura de Tecidos - Variação Somaclonal.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1. Germoplasma.....	15
4.1.1. Maioba.....	15
4.1.2. Salad Bowl.....	16
4.1.3. Moreninha de Uberlândia.....	16
4.1.4. Vitória de Santo Antão	17
4.2. Dados Geográficos e Climáticos	17
4.3. Cultura de Tecidos.....	21
4.3.1. Aclimação	22
4.4. Condições de Campo	22
4.5. Cruzamentos Controlados	23
4.6. Método de Polinização.....	24
4.7. Metodologia Química para Determinação da Vitamina A.....	25
4.8. Inoculação do Fungo <i>Septoria lactucae</i>	27
4.9. Metodologia Estatística.....	27

4.10. Teste de Virose	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Cultura de Tecidos	29
5.1.1. Experimento 1	29
5.1.2. Experimento 2	43
5.2. Cruzamentos	48
5.2.1. Moreninha de Uberlândia X Maioba	48
5.2.2. Planta 01: Moreninha de Uberlândia x Vitória de Santo Antão	50
5.2.3. Planta 02: Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão	55
5.2.4. Moreninha de Uberlândia X Simpson	60
5.2.5. (Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão) F_5 X (Moreninha de Uberlândia X Simpson) F_6	62
6. CONCLUSÕES	69
7. ABSTRACTS	70
8. BIBLIOGRAFIA CITADA	71
<i>ANEXO I</i>	76
<i>ANEXO II</i>	77

1. RESUMO

A alface (*Lactuca sativa*) está entre as hortaliças mais consumidas pelos brasileiros e é largamente cultivada. Fatores ambientais desfavoráveis e doenças prejudicam seu cultivo. A maioria das cultivares à venda no mercado é pobre em β -caroteno. A obtenção de cultivares de alface ricas em vitamina A, com sabor mais doce, tolerância a septoriose, folha larga, tolerância às fortes chuvas verão, inflorescência tardia, adaptada a pH de 4 a 8, foi objeto deste trabalho. Utilizou-se as cultivares Moreninha de Uberlândia, Maioba, Vitória de Santo Antão e Simpson. Empregou-se duas metodologias: 1^a) cultura da porção proximal cotiledonar em meio MS modificado. 2^a) cruzamentos entre quatro cultivares, autofecundação e seleção para os caracteres de interesse. A metodologia para determinação de β -caroteno foi a de RODRIGUEZ *et al.* (1976). Aos 15 dias após o plantio em meio MS modificado, os cotilédones apresentavam calos, que foram divididos. Após 13 dias dessa divisão estavam aptos para o meio de regeneração MS completo. Em 30 dias as plântulas já podiam ser aclimatadas e, em 10 dias, transferidas para o campo. As diferenças dentre as plantas P₀, F₁, e F₂, indicam que a alface regenerada da cultura de cotilédones desenvolve variação somaclonal e esta, por sua vez, é capaz de segregar as mutações gênicas heterozigóticas. Todos os 61 cruzamentos feitos entre *Lactuca indica* e *Lactuca sativa* não formaram híbridos. Os dados obtidos por meio da análise das populações segregantes sugerem uma determinação genética relativamente simples para os caracteres: Resistência ao "tipburn"/susceptível, que é determinada pela presença de 2 genes e modificadores; Cabeça simples/bifurcada, 63:1; Espigamento tardio/precoce, 15:1; Resistente a septoriose/susceptível presença de 2 genes e modificadores; Formato tipo alface/almeirão, 63:1; Folha larga/estreita, 3:1; Presença de antocianina/ausência, 3:1; Sabor não amargo/amargo, 13:3 e Folha crespa/lisa, 15:1. Plantas com antocianina mostraram-se mais resistentes à septoriose e a "tipburn". Os testes feitos com as plantas atingidas pela "tipburn" deram negativos para o vírus do mosaico da alface, portanto a causa dessa enfermidade continua desconhecida.

2. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L. 1754) pertence ao grupo das 10 hortaliças folhosas mais populares e dentre as quais destaca-se como uma das que tem maior importância econômica. É largamente cultivada devido ao seu papel na alimentação humana. É consumida preferencialmente crua em saladas e em alguns locais (e.g. China) é utilizada refogada ou apenas passada em azeite quente. A dona de casa mineira, prefere as alfaces de cor clara e crespas que geralmente são muito pobres em vitaminas.

O Brasil é um país grande, ocupa quase todo o neotrópico: por ele passam a linha do Equador e o Trópico de Capricórnio, possui variações climáticas distintas entre suas regiões. Numa região pode-se ter variações de altitude e de precipitação. No período chuvoso, a produção de alface é muito prejudicada. Sendo uma planta delicada suas folhas são muito sensíveis a altas temperaturas, falta ou excesso de chuvas, geadas e granizo.

Temperaturas altas fazem com que as plantas desidratem-se muito rapidamente, mesmo quando cultivadas em hidroponia. O excesso de chuvas pode ocasionar podridão das folhas e facilitar a ocorrência e disseminação de doenças, principalmente quando a estação chuvosa está relacionada às altas temperaturas, o que ocorre no verão em muitas regiões brasileiras. Todo ano na Região Amazônica ocorrem áreas de alagamento que podem ser efêmeras (várzeas) ou permanentes (igapós) dificultando o cultivo. Nestes locais o plantio é feito em tabuleiros flutuantes. Deve-se utilizar cultivares tolerantes às chuvas e doenças desta região.

A ocorrência de geadas de inverno, como nas regiões sul e sudeste, inutiliza plantações pois queimam as plantas deixando-as impróprias para o consumo.

A alface é produzida o ano todo e é largamente consumida em Uberlândia. Sua cultura tem sido limitada por fatores ambientais e por moléstias. Seu plantio é fácil e pode ser feito em grande ou pequena escala. Com os investimentos em

estufas e hidroponia o produtor pode produzir alface sadia o ano inteiro. No solo sob Cerrado as alfaces produzidas, muitas vezes, são tão pequenas que o produtor precisa juntar alguns pés em um molho para obter um tamanho aceitável comercialmente. As alfaces produzidas por hidroponia são de tamanho médio para grande.

Dentre as várias moléstias que atacam a cultura de alface está a septoriose, doença causada pelo fungo *Septoria lactucae* (fungo imperfeito da classe Deuteromycetes da ordem Sphaeropsidales e Família Sphaeropsidaceae) que causa considerável perda na produção, principalmente durante o verão quando o ambiente quente e úmido é ideal para o desenvolvimento do fungo. Pouco se conhece sobre a herança dos mecanismos genéticos de resistência a este fungo.

A maior carência alimentar da população brasileira é a vitamina A, sendo aconselhável supri-la na forma de Beta-caroteno. Nas classes sociais economicamente baixas, esta deficiência vem causando grandes preocupações na comunidade científica. Como solução, os pesquisadores apontam o consumo de alimentos ricos em beta-caroteno (vegetais) ou retinol (fígado de animais). O perigo da vitamina A vendida livremente nas farmácias, e até em supermercados, é o uso indiscriminado pelas pessoas. O beta-caroteno que é encontrado nos alimentos de origem vegetal é facilmente eliminado ou não assimilado pelo organismo quando este é ingerido em quantidades maiores do que o que ele necessita. Isso não ocorre com a vitamina A que se acumula no fígado. A herança dos genes para teor de vitamina A em alface ainda não foi determinada porém sabe-se tratar de uma característica de efeito quantitativo.

A indução de mutações por meio da cultura de calos é uma forma artificial de se obter variabilidade genética complementando um método tradicional de melhoramento que são os cruzamentos controlados. Mutações ocorrem naturalmente mas em proporções muito baixas portanto sua indução artificial tornou-se uma estratégia importante para obter mais rapidamente uma característica desejada.

As plantas regeneradas de cultura de tecido e suas progênies têm revelado uma variação genética muito grande. Os mutantes provenientes da cultura de calos assemelham-se aos mutantes naturais porém ocorrem em número bem mais elevado (60%).

Com o advento da ecologia e proteção ao meio ambiente tende-se a desenvolver programas de melhoramento visando resistência a pragas e doenças que evitam o uso de agrotóxicos. Isto levará o geneticista a buscar fontes de resistência nas cultivares selvagens. O impacto de pesticidas químicos no meio ambiente tenderá a diminuir muito com o lançamento de cultivares resistentes no mercado.

Objetivou-se a obtenção de cultivares de alface ricas em vitamina A, sabor doce, tolerante à septoriose, folha larga, tolerância às fortes chuvas de verão, inflorescência tardia, adaptação à pH de 4 a 8.

Resultados
esperados

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Origem

De acordo com LINDQVIST (1960) a alface foi cultivada inicialmente por volta de 4500 A.C. HEDRICK (1919) cita que a alface chegou à Colômbia e ao Novo Mundo já no ano de 1492 e que foi cultivada no Brasil em 1647. No entanto SOUZA (1587) em "Notícia do Brasil" faz uma lista das hortaliças cultivadas no Brasil trazidas pelos portugueses e entre as quais se encontra a alface. Sendo este último o registro mais antigo que foi encontrado do cultivo da alface no país, tal olerícola encontra-se no Brasil há pelo menos, 411 anos.

A alface pertence a família Compositae ou Asteraceae, Subfamília Lactuceae (Cichorieae), ao gênero *Lactuca*, a espécie *Lactuca sativa* L. (RYDER & WHITAKER, 1990). A origem da alface cultivada ainda é incerta, apesar de terem sido encontrados indícios de seu cultivo na antigüidade. Existem numerosas referências na literatura grega e romana à este vegetal. Entretanto mais estudos são necessários para determinar sua origem (HEDRICK, 1919).

De acordo com RYDER & WHITAKER (1990) quatro espécies de *Lactuca* tiveram origem provavelmente na bacia Mediterrânea, são elas: *Lactuca sativa*, *Lactuca serriola*, *Lactuca virosa* e *Lactuca saligna*. A *Lactuca sativa* pode ter-se originado diretamente da *Lactuca serriola* por meio de seleção, pois todas as variações presentes na alface cultivada, exceto a forma da cabeça, estão presentes na forma primitiva.

3.2. Descrição

FILGUEIRA (1982) faz uma descrição da *Lactuca sativa* L. como sendo uma planta herbácea, com caule muito pequeno onde se prendem as folhas que se fecham ou não formando cabeça. As folhas podem ser lisas ou crespas, com bordas recortadas ou não. Seu caule às vezes pode apresentar ramificações, o que é considerado defeito. Suas folhas apresentam coloração desde o verde bem claro até

o verde-escuro, sendo que certas cultivares podem apresentar antocianina em algumas partes da folha ou em toda sua extensão. As raízes são do tipo pivotante, atingindo até 60 cm de profundidade, com ramificações delicadas, finas e curtas, explorando os primeiros 25cm de solo. É considerada uma cultura de raízes densas e um tanto superficiais. São predominantemente autofecundadas sendo a taxa de cruzamentos naturais de 1 a 3%.

De acordo com FILGUEIRA (1982), as cultivares podem ser reunidas em cinco grupos distintos de acordo com o aspecto das folhas e a formação de cabeça:

1. Repolhuda manteiga - as folhas são lisas, muito delicadas, aspecto "amanteigadas", formando uma cabeça repolhuda bem compacta. Exemplos; Vivi, Aurélia, White Boston;
2. Repolhuda crespa - folhas crespas, consistentes, formam cabeça compacta. Exemplos: seleções da cultivar americana Great Lakes;
3. Solta lisa - folhas soltas e lisas, mais ou menos delicadas, não formam cabeça compacta. Exemplo: Babá de verão
4. Solta crespa - folhas crespas, consistentes, soltas, sem formarem cabeça. Exemplos: Grand Rapids e suas seleções.
5. Romana (ou Cos) - folhas alongadas, duras, com nervuras evidentes, cabeça alongada e fofa. Exemplos: Romana Balão, Valmaine. O nome Cos provém da ilha grega Kos.

RYDER e WHITAKER 1990 citam em seu trabalho que vários países produzem alface para exportação, e que estas são cortadas em pedaços e acondicionadas em diversos tipos de embalagens.

3.3. Genética

BABCOCK *et al.*(1937) em seus estudos concluem que o gênero *Lactuca* possui espécies com 8, 9 e 17 pares de cromossomos. Segundo MENEZES (1943) a *Lactuca sativa* variedade romana possui $n = 9$ cromossomas.

Estudos genéticos em alfaces foram feitos por RYDER (1963) que determinou o caráter de herança para cor de flores e vários caracteres de folha

(Tabela 01). KERR *et al.* (1986a) fizeram estudos sobre a variação genética a partir do cruzamento da alface Salad Bowl com Maioba para características como resistência, ramificação e outras (Tabela 02). Outros caracteres foram estudados por DURST (1929), (Tabela 03).

Tabela 01 - Estudos sobre herança em alface (*Lactuca sativa*) feitos por RYDER, 1963

Caracter Dominante	Caracter Recessivo
cor da folha normal (Vi)	esverdeamento (vi)
lisas (Sc)*	enrugadas (sc)
margem da folha normal (Ct)	recortada (ct)**
folha normal (Fr)	folha franjada (fr)
folhas separadas (Cr)	folhas unidas (cr)
folha normal (St)	folha atrofiada (st)
flores amarelas (Pa)	flores pálidas (pa)
pilosidade normal (Lh)	folhas muito pilosas (lh)

* -Folha lisa é parcialmente dominante sobre enrugada.

** -O genótipo para folha recortada inibe temporariamente a produção de antocianina. O heterozigoto mostra penetrância incompleta.

Tabela 02 - Estudos sobre variação genética em alface a partir do cruzamento da cultivares Salad Bowl e Maioba feitos por KERR, 1986a.

Caráter dominante	Caráter recessivo	Segregação
resistencia à pinta foliar (P-Q-)*	suscetibilidade à pinta (ppqq)	15:1
flores amarelo intenso (Pa-,A-,I-)	flores amarelo claro (papa,aa,ii)	63:1
folha verde escuro (C-V-)*	folha verde clara (C-vv+ccV-+ccvv)	9:7
planta ramificadas (R-)	não ramificada (rr)	3:1
folha picotadas (P-L-+P-ll+ppll)	lobadas (ppL-)**	13:3

* -No caráter verde escuro é muito provável um caso de epístase duplo dominante.

** - No caráter folha lobada ocorre epístase dominante recessiva. Presença de 2 genes.

• No caráter resistência à pinta ocorre dois genes dominantes.

Tabela 03 - Estudos genéticos de herança feitos por DURST, 1929.

Caracter Dominante	Caracter Recessivo	Segregação
sementes preta (B ₋)	semente branca (bb)	3:1
presença de antocianina na folha (An ₋)	ausência de antocianina na folha (anan)	3:1
folha espinhosa (Ep ₋)	folha lisa (epep)	3:1

3.4. Problemas que Afetam a Cultura da Alface

3.4.1. Clima e pH

É uma cultura tipicamente de inverno. Temperaturas amenas são essenciais, durante toda a fase vegetativa do ciclo. Baixas temperaturas noturnas inferiores a 15°C, são mais importantes, em relação às diurnas. Temperaturas mais elevadas (20 - 30°C) aceleram o ciclo cultural e reduzem a produtividade. Em geral não são muito tolerante a solos ácidos, exigindo um pH de 6,0 a 6,8, para boa produção (FILGUEIRA, 1982). A cultivar Maioba germina em pH 4,0 e temperatura de 28° a 35° C, produz boa semente (KERR *et al.*, 1990).

Sob condições de temperatura elevada a alface apressa a fase vegetativa, atingindo precocemente a fase reprodutiva, caracterizada pelo rápido alongamento do caule, folhas de tamanho e número reduzidos, sabor amargo, portanto impróprias para o consumo (DUARTE *et al.*, 1991).

Segundo NAGAI (1983), para a produção de alface de boa qualidade no verão, o florescimento precoce é menos importante nos programas de melhoramento do que características como resistência à podridão, e folhagem farta e rígida para suportar os danos causados pelas chuvas.

A cultivar Vitória (ou Vitória de Santo Antão) apresenta rendimentos durante o período chuvoso acima de 23000 Kg/ha, tendo apresentado destaque quando comparada a outras cultivares e apresenta ainda bons rendimentos no período seco.

Tanto no período chuvoso quanto no período seco, a crespa Simpson apresentou significativo número de plantas pendoadas suscetibilidade a ataques fúngicos (DUARTE *et al.*, 1991).

3.4.2. Doenças

A septoriose (*Septoria lactucae*) é uma doença cosmopolita, ocorrendo no Brasil em todos os Estados, embora seus danos sejam maiores nas regiões quentes e úmidas. Em condições de campo o desenvolvimento da doença é máximo entre 22° e 26° C, com umidade relativa elevada e com chuvas que possibilitem a disseminação dos conídios (TOKESHI & CARVALHO, 1990).

Em relação à resistência à moléstias fúngicas são conhecidos dois sistemas de incompatibilidade. Um ocorre em um tipo de parasitismo menos avançado e facultativo, que é baseado na morte da célula hospedeira. O fungo secreta substâncias que dissolvem as paredes celulares ou destroem o citoplasma. O patógeno possui um elicitor fúngico específico, atuando como uma toxina que pode ser compatível ou incompatível com as moléculas produzidas pelo genótipo hospedeiro (MACKEY, 1986). O outro sistema acontece em fungos patogênicos obrigatórios, que não necessitam invadir as células hospedeiras para se nutrirem. O parasita e a célula hospedeira são separados por complexas séries de membranas através das quais os nutrientes são transportados. Desde que as células hospedeiras não estejam mortas, elas podem agir direta ou indiretamente causando a morte do parasita obrigatório. Um gene virulento do patógeno corresponde a um gene específico para resistência no hospedeiro (MACKEY, 1986).

No estudo das interações hospedeiro patógeno *in vitro* e no desenvolvimento de cultivares resistentes a moléstias, bem como em outros trabalhos de melhoramento genético, a cultura de tecidos apresenta-se como uma ferramenta promissora. A grande vantagem que esta técnica oferece é a possibilidade de se controlar os efeitos da variável ambiente, visto que em estudos a campo a precisão é

geralmente reduzida pela variação entre localidades e por flutuações climáticas de ano a ano. Além disso, culturas *in vitro* permitem a utilização de grande número de genótipos ao longo do ano dentro de um espaço relativamente pequeno (WOLF & EARLE, 1990).

3.5. Vitamina A

As alfaces compradas no mercado, em sua grande maioria, têm baixo teor de pró-vitamina A e C (0 a 1000 U.I. de vitamina A e 5 mg de vitamina C). A composição química de dois tipos de alface foi determinada por LEUNG & FLORES (1961) (Tabela 04).

Tabela 04 - Composição de dois tipos de alface por 100g de folha feita por LEUNG & FLORES, 1961.

<i>Composição</i>	<i>Repolhuda</i>	<i>Romana</i>
Calorias	13	15
Água (%)	95,8	94,9
Proteína (g).	1,0	1,3
Gordura (g).	0,1	0,2
Carboidratos (g).	2,7	2,9
Fibra (g).	0,5	0,7
Cinzas (g).	0,4	0,7
Cálcio (mg).	16	43
Fósforo (mg).	23	34
Ferro (mg).	0,4	1,3
Vitamina A (mg).	0	260
Vitamina B1 (mg).	0,05	0,08
Vitamina B2 mg	0,03	0,08
Vitamina B6 (mg).	0,3	0,4
Vitamina C (mg).	07	12

GIUGLIANO *et al.* (1978) constataram uma grande deficiência alimentar em vitamina A na população de Manaus. MAC DONALD (1981) mostrou a deficiência de vitamina B₂ em São Luís (MA). SANTOS *et al.* (1981) verificaram nos bairros pobres de S. Luís (que perfaz mais de 60% da Cidade) 92,3% de crianças que apresentavam pelo menos um sinal de avitaminose A e 58,9% de avitaminose B₂.

A deficiência de vitamina A e B₂ prejudica o desenvolvimento, dificulta a aprendizagem (a primeira por as crianças não enxergarem direito e a segunda por elas não concatenarem corretamente diferentes conhecimentos) (KERR *et al.*, 1986b).

A carência de vitamina A causa inicialmente uma falta de adaptação do animal ao escuro, que pode progredir até a cegueira noturna total (nictalopia). Os órgãos sexuais dos machos e das fêmeas sofrem alterações histológicas e as glândulas tornam-se atroficas, e se ocorrer fecundação, o feto é reabsorvido, mumificado, nasce morto ou defeituoso. Altera ainda, a formação normal dos mucopolissacarídeos e isto faz com que o epitélio normal dos órgãos seja substituído por um epitélio queratinizado. Uma aminoacil transintetase tem a sua síntese diminuída, durante a deficiência de vitamina A, indicando que tanto a transcrição como a tradução da mensagem genética pode ser afetada pelo estado nutricional referente a vitamina A (ISLABÃO, 1977).

As manifestações clínicas da deficiência de vitamina A caracterizam-se por retardamento no crescimento, e um abaixamento na resistência a infecções, principalmente a resfriados e infecções dos sinus (sinosites), sendo nestes casos mais eficientes que a vitamina C. O ácido retinóico, com exceção da visão e da reprodução, desempenha todas as outras funções da vitamina A. Observa-se em aves que a adição de ácido retinóico mantém normal a produção de ovos e o tamanho dos ovos e o desenvolvimento, exceto o conteúdo em vitamina A do ovo que é baixo, em virtude do ácido retinóico não se depositar no ovo. Embriões de ovos de aves,

sem um nível adequado de vitamina A são mal formados, sem vascularização e normalmente não se desenvolvem (ISLABÃO, 1977).

A vitamina A, nas suas várias formas (retinol, éster de retinila, retinal, 3-diidrorretinol, ácido retinóico) vem de alimentos de origem animal (fígado, carnes, leite, laticínios, peixes). Os vegetais fornecem as pró-vitaminas A, carotenóides que são transformados em vitamina A dentro dos animais. Porém, nem todos os carotenóides são precursores de vitamina A e, aqueles que o são, variam em atividade biológica. A vitamina A é essencialmente a metade da molécula de beta-caroteno, portanto, este carotenóide é uma próvitamina A potente, a qual atribui-se 100% de atividade. Outras pró-vitaminas A possuem ao redor de 50% de atividade. Estima-se que os carotenóides pró-vitâmicos contribuem com 68% da vitamina A na dieta mundial, porcentagem essa que aumenta para 82% em países em desenvolvimento (SIMPSON, 1983).

A vitamina A apresenta-se em duas formas principais que são denominadas vitamina A₁ e A₂. A vitamina A₁ se caracteriza quimicamente por apresentar um anel β-ionona ligado lateralmente a uma cadeia formada por unidades isoprênicas com duplas ligações alternadas. Ela pode apresentar-se na forma de álcool (retinol), na forma de aldeído (retinal) e na forma de ácido (ácido retinóico). A forma alcóolica é a principal forma química existente no reino animal e pode ser facilmente reduzido a retinal ou oxidada a ácido retinóico. Na extração de caroteno são usados solventes orgânicos como a acetona, o hexano, o éter de petróleo, etanol ou a combinação de dois ou mais solventes (ISLABÃO, 1977).

→ As hortaliças folhosas, sem exceção que conheçamos, contém os carotenóides principais: beta-caroteno, luteína, violoxantina e neoxantina. Desses, apenas o beta-caroteno é um bom precursor de vitamina A. Ocasionalmente, alfa-caroteno, beta ou alfa criptoxantina, luteína-5, 6-epóxido são também encontrados, mas em traços ou pequenas quantidades. Dada sua baixa atividade e concentração sua contribuição é praticamente desprezível. Assim a vitamina A das hortaliças

folhosas é obtida em sua maioria do beta-caroteno-(GOODWIN & BRITTON, 1988; MERCADANTE & RODRIGUES-AMAYA, 1990).

Os carotenos, assim como as diversas formas de vitamina A, são sensíveis a oxidação. As perdas maiores ocorrem durante a desidratação e armazenamento do material, sendo a temperatura o principal fator responsável por essas perdas. O caroteno é destruído enzimaticamente por uma carotenase existente no trato digestivo dos animais. A conversão de β -caroteno em vitamina A varia de espécie para espécie e dentro da mesma espécie (ISLABÃO, 1977).

3.6. Cultura de Tecidos - Variação Somaclonal

No dia 20-12-1983, no Congresso Internacional de Genética, em Nova Delhi (Índia), o Professor WARWICK ESTEVAM KERR (c.p.)¹ apresentou a seguinte hipótese: “As mutações podem ser resultantes: da substituição direta ou inserção de seqüências de bases, ou perda de nucleotídeos ou até por ruptura mecânica do material hereditário. Existem mecanismos naturais de reparo de DNA que procuram reparar os erros cometidos (DNA-polimerase, ligase). Em todos os tecidos vegetais existem esses mecanismos de reparo para garantir a perfeita expressão do genoma. Porém achamos que em certos tecidos esse mecanismo é menos eficiente. Talvez, porque não haja necessidade da planta dispor de energia para o mecanismo de reparo de um tecido decíduo, ou seja, que vai ser descartado em pouco tempo”. Daí nasceu nossa tentativa de teste: como o cotilédone, dura muito pouco tempo, deve possuir um mecanismo de reparo ineficiente, portanto com taxa de mutação maiores. Os resultados aqui obtidos constituem um teste daquela hipótese.

ENGLER & GROGAN (1983) afirmam que ainda são necessários muitos estudos para identificar a origem e natureza da “variação somaclonal”, os quais são limitados pela complexidade do genoma da planta e a propagação vegetativa. Os resultados publicados de espécies não diplóides propagadas vegetativamente (ex:

¹ c.p. - comunicação pessoal

cana de açúcar e batata) não permitem diferenciar as várias teorias sobre a natureza da variação somaclonal. Os autores portanto sugerem o uso da alface para se estudar a variação somaclonal por ser propagada por semente e predominantemente auto fecundada; considerada apropriada para investigações da hereditariedade das mutações em cultura de tecidos de plantas. Trabalhando com calos de plantas de alface em cultura de protoplastos chegaram à conclusão que 27°C seria a melhor temperatura para incubação das placas. Eles constataram que a taxa de crescimento de calos aumentava com a temperatura atingindo o máximo de 30°C. No entanto, nesta temperatura não houve formação de brotos. Eles utilizaram succinato de sódio junto ao tampão do meio para evitar que o pH final das placas caísse abaixo de 5,5.

ENGLER & GROGAN (1984) quantificaram e qualificaram a variação somaclonal numa população de plantas regeneradas de protoplastos. A anomalia mais frequente que encontraram nos clones foi a baixa quantidade de sementes produzidas, menos de 100 sementes por planta comparada com a média de 5000 sementes por controle. Quanto ao número de flores produzidas e quantidade de pólen normal por flor não houve diferença do controle. A primeira geração desses clones autofecundados mostrou grandes variações fenotípicas no estágio de plântulas inclusive apresentando na maioria dos casos segregação 3:1 demonstrando que o clone em questão carregava mutações recessivas num gene nuclear simples. Para o caráter vigor de plantas houve clones 100% variantes. As variações eram positivas em alguns casos e negativas em outros, no entanto essas variações desapareciam 2-3 semanas depois. Eles determinaram que 58 famílias de clones foram indistinguíveis das famílias controles com base na observação geral do fenótipo, 11 famílias de clones segregaram para o fenótipo mutante, e 2 famílias foram 100% variantes. Sugerem que ocorram mutações herdadas citoplasmaticamente e mutações nucleares recessivas sendo as últimas mais prevalentes. Entretanto não descartaram a hipótese de que algumas mutações eram

preexistentes nas células dos explantes. Os autores não foram capazes de encontrar uma segregação quantitativa.

A reestruturação do genoma na cultura de tecido pode não seguir a mesma seqüência que ocorre em condições naturais. Ao invés disso, o genoma é anormalmente reprogramado ou reestruturado (mutagênese, duplicação, deleção, translocação e inversão). Essas reestruturações podem produzir uma grande alteração na expressão fenotípica. Algumas das alterações fenotípicas são prontamente observadas na produção de clones. Outras aparecem em suas progênes. Suas associações com mudanças genotípicas permanecem desconhecidas. Outros fenótipos alterados claramente refletem reestruturação genômica e vários níveis disso têm sido observados. Podemos afirmar que nenhum dos calos derivados de plantas são exatamente iguais e nenhum é praticamente igual à planta que lhe doou a célula ou células para a cultura de tecido. Os vários níveis de modificação genômica que já são conhecidos e expressados como genótipos e fenótipos modificados poderiam ser fontes para seleção de plantas matrizes e, incidentalmente, para ponderação teórica pelos biólogos (PHILLIPS, *et al.*, 1994).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Germoplasma

Foram utilizadas as cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) Moreninha de Uberlândia, Maioba, Vitória de Santo Antão e Simpson e o Almeirão Roxo (*Lactuca indica*).

4.1.1. Maioba

Maioba é um bairro de hortigranjeiros distante 12 a 20 Km de São Luís (MA) de onde provem a alface “Maioba”, assim chamada por mais de 80 anos. Em 1985, apareceu uma mutação dessa cultivar numa horta do bairro Vassoural (Ilha do Maranhão). Testes mostraram que o mutante possuía o dobro de vitamina C e o triplo de vitamina A do que a Maioba verde claro. Com a seleção natural desde 1570, desenvolveu-se uma alface tolerante a solos ácidos o que facilitou seu plantio nas regiões de Cerrado ao ser trazida para o Brasil Central (KERR *et al.*, 1990).

A cultivar Maioba tem sistema radicular mais desenvolvido que as demais, selecionada que foi para solos pobres e ácidos da ilha do Maranhão. Possui 6500 U.I./100g de vitamina A., as sementes são grandes, pretas e possuem comprimento médio de 4,2mm e em 5 dias apresentam excelente germinação. Possui folhas crespas e soltas que não formam cabeça. As alfaces estão prontas para serem consumidas em 60 dias; podem permanecer, no campo por mais 10 dias. Aos 70 dias inicia-se o desenvolvimento de capítulos amarelo intensos, as flores iniciam a abertura das anteras das 5 às 9 horas da manhã.

A Maioba é uma alface de tamanho ótimo, bom sabor e boa resistência a doenças, sendo, após o início do pendoamento, susceptível a *Septoria lactucae*. Em produção foi superior a todas as variedades testadas nas condições utilizadas pelos hortigranjeiros de São Luis, MA: Vivi, Viviana, Vitória de Santo Antão, Salad Bowl (Burpee), Brasil, Romana, de Mesa, de Verão (Yates). Possui o tipo aberto,

medianamente crespa, adaptada a solos com ampla faixa de pH (germinou em pH 3,8 a 8,0) e alta concentração de Al^{3+} , além de ser melhor do que outras variedades, em composição de sais minerais e vitaminas e verificou-se que se apresenta útil ao plantador dos 45 aos 70 dias (KERR, 1986a, b, 1990).

4.1.2. Salad Bowl

Em 1952, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos entregou ao público americano a alface Salad Bowl cuja principal qualidade era ser muito rica em vitamina A, com cerca de 2100 a 2420 U.I./100g (ALMEIDA, 1991). Todavia, possui folhas com formato não muito aceito pela população. Tem parentesco de hibridação complexa. É uma variedade fora das classificações comuns. Suas folhas são lobadas, o pendoamento é vagaroso e apresenta também alto teor de vitamina C. É resistente à “tipburn” das bordas e à alta temperatura (WINGES, 1972). Do cruzamento da Salad Bowl com Maioba, na geração F_6 , originou-se a Moreninha de Uberlândia.

4.1.3. Moreninha de Uberlândia

A origem da Moreninha começou com uma mutação verde escura que apareceu numa horta do Sr. Nelson Costa, em 15/3/85, no bairro Itapiracó, na divisa dos municípios de São Luís e Passo do Lumiar, numa plantação da cultivar Salad Bowl. As sementes do mutante foram plantadas e, quando começaram a florescer, foram cruzadas com pólen de três plantas da alface Maioba verde clara. Os F_1 foram plantados e nos F_2 segregaram alfaces verde escuro (3/4) e verde claro (1/4), sendo estas últimas descartadas. No F_3 foram identificadas as plantas AA ou as F_2 correspondentes e as Aa; estas últimas foram descartadas (ALMEIDA JR. 1991).

Apresentam de 7000 a 12000 U.I. de vitamina A; as sementes são pretas, médias e possuem comprimento médio de 3,1mm; seu tempo de germinação é ao

redor de cinco dias. Em sessenta dias estão prontas para consumo; podem permanecer, no campo, por mais vinte dias, com pigmentação de antocianina, que desaparece na floração. O diâmetro da cultivar varia de 30 a 45 cm, e a altura de 15 a 25 cm. O florescimento inicia-se 80 dias após o plantio, apresentando capítulos de cor amarelo-intenso. O sistema radicular é mais desenvolvido do que o da Grand Rapids porém menos desenvolvido que o da Maioba. As plantas são resistentes a *Septoria lactucae*.

4.1.4. Vitória de Santo Antão

A alface Vitória de Santo Antão procede do IPA de Pernambuco e é excelente para clima quente e seco.

4.2. Dados Geográficos e Climáticos

O experimento foi realizado na Cidade de Uberlândia, $18^{\circ} 55' S$ e $48^{\circ} 17' W$, 872,00m de altitude.

Foram utilizadas duas áreas experimentais:

- 1- Área experimental do Campus Umuarama, $18^{\circ} 53' 10'' S$ e $48^{\circ} 15' 45'' W$, 931m de altitude;
- 2- Fazenda experimental do Glória, $18^{\circ} 57' 10'' S$ e $48^{\circ} 12' 30'' W$, a 870m de altitude.

Todos os dados coletados de temperatura e pluviosidade durante a realização do experimento foram transformados em gráficos (Figuras 01, 02, 03, 04, 05 e 06).

Os dados geográficos e climáticos foram fornecidos pela Estação Parque do Sabiá e pelo Departamento de Geografia (UFU).

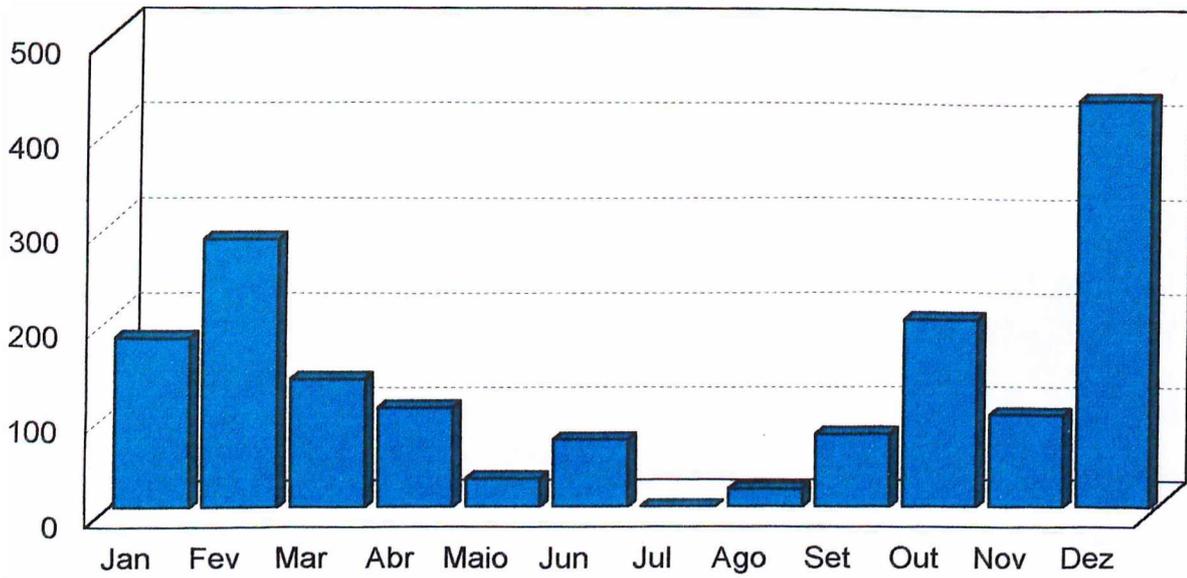


Figura 01: Totais Pluviométricos (mm) - Uberlândia - MG.(1993).

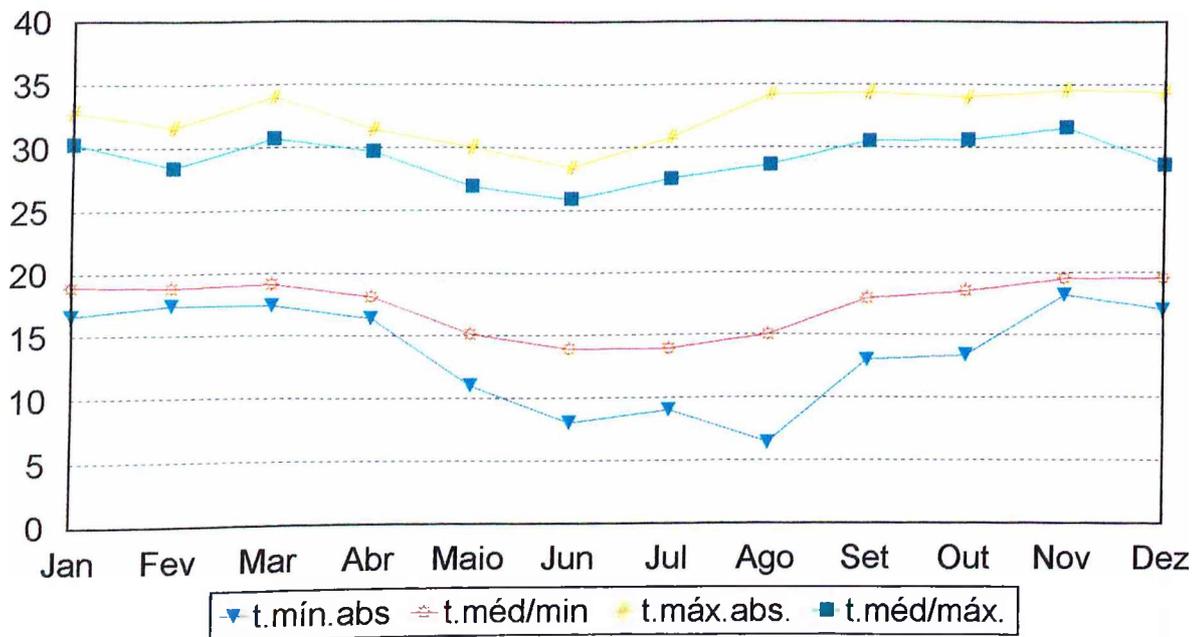


Figura 02: - Variação de Temperatura (°C) em Uberlândia - MG. (1993).

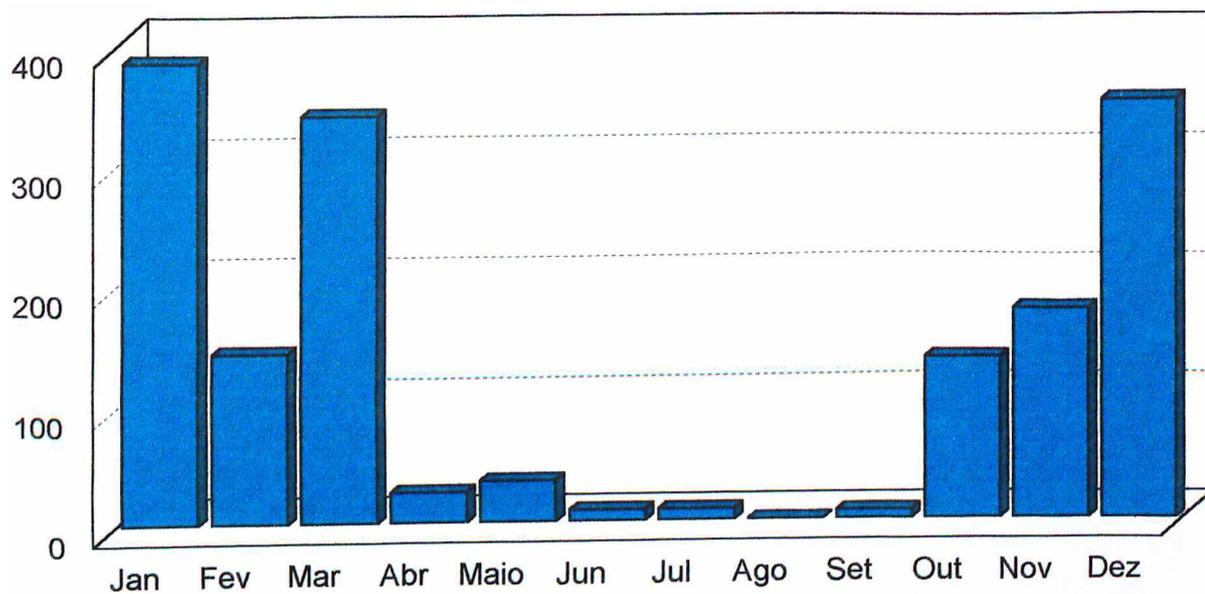


Figura 03: Totais Pluviométricos (mm) - Uberlândia - MG.(1994).

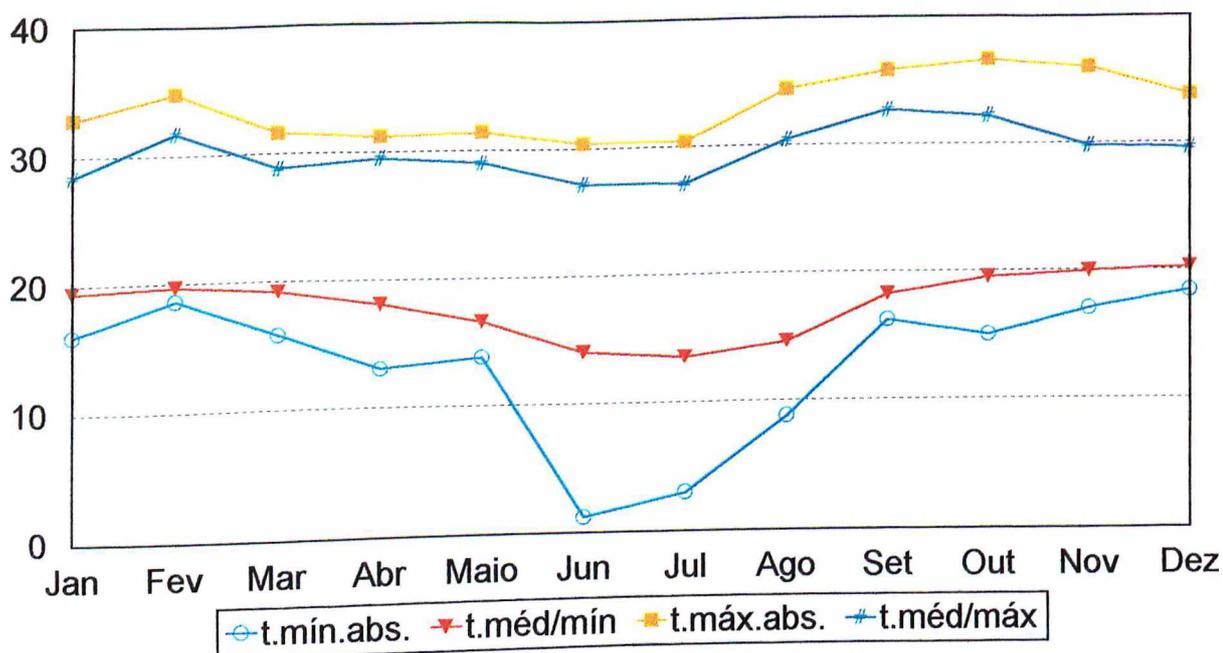


Figura 04: Variação de Temperatura (°C) em Uberlândia - MG. (1994).

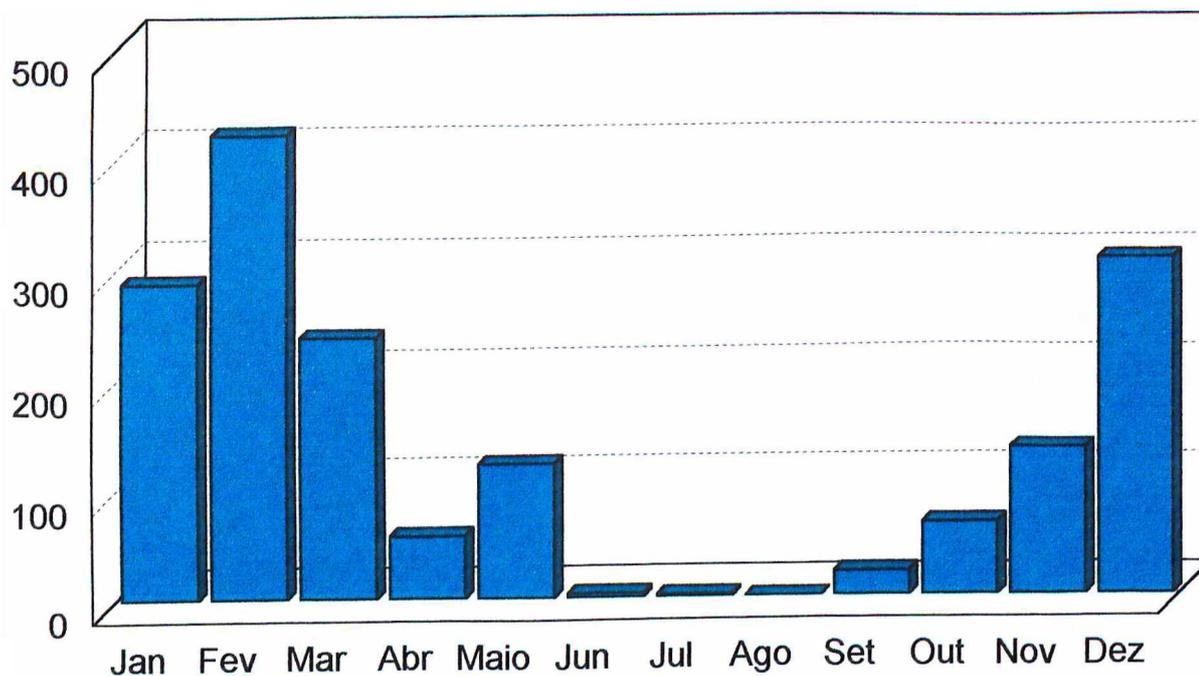


Figura 05: Totais Pluviométricos (mm) - Uberlândia - MG. (1995).

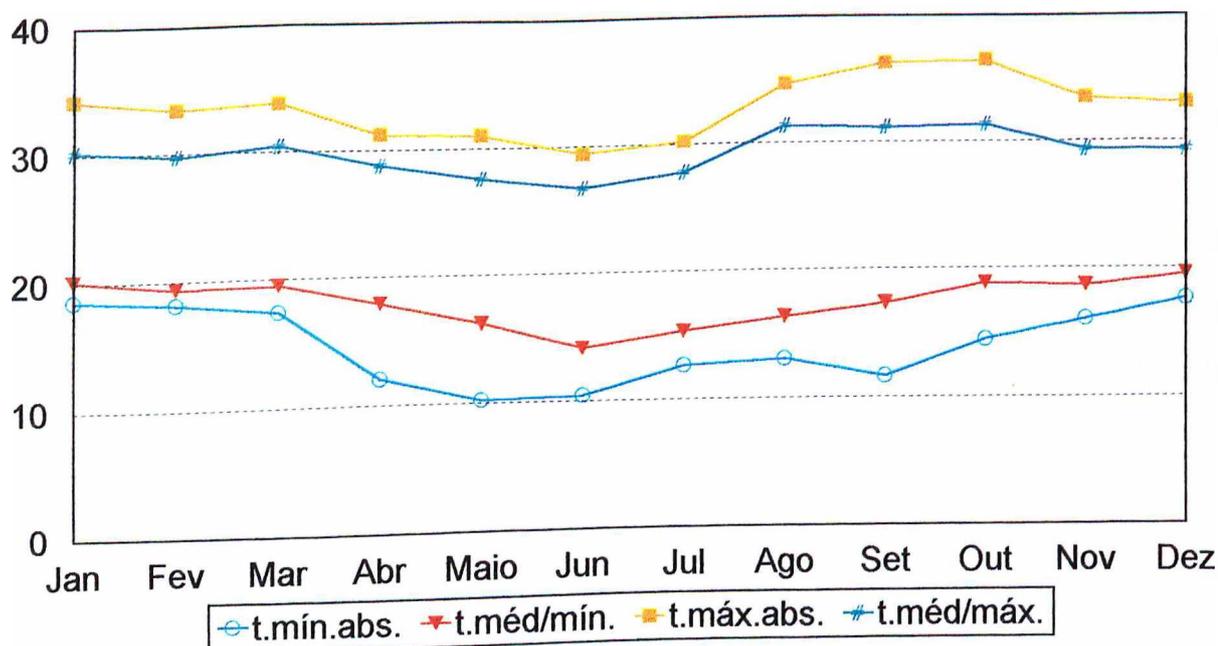


Figura 06: Variação de Temperatura (°C) em Uberlândia - MG.(1995).

4.3. Cultura de Tecidos

A assepsia da sala foi feita com uma solução de formol + detergente + água, álcool 70% e luz ultravioleta.

Foram utilizadas sementes da cultivar Maioba para germinação *In vitro*. As sementes foram colocadas por 1min no álcool 70% e depois em uma solução 1:1 de água e hipoclorito de sódio acrescida de 2 gotas de tween, por 15 min sob agitação constante em agitador magnético. Estas foram levadas para a capela de fluxo laminar em ambiente completamente estéril onde foram lavadas 6 vezes em água destilada estéril. Sendo o álcool altamente tóxico a qualquer célula, deve-se tomou-se muito cuidado ao utilizá-lo para não causar danos ao embrião.

Foram utilizadas pinças, bisturí cirúrgico e placas de petri. Todo material foi autoclavado a 120°C por 20 minutos e os instrumentos metálicos foram constantemente flambados durante o plantio. As sementes foram colocadas para germinar (1994) em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) completo e sólido para garantir boas condições de germinação da planta, essencial para a cultura de cotilédones ter sucesso. Foram vedadas com película de PVC e colocadas na câmara de crescimento sob luz branca fria de intensidade de 3000 lux e temperatura variando de 22 a 28°C e fotoperíodo de 16hs.

Os explantes foram extraídos três dias após a emissão da radícula, sendo utilizado como explante a porção proximal da folha cotiledonar. O meio utilizado para a indução de calos foi o MS completo, acrescido de 30g/l de sacarose, 8g/l de ágar, 0,1mg/l de 6-BA(6-benzilaminopurina) e 5mg/l de AIA (ácido indolacético) (CASALE *et al.* 1994). O pH foi ajustado para 5,7 utilizando HCl e NaOH.

Após duas semanas quando os calos atingiram o tamanho aproximado de 1cm de diâmetro foram divididos e transferidos para outras placas contendo o mesmo meio por mais 13 dias. Ao atingirem aproximadamente 0,8mm de diâmetro foram

novamente divididos e transferidos para meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) completo para diferenciação.

Ao final de uma semana já se podia ver, diferenciando-se, as pequenas brotações verdes, que eram separadas e recolocadas em meio MS completo para a regeneração.

4.3.1. Aclimação

Após duas semanas, quando as pequenas alfaces atingiram 2cm de altura e estavam enraizadas, foram transferidas para vasos contendo substrato e cobertas por uma campânula (feitas de garrafas plásticas de refrigerantes) para aclimação. Nos dois primeiros dias foram mantidas em laboratório com luz e temperaturas controladas. No terceiro dia foram levadas à casa de vegetação onde a campânula era retirada, inicialmente, à noite e recolocada durante o dia; depois passou a ser retirada por curtos períodos durante o dia, que foram prolongados até que se retirou por completo (simulação de ambiente para aclimação). Os pratos que ficavam sob os vasos eram mantidos constantemente cheios de água.

4.4. Condições de Campo

Quando estavam já completamente adaptadas foram transferidas para o campo, onde ficaram sob uma cobertura de sombrite 50% por uma semana; depois foram descobertas.

Os canteiros foram preparados com adubo orgânico (cama de frango) e adubo Fosmag. Os canteiros eram limpos semanalmente. Durante a floração, no período chuvoso os canteiros foram cobertos com plástico transparente sobre uma armação de ferro e foram regados 3 vezes ao dia.

As plantas doentes, muito pequenas e claras eram eliminadas, após efetuar as anotações devidas. Os indivíduos selecionados foram marcados para produzir sementes. As plantas, quando estavam pendendo, eram estaqueadas com varas de

bambu e amarradas com cordão de nylon. As sementes foram colhidas manualmente e quando secas eram armazenadas em saquinhos de pipoca e colocadas em vasilhames de plástico com sílica gel.

Para semeadura usou-se bandejas de isopor do tipo "speedling" com 128 células de formato piramidal com 6,2 cm de profundidade. O plantio deu-se sob estufa, semeando-se a 3mm de profundidade.

4.5. Cruzamentos Controlados

Os cruzamentos efetuados estão descritos na Tabela 05.

Tabela 05 - Designação dos cruzamentos feitos

Cruzamentos	Número de cruzamentos
Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão	01
Moreninha de Uberlândia X Simpson	01
Moreninha de Uberlândia X Maioba	01
Maioba X (Moreninha X Vitória de Santo Antão) F_6	02
(Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão) F_6 X	26
(Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão) F_5	
(Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão) F_6 X	29
(Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão) F_6	
(Moreninha de Udia X Vitória de Santo Antão) F_6 X Maioba	03
<i>Lactuca indica</i> X (Moreninha X Vitória de Santo Antão) F_5	19
(Moreninha X Vitória de Santo Antão) F_5 X <i>Lactuca indica</i>	36
<i>Lactuca indica</i> X (Moreninha de Uberlândia X Vitória de	06
Santo Antão) F_6	
(Moreninha X Simpson) F_6 X (Moreninha X Vitória de Santo	01
Antão) F_5	
(Moreninha X Vitória de Santo Antão) F_5 X (Moreninha X	03
Simpson) F_6	

Os métodos usados foram cruzamentos entre cultivares, autofecundação e seleção para os caracteres de interesse. Sendo uma planta predominantemente autofecundada os cruzamentos são difíceis de serem realizados porque as flores são pequenas e abrem-se entre 6 e 6:30 da manhã. A número de sementes produzidas por capítulo cruzado é de 4 a 6.

Para semeadura usou-se bandejas de isopor do tipo "speedling" com 128 células de formato piramidal com 6,2 cm de profundidade. Foram semeadas a 3mm de profundidade e colocadas em estufa. Onde foram regadas três vezes ao dia.

4.6. Método de Polinização

A *Lactuca sativa* possui uma inflorescência racemosa com aparência de uma flor simples. O capítulo é constituído de 6 a 12 flores iguais entre si, assentadas sobre um receptáculo comum cercado por brácteas. As flores são hermafroditas, onde a corola forma um tubo cilíndrico. O estilete possui pêlos coletores, distribuídos em toda sua extensão. As anteras são concrecidas entre si, formando um tubo onde os grãos de pólen são liberados. As flores de um capítulo abrem-se uma única vez pela manhã. Numa inflorescência os capítulos podem abrir-se em dias diferentes, portanto numa mesma inflorescência pode-se existir desde sementes maduras até botões que ainda não se abriram. À medida que os raios de sol alcançam o capítulo as flores vão se abrindo, enquanto o estilete vai se alongando através do tubo e varrendo o pólen das anteras com seus pêlos coletores como uma mine-escova de limpar garrafa. O estigma torna-se receptivo após completar sua passagem pelo do tubo formado pelas anteras e são polinizados. Cerca de 18 horas antes da antese, as brácteas que circundam o capítulo começam a se abrir no topo devido ao desenvolvimento dos botões florais. A abertura inicia-se às 6 horas da manhã, durante 2 a 3 horas. Após 5 horas a corola fecha-se sobre a flor e não mais se abre. Em 24 horas as corolas, estames, estiletos e estigmas estão murchos. O aquênio alonga seu rostro filiforme na ponta do jovem fruto. As 6 a 12 sementes

tornam-se maturadas cerca de 20 dias após a fecundação quando as brácteas se abrem novamente, dessa vez não para expor a flor a ser fecundada mas a semente, pronta para ser dispersada pelo vento.

O processo foi o mesmo utilizado pelos operadores de São Luís do Maranhão. O sol nasce às 6:00 horas; portanto deve-se começar a lavar as flores às 5:00 hs. Este processo é feito com um borrifador de água (como aquele que é usado pelos cabeleireiros). Após borrifar água sobre cada capítulo sopra-se com força sobre a flor para retirar toda água de dentro. Repete-se esta operação em intervalos de 30 minutos até que os estigmas já estejam receptivos e completamente livres de pólen (em Uberlândia por volta das 9:00). Após a última lavagem espera-se 15 minutos para que o estigma se seque. Coloca-se então a flor usada como masculina sobre a flor usada como feminina (capítulo), dando um leve piparote² na flor masculina, para derrubar maior quantidade de pólen sobre a flor feminina.

Foram feitos os cruzamentos entre Moreninha de Uberlândia (resistente, alto teor de vitamina A e gosto um tanto amargo) X Vitória de Santo Antão (susceptível, teor de vitamina A baixo e gosto ótimo) e Moreninha de Uberlândia X Simpson (susceptível, baixo teor de vitamina A e gosto bom)

4.7. Metodologia Química para Determinação da Vitamina A

A metodologia utilizada para a determinação dos teores de beta-caroteno e carotenóides totais é a mesma descrita por RODRIGUEZ *et al.* (1976) e RODRIGUEZ-AMAYA *et al.* (1988).

Cada amostra de folhas foram cuidadosamente picadas, separou-se cerca de 4g, que foram colocadas em acetona (30 ml) por cerca de 10 min.

A extração foi feita triturando-se cada amostra com acetona e hiflosupercel (10g), seguido de filtração a vácuo em funil de Büchner. A extração e filtração foram repetidas até que o resíduo se tornasse incolor.

² - Piparote - pancada que se dá com a cabeça do dedo médio ou do índice apoiado sobre o polegar e soltando-se com força

Os pigmentos foram transferidos para éter de petróleo, colocando-se o extrato cetônico em um funil de separação adicionando-se éter de petróleo. Cada adição foi seguida de lavagem com água destilada, descartando-se a camada inferior (água + acetona) após a separação das fases. A lavagem foi repetida até que toda a acetona fosse retirada.

Feita a transferência total do extrato para o éter de petróleo, mais três lavagens com água destilada foram feitas para assegurar a retirada total da acetona. Sulfato de sódio anidro foi colocado para a retirada da água residual. A solução de pigmentos foi então completada para o volume de 100 ou 200 ml em balão volumétrico graduado e fez-se a leitura dos carotenóides totais a 448 nm. Para alfaces, a etapa de saponificação torna-se desnecessária. Colocou-se para evaporar em roto evaporador não excedendo à temperatura de 35 °C.

A separação do beta-caroteno foi feita em coluna de vidro (2 cm de diâmetro e 30 cm de altura) empacotada com MgO e hiflosupercel (1:2), até a altura de 15 cm. O topo da coluna (2cm) foi preenchido com sulfato de sódio anidro para reter eventual água residual do extrato. O vácuo foi ligado à coluna, onde despejou-se o extrato, resuspendido em éter de petróleo quando necessário. O beta-caroteno foi eluído utilizando-se uma mistura de 10% de éter etílico e 90% de éter de petróleo.

O espectro de absorção foi registrado na faixa de 350 a 550 nm utilizando-se um espectrofotômetro de feixe duplo com registrador acoplado. A identificação do beta-caroteno foi feita baseada nos máximos de absorção (424, 448 e 474 nm em éter de petróleo).

A quantificação foi feita a partir da absorbância máxima e do coeficiente de absorção ($A^{1\%}$) de 2592, sendo os resultados expressos em ug de beta-caroteno por 100g de amostra.

A pureza dos carotenos podem ser confirmadas em placas de sílica gel desenvolvidas com 0,5% de metanol em éter de petróleo.

O valor de vitamina A foi calculado de acordo com as normas da National Academy of Science- National Research Council (NAS-NRC, 1980) onde 1 UI. (Unidade Internacional) e 1 RE (Equivalente de Retinol) correspondem a 0,6 e 6 ug de beta-caroteno respectivamente. As fórmulas utilizadas são as seguintes:

$$[\beta] \mu\text{g/g} = \frac{10^4 \times \text{abs.} \times \text{vol. (ml)}}{A_{1\%}^{1a} \times m \text{ (g)}}$$

$$\text{RE/100g} = [\beta] \div 0,6 \times 10$$

$$\text{UI/100g} = [\beta] \div 0,6 \times 100$$

$$A_{1\%}^{1a} = 2592 \text{ (éter de petróleo)}$$

Ep

$$A_{1\%}^{1a} = 2550 \text{ (acetona)}$$

4.8. Inoculação do Fungo *Septoria lactucae*

Coletou-se as cem folhas das plantas mais atacadas por septoriose. Essas folhas foram passadas na centrífuga. Obteve-se 800ml de suco verde altamente contaminado o qual foi diluído até completar 10litros de água, sendo portanto uma solução a 8% de suco de alface doente. Regou-se 4 vezes, com essa solução, cada pé de alface dos canteiros.

4.9. Metodologia Estatística

As segregações fenotípicas foram avaliadas utilizando-se o método do qui-quadrado.

4.10. Teste de Virose

Materiais

carborundum - 600 mesh (abrasivo), monfariz a frio, gaze limpa, *Chenopodium quinoa* (10 exemplares) e solução tampão a frio:

$$0,005 \text{ M} - \text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,680\text{g}$$

$$0,03 \text{ M} - \text{Na}_2\text{SO}_4 - 0,756\text{g}$$

$$0,05 \text{ M} - \text{K}_2\text{HPO}_4 - 1,7418\text{g}$$

Dilui-se para 200ml

Procedimento:

- Foram recolhidas as folhas com “tipburn” e separadas as partes mais afetadas excluindo-se as nervuras. Lavou-se bem as mãos para evitar contaminação. Pegou-se as partes com sintomas e masserou-se com tampão no monfariz. O material que não foi inoculado a fresco, foi congelado. Colocou-se um pouquinho de carborundum. Molhou-se a gaze e passou-a levemente sobre a superfície das folhas das plantas de *Chenopodium quinoa* (estas plantas eram jovens e com 6 a 8 folhas). Lavou-se com água logo em seguida. 5 plantas foram inoculadas e cinco serviram como controle. Observou-se diariamente por 10 dias e durante trinta dias observou-se regularmente. Esperava-se lesão local clorótica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultura de Tecidos

5.1.1. Experimento 1

Foram plantados 30 cotilédones dos quais 20 formaram calos e 19 regeneraram plantas.

A primeira evidência de formação de calos foi observada após incubação por 12 dias (Figura 07A). Após 8 dias observava-se o agrupamento de células formando calos com média de 1cm. Os calos geralmente apresentavam-se compactos interiormente e friáveis exteriormente, sendo que muitos apresentavam-se somente friáveis em toda sua estrutura.

Os calos devem ser transferidos de meio aos 15 dias, sendo que eles podem ser divididos e transferidos para o meio MS modificado onde continuarão crescendo. Quando os calos não foram divididos houve necessidade de transferi-los para o meio MS completo antes que se completasse os 17 dias pois a partir daí o meio começou amarelar e os calos oxidaram. Após a divisão dos calos eles permaneceram no meio MS modificado por 13 dias quando foram novamente divididos e transferidos para o meio MS completo para regeneração.

Quando os cotilédones foram colocados em meio MS modificado para a formação de calos 5 deles formaram brotos adventícios em 5 dias sem passar pela fase de calos e com 8 dias desenvolveram pequenas plantinhas. Isto ocorreu nos sítios próximos ao nó cotiledonar.

Após transferência do calo para o meio MS completo observou-se em 5 dias pontinhos verdes e 3 dias após os pequenos brotos foram separados e colocados em meio MS completo. Em 6 dias esses brotos transplantados já mostraram plantas com folhas de alface reconhecíveis (Figura 07B-C). Em mais 6 dias as primeiras

mudas eram transferidas para o meio MS completo individualmente, as quais em 10 dias estavam prontas para serem transferidas para os vasos (Figura 07D). O tamanho da raiz quando a plântula estava pronta para passar para os vasos era o dobro do tamanho da plântula (Figura 07E). A utilização de mais de 6g de ágar por 1000ml de meio provou ser prejudicial pois as raízes da alfaca , eram muito delicadas e rompiam-se quando a planta era retirada do meio. 30 dias após serem transferidas para o MS completo sem adição de hormônios, as plântulas estavam aptas para aclimação.

Durante a transferência para os vasos observava-se que as plântulas murchavam rapidamente em contato com o ar. A transferência não era imediata porque dentro de um mesmo vidro havia o crescimento e desenvolvimento das plântulas variando de 2cm com folhas e raízes, até plântulas com menos de um mm sem raízes e folhas, inclusive calos (Figura 07B-C). Portanto, exigia-se cuidado extremo para não contaminar as plantas que voltavam para o meio novo, exigindo então que aquelas que eram passadas para o vaso ficassem em um becker com água por alguns minutos até que as outras menos desenvolvidas fossem individualizadas e transferidas para novo meio, rapidamente, antes de oxidarem.

As raízes dessas plantas foram delicadamente lavadas e completamente livres do ágar foram transplantadas para vasos com substrato e transferidos para casa de vegetação. Após 10 dias de aclimação foram transferidas para o campo.

Para TORRES & CALDAS (1990) a fase de aclimação das plântulas é uma fase muito delicada, requerendo minuciosos cuidados. Em geral as folhas de plantas crescidas *in vitro*, possuem pouca ou nenhuma cerosidade em sua superfície, com cutícula pouco desenvolvida e menor ramificação de feixes vasculares, além de uma capacidade fotossintética um pouco reduzida em relação às plantas cultivadas em condições de campo. Portanto as primeiras são altamente susceptíveis à infecção e desidratação.

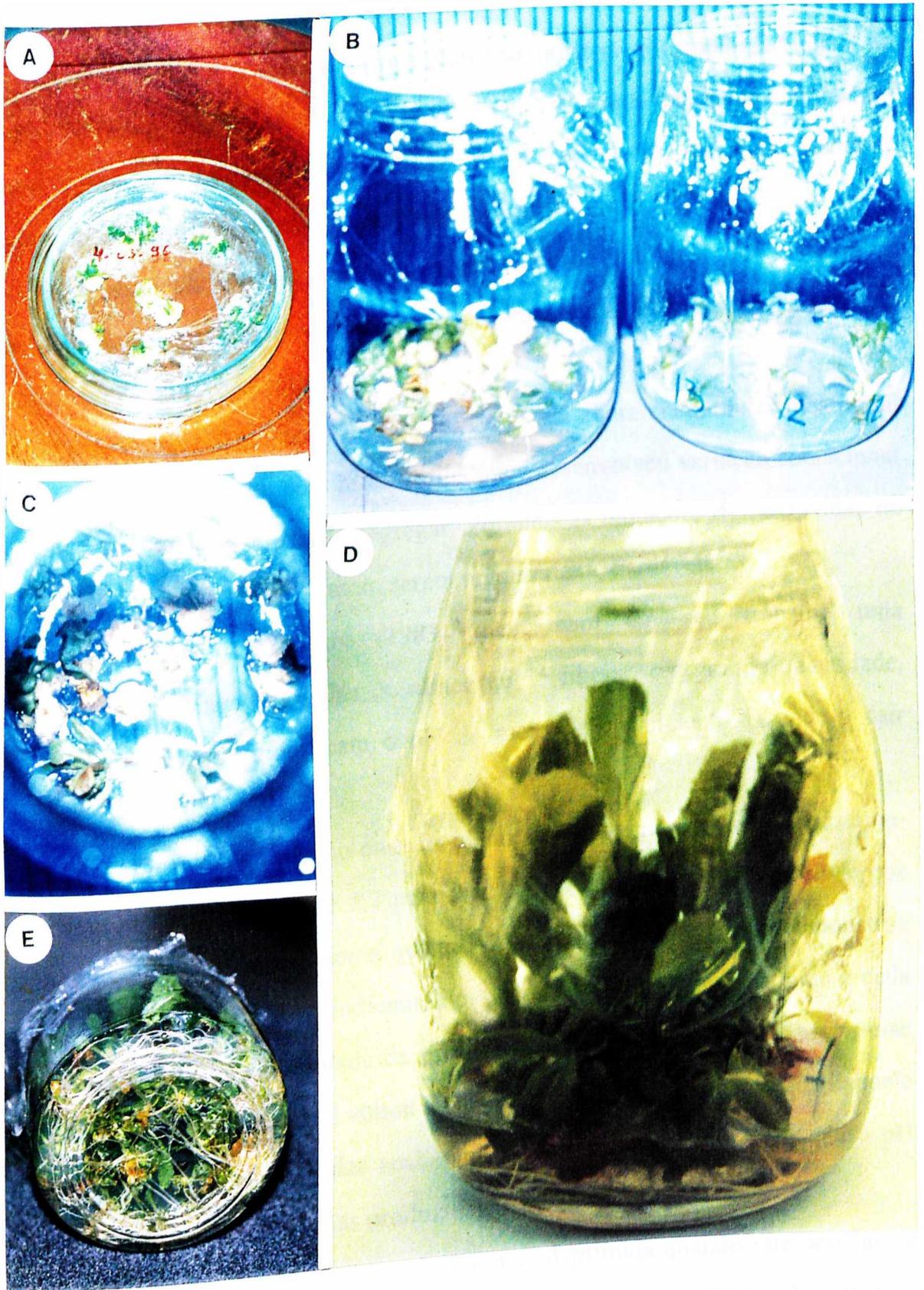


Figura 7 - Fases da cultura de cotilédones: A) Formação de calos; B) e C) Calos com formação de brotos e mudas individuais; D) Mudas prontas para aclimação; E) Formação de raízes

Para se evitar a desidratação das plântulas utilizou-se campânulas feitas de garrafas de refrigerantes que foram colocadas sobre os vasos imediatamente após o plantio. Essas campânulas falsas foram muito eficientes, pois as plântulas rapidamente recuperaram o viço e não mais se desidrataram.

A senescência foi um fator importante, tanto na qualidade dos cotilédones quando as sementes demoravam a germinar, quanto na diferenciação dos calos dando origem a mutações deletérias.

As diferenças dentre as plantas P_0 e F_1 e F_2 até agora encontradas mostraram que a alface regenerada da cultura de cotilédones desenvolveu variação somaclonal e esta, por sua vez, foi capaz de segregar. Portanto as mutações desenvolvidas na cultura de cotilédones demonstraram serem regularmente herdáveis.

ENGLER & GROGAN (1983) mencionam em seu trabalho uma característica especial das células de alface que é liberar, em grande quantidade, substâncias ácidas que modificam o pH do meio de crescimento fazendo-o cair abaixo de 5,5.

Ao verificar o pH do meio onde as plântulas estavam amarelando, constatou-se que este havia diminuído de 5,7 para o intervalo entre 4 e 5. Observou-se que quanto mais próximo de 4 maior a quantidade de tecido morto o que demonstrou que tais valores de pH são prejudiciais. Foi necessário então, mudar o meio a cada duas semanas quando a densidade de proliferação de tecido era alta. Observou-se que ao trocar o meio, o material voltou a crescer normalmente enquanto que naquele que não foi mudado, as plântulas acabaram morrendo. Isso demonstrou que o pH ácido foi causado por substâncias produzidas pelas células de alface.

A capacidade de brotação do calo torna-se deprimida quando este permanece no mesmo meio por longo período. ENGLER & GROGAN (1983) discorrem à respeito da depressão da habilidade de brotamento do calo mesmo o pH do meio

ficando acima de 5,6. Os autores explicaram tal fato pela produção de auxina pelo p-calo, o que acarretaria no aumento de auxina no meio, suprimindo a morfogênese.

A grande quantidade de calos no meio diminuiu a brotação, assim como quanto maior o calo menor era a quantidade de brotos formados. Quando o calo foi transferido para novo meio e redividido, ou seja, em tamanhos menores, diminuindo então a quantidade, a velocidade de crescimento e desenvolvimento aumentou inicialmente voltando a diminuir quando a quantidade aumentou novamente, podendo ser o aumento de auxina no meio.

O desenvolvimento de tecido fotossintetizante contribuiu para diminuir a dependência externa de O_2 , o que reduziu a oxidação. Quando começou a aparecer tecido verde a quantidade de oxidação desses tecidos, quando manipulados, caiu quase a zero.

Os clones da "geração Po" que saíram da cultura de tecidos para os vasos foram 75, dos quais 47 sobreviveram a aclimatação, ficando o índice de sobrevivência em 62,67% sendo que 30 floresceram dos quais 21 produziram sementes. Os clones sobreviventes no campo destacavam-se pelas diferenças com relação à cor e ao formato (lisa/crespa). A cor "verde-clara" pode ter ocorrido devido a uma variação no tecido anterior à fase de calo, no entanto o fenótipo "lisa" claramente indica a ocorrência de mutação (Figura 08A-D-E).

Foi feita seleção dos clones que sobreviveram à aclimatação. De 47 plantas selecionou-se:

- 5 claras
- 4 com septoriose
- 1 morreu com septoriose

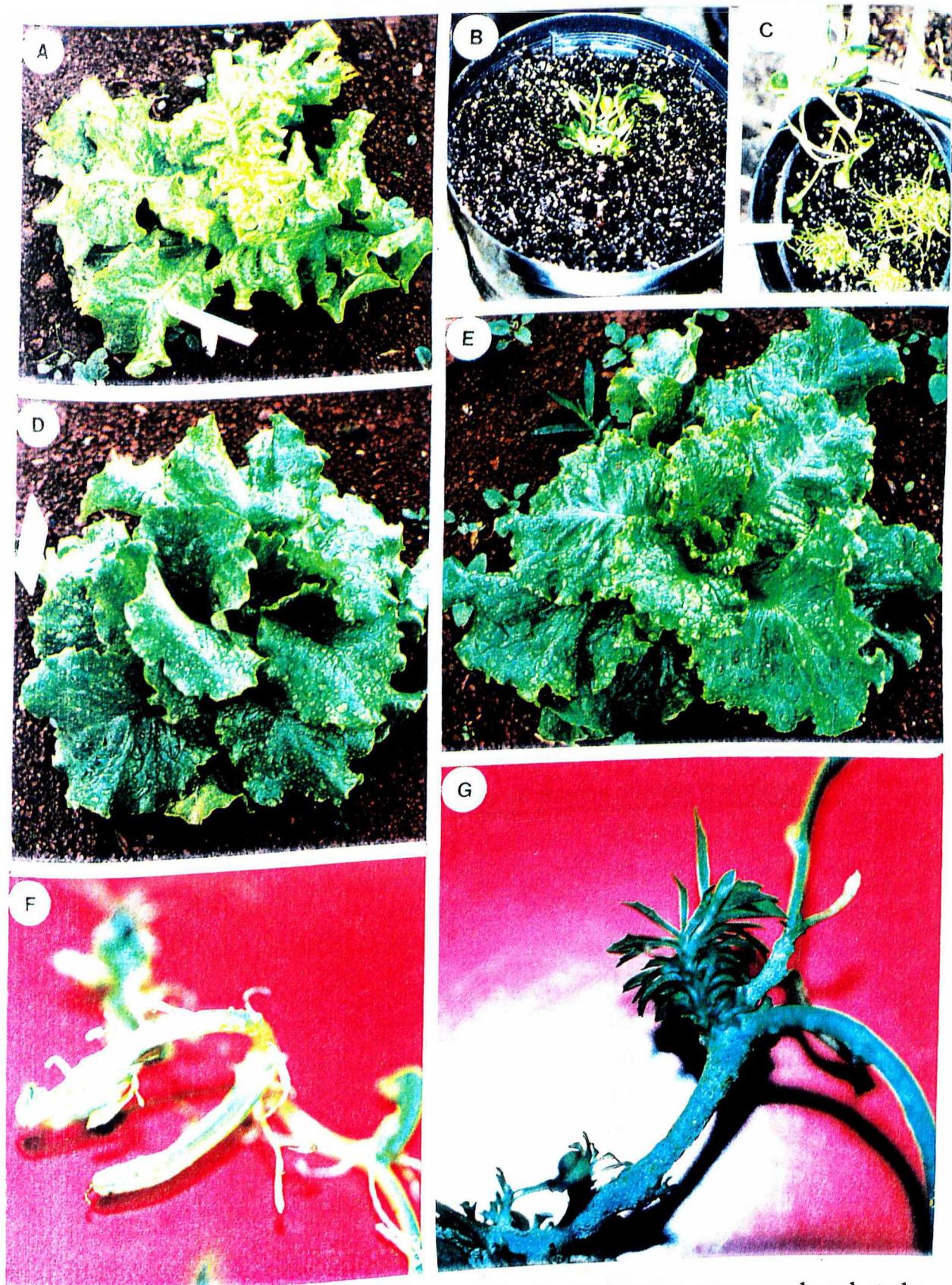


Figura 8 - Clones segregantes: A) clone "verde-claro"; B) clone com caule achatado e ramificado; C) clone ramificado, com espigamento e caule delgado; D) "verde-escura", "lisa"; E) "verde-escura", "crespa"; F) formação raízes aéreas; G) formação de broto no local de inserção da folha

Muitos clones da “geração F₁” foram indistinguíveis da planta que lhes deu origem fenotipicamente. Na “geração P₀” houve clones diferentes da planta mãe, haviam alfaces claras, raquíticas com pendoamento precoce, baixo vigor, verde escuras, com o caule achatado, estilo cipó, ramificadas e que possuíam contorções nas folhas (Figura 08). O clone C₃ produziu maior número de sementes viáveis enquanto o clone C₁₂ foi o que produziu menor número de sementes viáveis. 6 clones produziram sementes inviáveis ou seja que não germinaram foram eles C₇, C₈, C₁₁, C₁₆, C₂₂ e C₂₃.

Esses dados sugerem que os erros cometidos no genoma durante a fase de calo não foram “corrigidos” ou foram anormalmente reprogramados causando uma redução no número de flores, na fertilidade destas e na viabilidade dos embriões. Dos 21 clones que produziram sementes somente 9 clones possuíam sementes férteis (Tabela 06).

Tabela 06 - Clones que produziram sementes e número de mudas obtidas por clone sementes germinadas.

Clones que produziram sementes	Número de mudas obtidas por clone
C ₁	05
C ₃	98
C ₄	05
C ₅	37
C ₆	12
C ₇	00
C ₈	00
C ₁₀	17
C ₁₁	00
C ₁₂	02
C ₁₃	09
C ₁₆	00
C ₂₂	00
C ₂₃	00
C _{1b}	14

Quando o pendramento ocorria muito precocemente as plantas possuíam em média 8cm de altura, o pendão floral não possuía rigidez o suficiente para ficar ereto e produziam de 0 a 6 capítulos dos quais muitos nem chegavam a abrir ou a serem fecundados e conseqüentemente não produziam sementes. Alguns clones começavam a emitir o pendão floral até bem desenvolvido no entanto não chegaram a produzir flores ou quando as produziam estas não eram e fecundadas portanto não produziam sementes.

A primeira geração derivada das sementes dos clones autofecundados quase não se diferenciaram da Maioba fenotipicamente. Do clone C₃ duas mudas apresentaram folhas contorcidas desde a germinação até uma semana após serem transferidas para o campo, característica esta que desapareceu posteriormente. Em geral as plantas eram um pouco mais abertas e soltas que a Maioba.

Tabela 07 - Seleção na primeira geração dos clones provenientes da cultura de tecidos cuja as flores foram autofecundadas.

caracterís- ticas dias	ocorrência de septoriose		folhas verde-clara		planta pequena		com queima de borda		espigamento precoce	
	60	70	60	70	60	70	60	70	60	80
C ₁ (n=5)	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-
C ₃ (n=98)	4	8	6	-	39	4	-	6	-	2
C ₅ (n=37)	4	4	-	-	2	3	-	-	-	5
C ₆ (n=12)	1	-	2	-	-	-	-	2	-	3
C ₁₀ (n=17)	1	-	-	-	2	-	-	-	-	9
C ₁₂ (n=2)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C ₁₃ (n=9)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3

A geração F₁ dos clones foi selecionada, descartando as plantas atacadas por doença, as pequenas e com espigamento precoce (Tabela 07). O clone C₁₂ teve apenas duas plantas germinadas sendo que uma foi descartada aos 60 dias devido à grande susceptibilidade à septoriose. A outra não chegou a produzir sementes. O

clone C_{13} destacou-se pela sanidade, não possuindo nenhuma planta acometida por doenças ou circunferência menor que 40cm e todas as plantas eram verde-escuras.

A prole do clone C_1 foi muito pequena e apresentou 40% de ataque por septoriose (Tabela 08). Essas plantas desenvolveram-se mais vagarosamente que as demais.

Tabela 08 - Distribuição do clone C_1 em 5 indivíduos da geração F_1 .

3 sem septoriose 4 grandes	2 com septoriose 1 pequena
-------------------------------	-------------------------------

A prole do clone C_3 foi a mais numerosa, destacando-se pelo vigor e sanidade com apenas 12 plantas atacadas por doenças. Curiosamente, as plantas apresentaram fenótipo de cor verde clara indicando a ocorrência de mutações que afetaram o gene para cor modificando a segregação 3:1 (Tabela 09)

Tabela 09 - Segregação do clone C_3 (n=98) geração F_1 .

86 sem septoriose 92 verde escura 55 grandes 92 sem a "tipburn"	12 com septoriose 6 verde claras 43 pequenas 6 com a "tipburn"
--	---

O clone C_5 apresentou uma prole muito parecida fenotipicamente com a Maioba, entretanto ao contrário da Maioba apresentou 78% de plantas tolerantes à septoriose (Tabela 10).

Tabela 10 - Segregação do clone C_5 (n= 37) geração F_1 .

29 sem septoriose 32 grandes	8 com septoriose 5 pequenas
---------------------------------	--------------------------------

A geração F_1 do clone C_6 aderiu à segregação 3:1 possuindo o χ^2 calculado menor que o tabelado portanto significativo ao nível de 5% no fenótipo cor de folha. Apresentou-se mais resistente às doenças que a Maioba, tendo 83% de plantas sadias (Tabela 11).

Tabela 11 - Segregação do clone C_6 (n= 12) geração F_1 .

11 sem septoriose	1 com septoriose
10 verde escuras	2 verde claras/ $\chi^2=0,44/ 3:1$
10 sem a "tipburn"	2 com a "tipburn"

$\chi^2_{1} = 3,841$

O clone C_{10} teve apenas uma planta que apresentou septoriose, era muito semelhante à Maioba quanto ao formato no entanto possuía a cor muito opaca.

Tabela 12 - Segregação do clone C_{10} (n= 17) geração F_1 .

16 sem septoriose	1 com septoriose
15 grandes	2 pequenas

Os resultados da análise de vitamina A da geração F_1 dos clones auto fecundados mostraram que houve mutações afetando o gene do β -caroteno pois estando a Maioba com o teor de vitamina A bem estabelecido em 6500 UI/100g a geração F_1 dos clones apresentou segregação com teor mínimo de 4632 UI de vitamina A e o máximo de 8725 UI de vitamina A entre os clones analisados (Tabela 13). O clone C_3 que teve 11 plantas analisadas teve a planta com maior teor de vitamina e também de menor teor. Os clones C_{13} , C_5 , C_6 e C_{22} tiveram apenas uma planta analisada cada um porque a quantidade de amostras que podiam ser levadas eram apenas 15 e foram escolhidas as 15 melhores plantas nos canteiros em geral sem levar em consideração de que clone se originara.

As características observadas para fazer a seleção das 15 melhores foram: sem doença, bom formato, tamanho grande acima de 35cm de diâmetro, gosto doce, cor verde escura e formato largo da folha (Figura 09).

Tabela 13 - Resultado da análise de β Caroteno e Carotenóides nos clones da geração F₁*.

Amostras	Carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$)	β Caroteno ($\mu\text{g/g}$)	Vitamina A (RE/100g)	Vitamina A (UI/100g)
C ₁₃ - 01	245,5	43,8	730,2	7302
C ₅ - 02	227,6	35,1	548,8	5488
C ₃ - 03	193,7	27,8	463,2	4632
C ₃ - 04	277,2	41,2	687,0	6870
C ₃ - 05	219,6	36,6	609,2	6092
C ₃ - 06	164,2	29,2	486,0	4860
C ₃ - 07	195,9	30,1	515,8	5158
C ₃ - 08	196,6	31,2	520,0	5200
C ₃ - 09	203,9	37,5	624,5	6245
C ₃ - 10	252,0	51,1	852,3	8523
C ₃ - 11	285,7	44,0	734,0	7340
C ₃ - 12	238,0	39,5	658,4	6584
C ₆ - 13	290,9	50,3	838,6	8386
C ₂₂ 14	251,4	46,4	773,8	7738
C ₃ - 15*	302,4	52,4	872,5	8725
\bar{X}	236,3	39,7	661,0	6609,5

*Não completou o ciclo ataque drástico por septoriose.

As plantas com maior teor de vitamina A tiveram suas sementes colhidas e semeadas. Germinaram com três dias de sementeira e transplantadas aos 25 dias de sementeira. Após o transplante no campo, devido a seca houve problemas de falta de água, o que ocasionou a morte de algumas plantas. Foi utilizado casca de arroz para manter a umidade por maior período de tempo, esta pode ter atraído pássaros que comeram muitas mudas (Tabela 14). As mudas do clone C₃ foram mais comidas pelos pássaros. Pode ter sido mais atrativa pela palatabilidade ou por estar coberta com uma grade de ferro que servira de suporte para a cobertura plástica que protegia as inflorescências das chuvas na geração anterior.

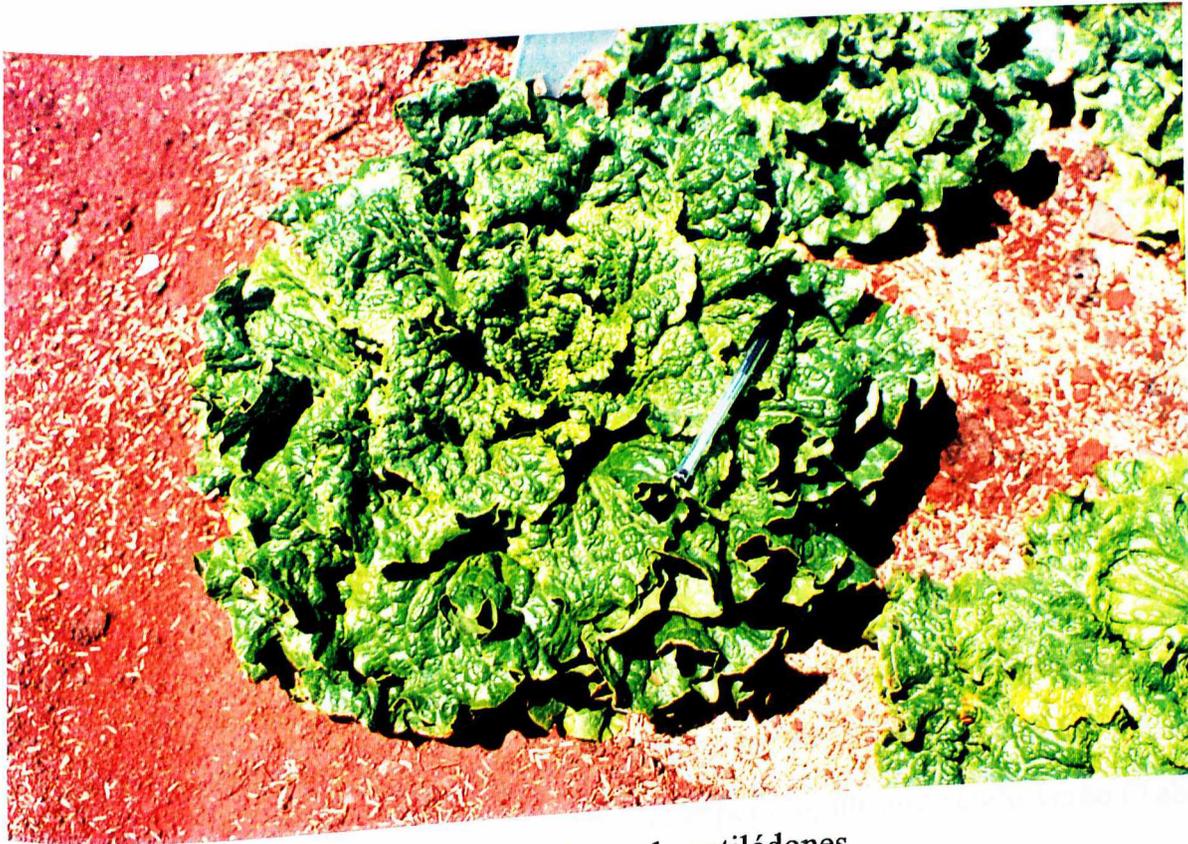


Figura 09 - Planta da geração F₁ da cultura de cotilédones



Figura 10 - Almeirão roxo *Lactuca indica*.

Tabela 14 - Plantas que sobreviveram ao transplante e que foram predadas por pássaros na geração F₂ dos clones.

Plantas	Plantadas	Comidas p/ pássaros	Morreram
C13-1	66	1	1
C3-10	50	10	6
C3-11	95	30	10
C6-13	87	3	2
C22-14	4	1	0

Na geração F₂ dos clones o número de plantas produzidas foi bem maior. Aos 62 dias os clones C₁₃ e C₆ tiveram 18,8% e 15,8% de plantas pendoadas respectivamente. Uma porcentagem acima do esperado, mesmo sendo verão (Tabela 15). Os descendentes do clone C₃ apresentaram um maior número de plantas pequenas. Em relação ao fenótipo cor de folha todos os clones deram diferentes da segregação esperada de 3:1 inclusive o C₆ que na geração F₁ aderiu ao esperado 3:1. Esses dados confirmam a hipótese de que as mutações ocorreram durante ou após o período de formação de calos e não anterior à formação de calos. Essas mutações modificaram o genótipo para cor nos clones, modificando completamente a segregação 3:1 normalmente encontrada na Maioba. Esse fenótipo modificado foi encontrado também nas gerações F₁ e F₂.

Tabela 15 - Seleção aos 62 dias da geração F₂ dos clones.

C13-1 (n=64)		C6-13 (n=82)		C3-11 (n=55)		C3-10 (n=34)	
52 pt	12 pp	69 pt	13 pp	53 pt	2 pp	34 pt	0 pp
52 gr	12 pq	72 gr	10 pq	44 gr	11 pq	20 gr	14 pq
54 ve	10 vc	75 ve	7 vc	45 ve	10 vc	33 ve	1 vc

pq=pequeno
 pt=pendoamento tardio
 gr=grande
 pp=pendoamento precoce
 ve=verde-escura
 vc=verde-clara

Os resultados da análise de vitamina A da geração F₂ dos clones continuaram segregando no entanto num intervalo menor, já que o maior valor encontrado foi de 7894,66 e o menor foi de 4596,34 entre os clones (Tabela 16). O clone 22 foi o que teve menor número de plantas mas foi no entanto o que ficou com menor variação e com os maiores índices. O fato dos clones 6 e 3 não terem apresentado plantas com teores acima de 8000 UI/100g de vitamina A o que era esperado pode ser explicada com três hipóteses: A primeira foi devido a amostragem pequena, pode ter tido plantas com teores maiores que não foram analisadas. A segunda pode ser devido à posição da folha na planta. A última pode ter sido por erro sistemático do método.

Tabela 16 - Análise de vitamina A da geração F₂ dos clones.

Amostras	Carotenos totais	β -caroteno	Vit. A (RE/100g)	Vit. A (UI/100g)
C6-13-1	280,12	29,01	483,54	4835,39
C6-13-2	332,65	44,97	749,42	7494,21
C3-11-3	279,96	27,59	459,63	4596,34
C3-11-4	277,48	30,04	500,68	5006,81
C6-13-5	229,94	36,40	606,77	6067,66
C13-1-6	246,40	30,20	503,29	5032,89
C3-11-7	303,71	34,04	567,31	5673,14
C13-1-8	296,06	31,99	533,16	5331,63
C3-10-9	359,54	37,41	623,54	6235,43
C3-10-10	285,60	43,24	720,63	7206,29
C13-1-11	398,10	43,83	730,45	7304,53
C13-1-12	316,46	34,98	582,99	5829,90
C3-10-13	328,40	40,49	674,89	6748,87
C22-14-14	348,65	40,19	669,85	6698,49
C22-14-15	321,13	47,37	789,47	7894,66
\bar{X}	306,95	36,78	613,04	6130,42

5.1.2. Experimento 2

Foram plantados 17 cotilédones, sendo que todos formaram calos, portanto com índice de regeneração de 100%. Aos 13 dias evidenciou-se o início de formação de calos, sendo que 10 dias depois os calos já haviam atingido 1cm. Foram necessários no máximo 15 dias a contar a partir do plantio para se fazer a divisão de calos e transferi-los de meio. Após 10 dias dividiu-se o calos novamente e transferiu-os para o meio MS completo. Cinco dias após o transplante podia -se visualizar os pequenos pontinhos verdes. Quando visualizados na lupa via-se tecido diferenciado (Figura 11A-B). Os primeiros tecidos resultante da diferenciação celular formaram folhas que aos poucos foram adquirindo clorofila. As raízes só foram formadas após as folhas de alface serem reconhecíveis a olho nú. Após 3 dias podia-se individualizar os brotinhos, que em mais 6 dias já se observavam plantas reconhecíveis (Figura 11C). Em 5 dias as primeiras mudas eram individualizadas e transferidas para o meio MS completo, que em 10 dias já podiam ser transferidas para os vasos. Teve-se 100% de regeneração ou seja todos os calos regeneraram pelo menos uma planta. Os vasos contendo substrato próprio para alface foram protegidos com campânula, transferidas para casa de vegetação por 12 dias. Saíram 234 mudas da cultura de tecidos das quais 180 resistiram à aclimatação, ficando então o índice de sobrevivência em 73,01%. Obteve-se 15 plantas por embriogênese ou seja formaram mudas sem passar pelo estágio de calo.

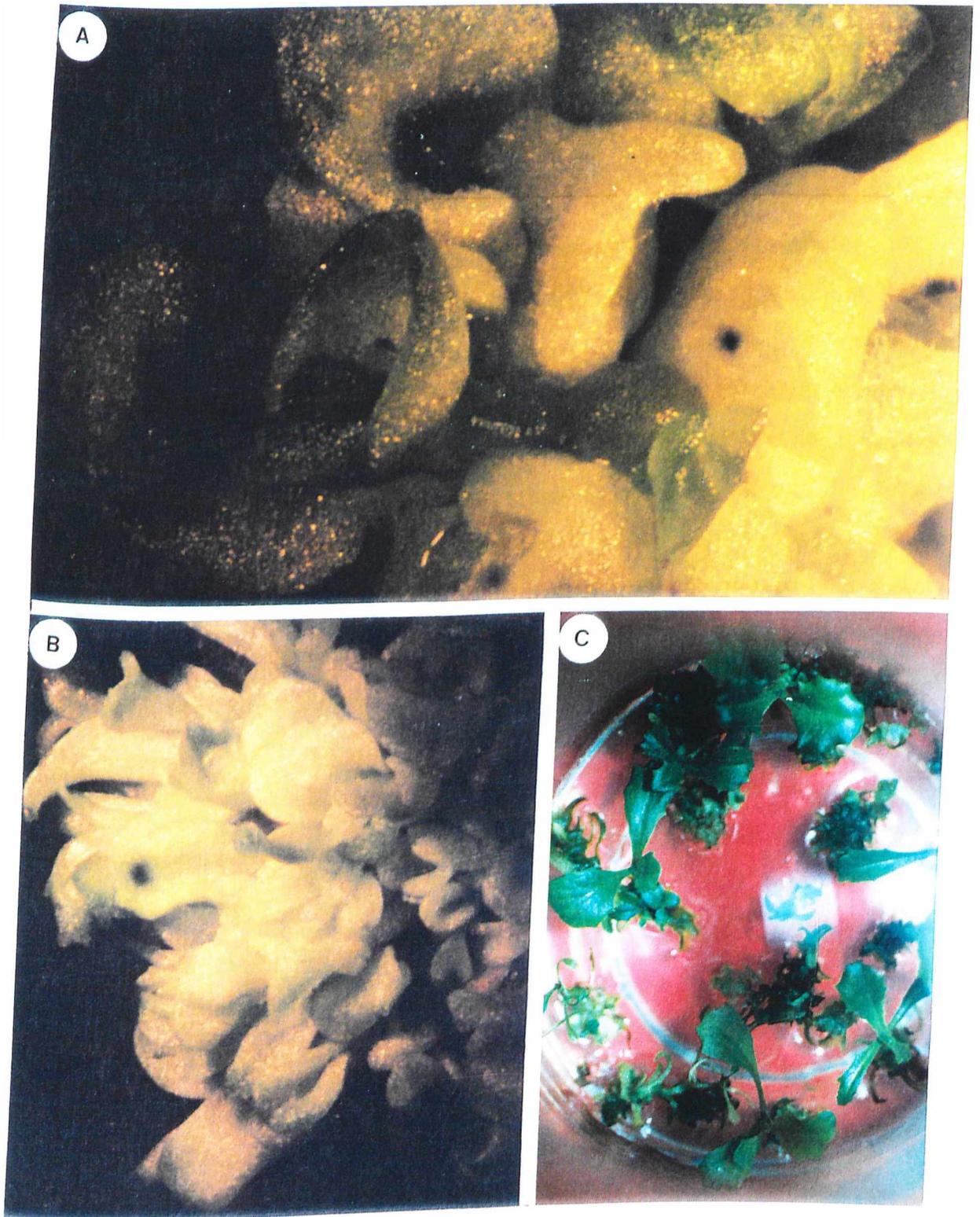


Figura 11 - Fases da cultura de cotilédones: A) e B) células se diferenciando em tecido; iniciando tecido clorofilado; C) formação de brotos e plântulas.

A variabilidade genética obtida por meio da cultura de cotilédones mostrou-se acima do esperado (Tabela 17). O caráter espigamento precoce pode ter sido influenciado pelo aumento da temperatura acima de 38°C devido à falta de ar condicionado no laboratório de cultura de tecidos. O clone que mais produziu alfaces normais foi C_k enquanto os clones C_d , C_g , e C_l não tiveram nenhuma alface considerada normal. Os clones que mais produziram plantas sem raízes foram C_d e C_k . A mutação para raízes curtas ou seja atrofiadas apareceu no clone C_a . A mutação mais rara, ou conjunto de mutações, ocorreu no clone C_m onde uma das plantas regeneradas possuía raízes aéreas. O clone que regenerou maior número de plantas foi o C_k , no entanto, devido à maior quantidade de fenótipos deletérios não foi o que teve maior número de plantas em condições de serem aclimatadas, o que ocorreu com o clone C_c . Este último também teve maior número de plantas que sobreviveram à aclimação (Tabela 18). Muitas plantas que tiveram suas raízes danificadas durante o processo de retirada do meio sólido devido à baixa qualidade do ágar que foi utilizado para preparação de alguns meios. Quando era colocado até 6g/l no meio ele não solidificava e quando essa quantidade era ultrapassada até que solidificasse (com 9g/l) o meio ficava com consistência tão compacta que se adería com tal força às raízes delicadas das alfaces, que ao serem lavadas o meio não se soltava ou então levava consigo as raízes.

O clone que produziu menor número de mudas foi o C_p : todas foram transplantadas e todas sobreviveram a aclimação (Tabela 18). O caráter cabeça dupla apareceu somente em dois clones o C_l e o C_m sendo uma planta para cada um. Observa-se que o caráter ramificado não se trata de uma ramificação dicotômica mas sim um broto para cada local onde deveria ser inserida uma folha. A partir desses brotos se desenvolvia uma pequena planta a qual espigava e florescia enquanto que o ramo principal ficava como um cipó sem folhas. O fato de algumas plantas regeneradas não terem raízes foi interpretada como sendo uma mutação envolvendo o complexo gênico do sistema radicular, outra hipótese é que uma grande quantidade de células no local de formação das raízes pode ter ocasionado

uma inibição de sua formação. Percebeu-se claramente que não foi falta de hormônio já que todas as outras plantas tinham raízes bem desenvolvidas. Uma terceira hipótese pode ser a produção de uma substância que quando em alta concentração no meio inibe a formação de raízes; isso ocorreu quando a densidade de calos no meio foi muito alta.

Tabela 17 - Variabilidade genética da cultivar Maioba induzida pela cultura de cotilédones.

CARACTE- RÍSTICAS	CLONES																
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
Normal	15	01	13	00	04	03	00	04	04	02	26	00	01	08	03	01	01
Espigamento precoce	09	02	19	02	02	03	00	02	01	00	10	01	02	02	02	02	03
Sem raízes	05	00	03	06	01	01	03	00	00	00	07	01	00	00	00	00	00
Raízes curtas	06	00	01	00	00	01	00	00	00	00	00	00	01	00	00	00	00
Folha clara/ espigamento precoce	01	00	00	00	00	00	00	00	00	00	02	00	01	00	00	00	00
Planta achatada	01	00	05	00	00	00	00	00	00	00	02	00	01	00	00	00	00
Espigamento precoce/ raiz curta	00	02	00	00	03	04	00	00	00	00	00	01	00	00	00	00	02
Troncuda(1)/ raiz curta	00	01	00	00	01	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
Quebrou raiz	00	00	00	12	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
Folha clara	00	02	04	01	00	00	00	02	00	00	01	00	00	00	00	00	00
Troncuda (1)	00	00	00	01	00	00	00	00	00	00	00	01	00	00	00	00	00
Ramificada	00	00	00	00	00	01	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
Ramificada /folha clara	00	00	00	00	00	00	02	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
Folhas necrosadas	00	00	00	00	00	00	05	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00

Continua...

Continuação da Tabela 17

CARACTE- RÍSTICAS	CLONES																
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
Aclorofilada / sem raiz	00	00	00	00	00	00	09	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
Cipó	00	00	00	00	00	00	00	00	00	01	02	00	00	00	00	00	00
Espigamento precoce/ quebrou raiz	00	00	03	00	00	00	00	00	00	00	02	00	00	00	00	00	00
Ramificada /sem raiz	00	00	01	00	00	00	00	00	00	03	00	00	00	00	00	00	02
Espigamento precoce/ sem raiz	00	00	01	00	00	00	00	00	00	00	05	00	00	00	00	00	01
Cogumelo (2)	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	02	00	02	00	00	00	01
Cipó/cabeça dupla	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	01	01	00	00	00	00
Com raiz aérea	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	01	00	00	00	00
Folha clara/ quebrou raiz	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	02	00	00	00	00
Folha clara/sem raiz	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	03	00	00	00	00

(1) = possuía tronco grosso como plantas arbóreas

(2) = Possuía formato de cogumelos

Os clones C_c e C_k foram os que tiveram maior número de plantas transplantadas e também o maior número de sobreviventes a aclimação. P e J foram os calos que regeneraram menor número de plantas (Tabela 18). A quantidade de plantas regeneradas dos calos foi bem maior que o esperado indicando que a cultivar Maioba teve excelente desempenho com a metodologia utilizada.

Tabela 18 - Plantas que sobreviveram à aclimação.

Clones	Transplantados	Sobreviventes
A	34	27
B	07	05
C	45	33
D	19	11
E	06	06
F	13	10
G	04	02
H	08	06
I	05	04
J	03	03
K	43	29
L	04	04
M	06	06
N	10	08
O	05	05
P	03	03
Q	04	03

5.2. Cruzamentos

As sementes de todos os cruzamentos foram plantadas e a seleção dos F₁ foram feitas retirando apenas as plantas doentes, pequenas e claras. Dos 61 cruzamentos feitos com *Lactuca indica* nenhum teve sucesso pois, as poucas sementes que germinaram evidenciaram que não eram híbridos. Houve incompatibilidade entre a *Lactuca indica* (Figura 10) e a *Lactuca sativa*. Os outros cruzamentos estão descritos abaixo.

5.2.1. Moreninha X Maioba

Deste cruzamento foi feita seleção na geração F₂ escolhendo para produção de sementes as plantas que possuíam cor verde escura, formato tipo alface, diâmetro

maior que 35 cm, sabor doce e sem ataque de doenças durante o verão. Na geração F₃ foram escolhidas duas plantas para fazer análise do teor de vitamina A (Tabela 19). Os resultados da análise de vitamina A da geração F₃ foram bem menores que os pais, o que pode ser devido ao tamanho da amostra, a idade das plantas ou a posição de onde se retira as folhas (amostras) na planta. Pesquisas específicas serão feitas para esclarecer este ponto. Aos 60 dias foi feita a inoculação do fungo *Septoria lactucae* e 15 dias depois foi feita avaliação dos canteiros atribuindo notas de 0 a 10 à cada planta (Tabela 20). As plantas com nota abaixo de 6 foram descartadas a fim de eliminar os segregantes mais susceptíveis. Nenhuma planta deste cruzamento apresentou destaque especial quanto às outras características consideradas importantes para este trabalho.

Tabela 19 - Teor de β -caroteno, Retinol e Vitamina A de Moreninha X Maioba geração F₃.

Amostra	β -caroteno ($\mu\text{g/g}$)	RE/100g	UI/100g
01	35.71	595	5952
02	26.77	446	4462
\bar{X}	31.24	520.5	5207

Tabela 20 - Nota atribuída às plantas 15 dias após inoculação com *Septoria lactucae*.

Número de plantas	Nota de 0-10
01	04
01	05
02	06
03	07
05	08

Legenda: Nota 0 (zero)= muito atacada; 10= não atacada

5.2.2. Planta 01: Moreninha x Vitória

Aos 60 dias foi feita inoculação do fungo *Septoria lactucae* e avaliação foi feita 15 dias depois, atribuindo-se nota de 0-10 às plantas individualmente (Tabela 21). Do cruzamento Moreninha X Vitória, na geração F₃, foi feita a análise do conteúdo de vitamina A e uma das plantas continha 8472 UI/100g (Tabela 22). Foi feita avaliação entre 15 plantas, sendo que 13 delas eram verde escuras e 2 verde claras. Todas as plantas avaliadas tiveram nota abaixo de 6 portanto só aquela com alto teor de vitamina permaneceu no campo até a produção de sementes. Quanto ao espigamento, 10 apresentavam-se com espigamento tardio e 5 com espigamento precoce. A planta com maior teor de vitamina A produziu poucas sementes; estas foram colhidas individualmente, semeadas germinaram aos 4 dias de sementeira. As mudas estavam prontas para o transplante aos 30 dias de sementeira.

Tabela 21 - Avaliação das plantas 15 dias após a inoculação com *Septoria lactucae*.

Número de plantas	Nota
01	03
07	04
04	05
03	06

Tabela 22 - Teor de Vitamina A e Carotenos Totais de (Moreninha X Vitória) geração F₃.

Amostra	β -caroteno ($\mu\text{g/g}$)	RE/100g	UI/100g
01	50.83	847	8472
02	27.29	455	4548
03	23.50	392	3917
\bar{X}	33.87	564,67	5645,67

O número de mudas transplantadas foi de $n=160$ plantas. o índice de perda foi de 8,75%, devido à falta de irrigação na fazenda do Glória. Aos 70 dias após sementeiras foi feita seleção em 146 plantas (Tabela 23). No caráter "tipburn" os dados sugerem dois genes principais sujeitos a modificadores. Já quanto a susceptibilidade a septoriose os dados sugerem um gene principal e modificadores. Ao analisar o caráter cabeça simples/ cabeça bifurcada a segregação conforma-se com três genes recessivos (63:1) sendo o χ^2 significativo ao nível de 5%, enquanto o caráter espigamento tardio/precoce a segregação adere a um esperado de 15:1 sendo o χ^2 calculado menor que o tabelado, ou seja dois genes recessivos. A genética de folha verde escura já foi bem estabelecida, como devida a um gene dominante. O aparecimento de uma alface verde clara pode ser explicada por contaminação ou por segregação de três genes recessivos. O formato tipo alface/almeirão explica-se como segregação de 63:1 ou seja presença de três genes recessivos, sendo o χ^2 significativo ao nível de 5%.

Tabela 23 - Seleção da geração F_4 do cruzamento de MoreninhaXVitória $n=146$ aos 70 dias.

131 resistente à "tipburn" 89,7%	15 susceptível - 10,3%	
98 grandes/ pouco ataque de septoriose - 67,1%	48 pequenas/muita atacada de septoriose - 32,9%	
144 cabeça simples - 98,6%	2 cabeça bifurcada - 1,4%	$\chi^2 = 0,0346/ 63:1^*$
137 com espigamento tardio	9 com espigamento precoce 6,2%	$\chi^2 = 0,002/ 15:1^*$
145 verde escura - 99,3%	1 verde clara - 0,7%	
145 com formato de alface - 99,3%	1 com formato de almeirão - 0,7%	$\chi^2 = 0,73/ 63:1^*$

Comprimento do dia/ abril = 11,7 horas
 $\chi^2_{1} = 3,841$ - valor tabelado ao nível de 5%

O ataque de doenças no mês de abril foi considerado alto, principalmente pela septoriose. Essa susceptibilidade se deu devido a alta precipitação no mês

anterior que chegou a 340,6 mm (Figura 03), juntamente com as altas temperaturas, acima de 31°C facilitando a disseminação e desenvolvimento da doença (Figura 04).

Aos 70 dias com 9 plantas pendoando, foi considerado bom desempenho entre 146 plantas sem iniciar a fase reprodutiva, no período em que a temperatura máxima estava acima de 31°C e a média das mínimas acima de 15°C.

Quatro plantas foram selecionadas, por apresentarem melhor tamanho e formato e mais sadias, para análise de vitamina A na UNICAMP (Tabela 24). Tendo os resultados apresentado menor teor de vitamina A supõe-se quatro hipóteses para explicar tal fato. A primeira seria a posição da folha na planta, isto é, mais próxima ou mais distante do centro; a segunda a idade da planta, a terceira seria a segregação da amostra e a quarta um erro sistemático na metodologia realizada.

Tabela 24 - Teor de vitamina A e carotenóides totais de Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão geração F₄.

Amostra	Carotenóides totais µg/g	RE/100g	Vitamina A UI/100g
1	185.69	593	5931
2*	199.66	655	6551
3*	143.36	619	6187
4*	166.24	588	5883
\bar{X}	173.74	613	6138

* - Não completaram o ciclo devido a ataque fulminante por septoríose.

A análise de floração aos 125 dias, supondo ser o aumento da não floração neste período devido à presença de um par de genes recessivo que inibe o heterozigoto que passa a florir tardiamente, ficando então o número de não floração com 26 plantas (Tabela 25). Nesse período do mês de junho a temperatura chegou a 1,2°C (Figura 04), com a ocorrência de geadas, sem prejudicar a floração que ocorreu abundantemente mesmo sendo o comprimento do dia o mais curto do ano com 11,1 horas.

Tabela 25 - Análise de floração aos 125 dias de Moreninha X Vitória geração F₄ n=58.

Característica	Porcentagem
14 com inflorescência/com flor	24,14%
04 com inflorescência/sem botão	6,9%
14 com inflorescência/com botão	24,13%
26 sem inflorescência	44,83%

- Todas as plantas apresentaram 50% de ataque por septoriose
Comprimento do dia/junho = 11,1 horas

As sementes da planta 1(5931 UI/100g) foram colhidas e semeadas. Germinaram em 4 dias de sementeira, foram transplantadas aos 30 dias n= 77 plantas. O índice de perda foi 16%, devido às fortes chuvas de granizo. Foi feita a seleção aos 60, 70 e 80 dias (Tabela 26) após semeadas. No caráter cabeça simples/bifurcada a segregação caiu para 15:1 o que é explicado pelo fato de que um dos três pares de genes se apresentar em homozigose. No caráter presença de septoriose os dados continuam a sugerir um par de genes (segregação 3:1). Todos os quiquadrados calculados foram menores que o tabelado sendo significativos ao nível de 5%. Com relação a espigamento tardio/precoce os dados mostram que um dos pares de genes atingiu a homozigose. Ao se tratar de tamanho de plantas ainda não se pode definir pelos dados apresentados pois o diâmetro varia muito. Para o caráter verde escuro pode ter ocorrido contaminação.

Tabela 26 - Seleção aos 60, 70 e 80 dias na geração F₅ Moreninha X Vitória.

60 dias (n=65) c/dia = 13,2h/dez.		70 dias (n=45) c/dia= 13,2h/dez.		80 dias (n=28) c/dia = 13,1h/jan		total		x ² segregação
61 cs (93,8%)	4 cd (6,2%)	45 cs (100%)	0 cd	26 cs (92,9%)	2 cd (7,1%)	59 cs (90,8)	6 cd (9,2%)	x ² =0,94 * 15:1
53 sse (81,5%)	12 cse (18,5%)	41 sse (91,1%)	4 cse (8,9%)	25 sse (89,3%)	3 cse (10,7%)	46 sse (70,8%)	19 cse (29,2%)	x ² = 0,62* 3:1
61 et (93,8%)	4 ep (6,2%)	35 et (77,8%)	10 ep (22,2%)	28 et (100%)	0 ep	51 et (78,5%)	14 ep (21,5%)	x ² = 0,42* 3:1
65 gr (100%)	0 pq	42 gr (93,3%)	3 pq (6,7%)	26 gr (92,9%)	2 pq (7,1%)	60 gr (92,3%)	5 pq (7,7%)	quantitativa 3genes
65 ve (100%)	0 vc	45 ve (100%)	0 ve	26 ve (92,9%)	2 vc (7,1%)	63 ve (96,9%)	2 vc (3,1%)	contaminação

cs= cabeça simples

gr= grande

cse=com septoriose

ep= espigamento precoce

n ⇒ número total de plantas antes da seleção

pq= pequena

sse= sem septoriose

vc= verde clara

c/dia= comprimento do dia

cd= cabeça dupla

ve= verde escura

et= espigamento tardio

x²_t = 3,841

O alto índice pluviométrico que ocorreu nos meses de dezembro/94 e janeiro/95 (Figuras 03 e 05) e as altas temperaturas (Figuras 04 e 06), com a temperatura máxima absoluta próxima de 35°C e a média mínima ao redor de 20°C proporcionou um ambiente propício para o desenvolvimento da septoriose. Entre 65 plantas 19 estavam atacadas pela doença um número considerado pequeno ao levar em consideração que nesses dois meses choveram 35 dias. Nesse período onde os dias são os mais longos e quentes do ano em 65 plantas apenas 14 estavam espigando.

Uma planta foi escolhida para fazer análise de vitamina A e o resultado foi de 3793 UI/100g. As hipóteses são as mesmas discutidas na análise anterior.

As sementes da planta acima foram semeadas, germinaram aos 4 dias de sementeira, foram transplantadas aos 30 dias $n= 210$ plantas. O índice de perda foi 10%, devido à falta de água na área experimental. Foi feita seleção aos 60, 70 e 80 dias os resultados estão apresentados na Tabela 27. No caráter cabeça simples/dupla os dados voltam a apresentar segregação 15:1 ou seja permanece um dos três pares de genes em homozigose. Para espigamento tardio/ precoce manteve a sugestão que um dos dois pares de gene está em homozigose. Houve o aparecimento de uma planta cujo fenótipo sugere ser elemento de transposição. No formato tipo alface/almeirão os dados sugerem que um dos três pares de genes está em homozigose. Para "tipburn" são necessários mais estudos pois pode ser falta de cálcio no solo que se apresenta muito desuniforme para esse macronutriente que a alface necessita. Todos os quiquadrados calculados apresentaram menores que o tabelado, sendo significativos ao nível de 5%.

Nos meses de abril, maio e junho o índice pluviométrico foi baixo e as temperaturas máximas ficaram acima de 30°C , o que determinou a necessidade de aumentar a irrigação. A temperatura mínima absoluta do mês de junho ficou próxima a 10°C e a média das mínimas perto de 15°C .

Tabela 27 - Seleção aos 60, 70 e 80 dias na geração F₆ de Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão.

60 dias (n=189) c/dia =11,3/mai.		70 dias (n=108) c/dia =11,3/mai.		80 dias (n=42) c/dia =11,1/jun		Total		x ² Segregação
183 cs (97%)	6 cd (3%)	108 cs (100%)	0 cd	40 cs (95,2%)	2 cd (4,8%)	179 cs (98,7%)	10 cd (5,3%)	x ² = 0,29* 15:1
187 sse (99%)	2 cse (1%)	101 sse (93,5%)	7 cse (6,5%)	25 sse (59,5%)	17 cse (40,5%)	163 sse (86,2%)	26 cse (13,8%)	
172 et (91%)	17 ep (9%)	72 et (66,7%)	36 ep (33,3%)	42 et (100%)	0 ep	136 et (72%)	53 ep (28%)	x ² = 0,93* 3:1
140 gr (74%)	49 pq (26%)	93 gr (86,1%)	15 pq (13,9%)	19 gr (45,2%)	23 pq (54,8%)	102 gr (54%)	87 pq (46%)	
188 set (99,5%)	1 cet (0,5%)	108 set (100%)	0 cet	42 set (100%)	0 cet	188 set (99,5%)	1 cet (0,5%)	
189 ve (100%)	0 vc	104 ve (96,3%)	4 vc (3,7%)	42 ve (100%)	0 vc	185 ve (97,9%)	4 vc (2,1%)	
189 tal (100%)	0 ta	104 tal (93,6%)	4 ta (3,7%)	40 tal (95,2%)	2 ta (4,8%)	183 tal (96,8%)	6 ta (3,2%)	x ² = 3,05* 15:1
189 sr (100%)	0 cr	108 sr (100%)	0 cr	21 sr (50%)	21 cr (50%)	168 sr (88,9%)	21 cr (11,1%)	

cs= cabeça simples

sse= sem septoriose

et= espigamento tardio

set= sem elemento de transposição

ve= verde escura

tal= tipo alface

sr= sem "tipburn"

cd= cabeça dupla

cse= com septoriose

ep= espigamento precoce

cet= com elemento de transposição

vc= verde clara

ta= tipo almeirão

cr= com "tipburn"

gr= grande

pq= pequena

c/dia = comprimento do dia

x_t² = 3,05

5%

5.2.3. Planta 02: Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão

Na geração F₃ foi feita inoculação do fungo *Septoria lactucae*, as plantas foram avaliadas individualmente 15 dias depois (Tabela 28). As plantas com nota inferior a 8 foram descartadas. Uma planta foi escolhida nessa geração que possuía bom desempenho teve suas sementes colhidas e semeadas. Germinou com 3-4 dias de sementeira, foi transplantada com 20-25 dias de sementeira n= 200 plantas. O índice de perda foi 32%, devido a uma forte chuva de granizo que caiu um dia após o transplante desfolhando completamente as alfaces. Em uma semana 68% se haviam recuperado. Aos 70 dias foi feita seleção (Tabela 29). No caráter "presença de septoriose" os dados sugerem presença de dois genes, sendo o x² calculado

menor que o tabelado, significativo ao nível de 5%; mas são necessários estudos mais cuidadosos para determinar quantos genes estão envolvidos. Neste caso para espigamento tardio/precoce os dados sugerem a presença de três genes recessivos com o χ^2 significativo a 5%. Para o caráter formato alface/almeirão os dados sugerem que um dos três pares de genes recessivos já se apresenta em homozigose.

Os sintomas causados pela septoriose são: manchas amarelas (escurecidas no centro), principalmente nas folhas inferiores mais próximas ao solo, que vão aos poucos tomando toda a folha até que ficam completamente secas. Muitas vezes quando a planta iniciava o pendoamento o ataque de septoriose aumentava tão rapidamente que em dois dias a planta murchava e morria. Observou-se que a contaminação do fungo vinha de dentro da semente ou seja o fungo usava a semente como meio de disseminação dos seus esporos assim como o solo também era usado.

Ao regar os canteiros com suco contaminado o solo também foi contaminado. Prova disso foi que um ano depois quando se tornou a plantar no mesmo local, e antes de fazer nova inoculação todos os canteiros possuíam plantas contaminadas com o fungo.

Tabela 28 - Avaliação feita 15 dias após inoculação com *Septoria lactucae*.

Número de plantas	Nota
02	05
02	06
02	07
03	08
04	09
02	10

Tabela 29 - Seleção de 136 plantas aos 70 dias de Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão geração F₄ comprimento do dia 13,0 hs/nov.

130 sem septoriose (95,6%)	6 com ataque de septoriose 4,4%	$x^2 = 0,78^* / 15:1$
107 de tamanho grande (78,7%)	29 de tamanho pequeno (21,4%)	
134 com espigamento tardio (98,5%)	2 com espigamento precoce (1,5%)	$x^2 = 0,008^* / 63:1$
127 verde escura (93,4%)	9 verde clara (6,6%)	
126 com formato de alface (92,6%)	10 com formato de almeirão (7,4%)	$x^2 = 0,283^* / 15:1$

$$x^2_t = 3,841$$

30 plantas foram selecionadas e analisadas quanto ao tamanho (Tabela 30), o diâmetro médio das trinta plantas foi $\bar{X} = 42,7$ cm, $s=7,2$ cm quanto o caráter lisa/crespa os dados sugerem a presença de dois genes recessivos tendo o x^2 significativo a nível de 5%. Quanto à cor verde escura/clara os dados aderem com a segregação 3:1. Para o caráter palatabilidade os dados sugerem a presença de dois pares de genes. A segregação 13:3 trata-se de um caso de epistasia dominante e recessiva. Quanto a presença de antocianina os dados sugerem a presença de um gene simples (3:1). Ao se analisar os dados para formato da folha larga/estreita sugere a presença de um gene simples segregação 3:1. Todos x^2 calculados foram menores que os tabelados sendo significativos a nível de 5%.

Foi feita a análise de vitamina A e carotenos totais de oito plantas (Tabela 31). Apesar dos teores de vitamina A terem sido abaixo do esperado estão acima da cultivar Vitória que possui de 3000 a 3500 UI/100g e é a maior das encontradas no mercado.

Aos 88 dias haviam morrido as alfaces marcadas, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 13, 17 e 18, com septoriose.

Tabela 30 - Caracteres de 30 plantas de Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão geração F₄.

	Diâmetro (cm)	Tipo	Cor	Palatabilidade	Antocianina	Tipo	Formato da Folha
1	30	cr	VE	D	-	F	L
2	43	cr	VE	AM	+	F	L
3	47	cr	VE	D	+	F	L
4	42	cr	VE	D	+	F	L
5	43	cr	VE	D	+	F	L
6	47	cr	VC	D	-	A	E
7	39	cr	VE	D	+	A	E
8	42	cr	VC	AM	-	A	L
9	35	cr	VE	D	+	F	L
10	45	cr	VE	D	+	F	L
11	42	cr	VE	D	+	F	L
12	53	cr	VE	D	+	F	L
13	60	cr	VC	D	+	A	E
14	36	cr	VE	D	-	F	L
15	60	cr	VC	D	+	A	E
16	39	cr	VC	D	-	A	L
17	35	cr	VE	D	+	A	L
18	43	cr	VE	AM	+	A	L
19	40	cr	VE	D	+	A	L
20	33	cr	VE	D	+	F	L
21	53	lis	VE	D	+	F	L
22	45	cr	VC	D	-	A	L
23	43	cr	VE	D	+	A	L
24	41	cr	VE	D	+	A	L
25	52	lis	VC	D	-	A	E
26	42	cr	VE	D	+	A	L
27	35	cr	VE	D	+	F	L
28	39	cr	VE	D	+	A	E
29	38	cr	VE	AM	-	F	L
30	40	cr	VC	D	-	F	L
	$\bar{X}=42,7$	15:1	3:1	13:3	3:1		3:1
	$s=7,2$	$\chi^2=0,008^*$	$\chi^2=2,17^*$	$\chi^2=0,58^*$	$\chi^2=0,4^*$		$\chi^2=0,4^*$

cr= folha crespa

VC= cor verde clara

- = ausência de antocianina

D= sabor doce

F= tipo fechada

comprimento do dia do mês de dezembro 13,2 horas

ls= folha lisa

L= folha larga

+= presença de antocianina

AM= sabor amargo

A= tipo aberta

 $\chi^2_t=3,845$

VE= cor verde escura

E= folha estreita

O índice pluviométrico dos meses de outubro e novembro foram 199,8 mm e 98,6mm respectivamente e a temperatura máxima absoluta perto de 35⁰C (Figuras

01 e 02) essas condições climáticas favorecem o crescimento do fungo causador da septoriose, no entanto o avanço da doença nesse período foi pequeno. Ao adentrar o mês de dezembro e janeiro quando a quantidade de chuvas aumentou ficando acima de 400mm assim como a temperatura. O ataque da doença também aumentou, considerando que choveu 44 dias quase consecutivos em 2 meses. A quantidade de plantas pendoadas foi muito pequeno, quando os dias eram longos e com temperaturas altas. O sabor amargo foi detectado em poucas plantas apesar das altas temperaturas.

Tabela 31 - Análise de vitamina A de 8 plantas de Moreninha X Vitória geração F₄.

Amostra	Carotenóides totais	RE/100g	Vitamina A UI/100g
1	235,3	554	5538
2	181,6	489	4887
3	167,9	465	4653
4	183,8	485	4851
5	188,5	458	4577
6	183,8	481	4805
7	192,4	438	4376
8	196,9	477	4765
\bar{X}	191,3	480,7	4806,5

As sementes da planta com 5538 foi semeada e germinou aos 4 dias de sementeira, foi transplantada aos 21 dias n=150 plantas. O índice de perda foi 14% devido à falta de água para irrigação. Aos 45 e 55 dias foi feita seleção (Tabela 32). O caráter cabeça simples/bifurcada os dados sugerem que dos três genes um se apresenta em homozigose. Para espigamento tardio/precoce os dados sugerem que dos três pares de genes dois se apresentam em homozigose.

Tabela 32 - Seleção da geração F₅ aos 45 e 55 dias de Moreninha de Uberlândia X

Vitória de Santo Antão.

45 dias (n=129) c/dia = 11,7/abr.		55 dias (n=55) c/dia = 11,3/mai.		total		x ² / segregação
113 et (87,6%)	16 ep (21,4%)	30 et (54,5%)	25 ep (45,5%)	88 et (68,2%)	41 ep (31,8%)	x ² = 3,16* 3:1
79 gr (61,2%)	50 pq (38,8%)	51 gr (92,7%)	2 pq (3,6%)	77 gr (59,7%)	52 pq (40,3%)	
126 ve (97,7%)	3 vc (2,3%)	51 ve (92,7%)	4 vc (7,3%)	122 ve (94,6%)	7 vc (5,4%)	
124 cs (96,1%)	5 cd (3,9%)	55 cs (100%)	0 cd	124 cs (96,1%)	5 cd (3,9%)	x ² = 1,24* 15:1

et= espigamento tardio
 pq= tamanho pequeno
 cd= cabeça dupla
 x²_t= 3,841

ep= espigamento precoce
 vc= verde clara
 cs= cabeça simple

gr= tamanho grande
 ve= verde escura
 c/dia=comprimento do dia

5.2.4. Moreninha de Uberlândia X Simpson

Na geração F₄ desse cruzamento foi feita análise de Vitamina A de 6 plantas escolhidas entre as maiores e mais sadias (Tabela 33). Os teores de β-caroteno obtidos foram abaixo do esperado no entanto estão acima das cultivares existentes no mercado. Uma das justificativas pode ter sido a idade das plantas ou a amostragem pequena. Aos 60 dias foi feita inoculação de *Septoria lactucae*, 15 dias depois foi feita avaliação de 15 plantas sendo que todas receberam nota 08 quanto ao ataque de septoriose mostrando-se homogêneas quanto ao ataque pela doença somente nas folhas junto ao solo.

Tabela 33 - Teor de β-caroteno e Vitamina A de Moreninha de Uberlândia X Simpson geração F₄.

Amostra	β-caroteno (μg/g)	RE/100g	UI/100g
01	33.34	556	5557
02	39.43	657	6572
03	36.72	612	6120
04	38.46	641	6410
05	20.11	335	3352
06	32.32	539	5387
\bar{X}	33.40	556,7	5566,3

A geração F_5 germinou aos 4 dias de sementeira, foi transplantada dos 18 aos 20 dias sendo $n= 108$. Foi feita seleção aos 75 dias (Tabela 34). O caráter verde escura/clara apresentou segregação 3:1 como esperado significativo a 5%. Para formato tipo alface/almeirão os dados sugerem a presença de dois pares de genes segregação 15:1, sendo o χ^2 calculado menor que o tabelado, significativo a 5%. Para o caráter septoriose houve segregação 63:1 sugerindo a presença de 3 pares de genes, no entanto são necessários mais estudos.

Aos 100 dias todas as plantas já apresentavam inflorescência (Tabela 35). Os dados da seleção aos 75 dias da geração F_6 em 96 plantas (Tabela 36), o caráter brilhante/opaca os dados sugere a presença de dois genes recessivos segregação 15:1. Para o caráter resistência a septoriose e “tipburn” os dados sugerem a presença de 2 genes apresentando χ^2 calculado menor que o tabelado portanto segregação 15:1 nas duas características.

Tabela 34 - Seleção aos 75 dias Moreninha de Uberlândia X Simpson geração F_5 .

86 verde escuras (79,6%)	22 verde claras (20,4%)	$\chi^2= 1,23^* / 3:1$
83 grandes (76,9%)	25 pequenas (23,1%)	
106 sem septoriose (98,1%)	2 septoriose (1,9%)	$\chi^2= 0,058^* / 63:1$
104 com formato de alface (96,3%)	4 formato tipo almeirão (3,7%)	$\chi^2= 1,2^* / 15:1$
96 sem “tipburn” (85,2%)	16 com “tipburn” (14,8%)	
comprimento do dia abril/94 = 11,7 horas		$\chi^2_t= 3,841$

A falta de espigamento deve ser regida por dois genes recessivos (neste caso) segregação 15:1 (Tabela 35). O χ^2 calculado foi menor que o tabelado, significante a 5%.

Tabela 35 - Índice de floração aos 110 dias de Moreninha de Uberlândia X Simpson geração F_5 .

24 plantas com flor	61,54%
15 plantas com botão	38,46%

- Mais de 1/3 das folhas estavam atacadas por septoriose.
comprimento do dia =11,3 horas/jun/94

A temperatura máxima absoluta nesse período e o alto índice de chuvas (Figuras 03 e 04), proporcionou o ambiente ideal para o desenvolvimento do fungo, no entanto apenas 8,3% das plantas foram atingidas pela doença. Apesar do comprimento do dia ser longo as plantas não desenvolveram inflorescência aos 75 dias.

Tabela 36 - Seleção aos 75 dias de Moreninha de Uberlândia X Simpson geração F₆ n= 96.

90 brilhantes (93,8%)	6 opacas (6,2%)	15:1*
93 verde escura (96,9%)	3 verde claras (3,1%)	
94 grandes (97,9%)	2 pequenas (2,1%)	
62 com formato de alface (64,6%)	34 com formato de almeirão (35,4%)	
88 sem septoriose (91,7%)	8 com septoriose (8,3%)	15:1*/x ² = 0,7
87 sem "tipburn" (90,6%)	9 com "tipburn" (9,4%)	15:1*/x ² = 1,1
comprimento do dia/dez/94 = 13,2 horas		x ² _t = 3,841

O índice pluviométrico do mês de fevereiro ficou acima de 400mm (Figura 05) mas não prejudicou o florescimento.

Os dados sugerem que a falta de espigamento seja regida por dois genes recessivos (neste caso) segregação 15:1 (Tabela 37).

Tabela 37 - Índice de floração aos 120 dias Moreninha de Uberlândia X Simpson F₆.

Característica	Porcentagem (%)	
17 espigadas sem botão	50	
13 espigadas com botão	38,24	x ² = 1,76* / 15:1
4 sem espigamento	11,76	

-Um palmo das folhas estavam levemente atacadas por septoriose.
comprimento do dia /fev/95= 12,7

x²_t= 3,841

5.2.5. (Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão)F₅ X (Moreninha de Uberlândia X Simpson)F₆

O cruzamento recíproco não mostrou diferenças, portanto, não houve influência diferente e observável dos fatores mitocondriais. Na geração F₁ a seleção

foi feita eliminando-se apenas os indivíduos doentes e muito pequenos, as sementes foram colhidas em "bulk". Na geração F_2 foi feita a seleção aos 57 dias em 182 plantas. A segregação quanto ao formato tipo alface/tipo almeirão. Apresentou-se diferente do esperado o que se justifica pelo fato das sementes terem sido colhidas em "bulk".

Tabela 38 - Segregação quanto ao formato de (Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão) F_5 X (Moreninha de Uberlândia X Simpson) F_6 .

Característica	Indivíduos
tipo alface	151
tipo almeirão	31

As 34 plantas com menos de 20cm de diâmetro estavam todas localizadas numa mesma região da área experimental, portanto acredita-se que houve algum fator naquele local que não permitiu o desenvolvimento das plantas que estavam no local. Observava-se que havia diferença da outra parte do canteiro, onde as plantas desenvolveram normalmente. O maior número de plantas possui diâmetro de 26-30cm e o número de plantas menor de 36-39 cm, justificado pela idade das plantas que ainda era de 50 dias, visto que ainda tinham mais tempo para se desenvolverem.

Tabela 39 - Diâmetro apresentado a geração F_2 de (Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão) F_5 X (Moreninha X Simpson) F_6 aos 50 dias.

Diâmetro (cm)	Indivíduos
11—15	09
16—20	25
21—25	47
26—30	62
31—35	25
36—39	07

O caráter “cor da folha” conforma-se com a segregação 3:1 (Tabela 40), o χ^2 calculado é menor que o tabelado.

Tabela 40 - Segregação quanto à cor na geração F_2 (Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão) F_5 X (Moreninha X Simpson) F_6 .

129 verde-escura	53 verde clara	3:1 $\chi^2= 1,64$
113 com antocianina	69 sem antocianina	
$\chi^2_{1} = 3,84$		

A maioria das plantas (134) possuíam formato tipo alface. De um total de 141 plantas apenas 8 apresentavam doença sendo 3 com “tipburn” e 5 com septoriose (Tabela 41).

Tabela 41 - Seleção feita aos 75 dias da geração F_2 (Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão) F_5 X (Moreninha de Uberlândia X Simpson) F_6 .

90 grandes	51 pequenas
136 sem septoriose	05 com septoriose
138 sem “tipburn”	03 com “tipburn”
134 formato bom	07 com formato ruim
comprimento do dia do mês de setembro foi 11,5	

O híbrido destacou-se quanto ao tamanho, apresentando-se maior que as cultivares Moreninha e Maioba (Figura 12). Suas raízes apresentaram maior desenvolvimento em solos de cerrado, quando comparada a cultivar Maioba (Figura 13).



Figura 12 - Comparação entre a cultivar Moreninha, o cruzamento (Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão) F_5 X (Moreninha de Uberlândia X Simpson) F_6 e a Maioba respectivamente quanto ao tamanho.



Figura 13 - Comparação quanto ao tamanho da raiz entre o A) híbrido e B) Maioba.

Foram marcadas 19 plantas de um total de 75 aos 90 dias para acompanhamento e coleta de sementes para a próxima geração.

- 1- Solta, sadia, crespa, todas as folhas com grande quantidade de antocianina.
- 2- Solta, sadia, crespa, todas as folhas com grande quantidade de antocianina.
- 3- Solta, sadia, crespa, todas as folhas com antocianina.
- 4- Solta, sadia, crespa, com antocianina predominando nas folhas inferiores.
- 5- Solta, sadia, crespa, todas as folhas levemente com antocianina predominante nas folhas inferiores.
- 6- Um pouco fechada, crespa, com antocianina nas folhas inferiores, pequenas manchas pretas nas folhas mais internas (mais jovens).
- 7- Pouco solta, crespa, sem antocianina, com a primeira roda de folhas inferiores junto ao chão atacada de septoriose.
- 8- Solta, crespa, sadia, leve presença de antocianina.
- 9- Solta, crespa, sem antocianina, presença de "tipburn", 50% de ataque por septoriose.
- 10- Solta, crespa, aberta, sem antocianina, folhas largas, iniciando "tipburn", 1/3 da primeira roda de folhas junto ao chão com septoriose.
- 11- Solta, crespa, com antocianina, iniciando "tipburn" nas folhas internas.
- 12- Pouco fechada, crespa, sem antocianina, iniciando "tipburn" nas folhas internas.
- 13- Solta, sadia, crespa, com antocianina.
- 14- Solta, sadia, crespa, aberta, leve presença de antocianina em todas as folhas.
- 15- Solta, crespa, leve presença de antocianina, levemente acometida de "tipburn".
- 16- Solta, sadia, crespa, aberta, antocianina predominando nas folhas inferiores.
- 17- Solta, sadia, crespa, presença de antocianina.
- 18- Solta, sadia, crespa, forte presença de antocianina.
- 19- Solta, crespa, sem antocianina, com a 1ª roda de folhas junto ao chão levemente atacada por septoriose.

Observou-se que a septoriose e a "tipburn" atacavam muito mais as plantas sem antocianina, tanto que estas diferenciavam-se das plantas sadias do canteiro a uma distância de 20m do canteiro.

Ao verificar que todas as 11 plantas sadias possuíam antocianina, que 5 planta sem antocianina estavam doentes e que apenas 3 plantas com antocianina estavam doentes, utilizou-se do método do χ^2 em tabela de contingência para verificar se a presença de antocianina conferia maior tolerância das plantas à "tipburn" e a septoriose.

O χ^2 calculado foi 9,35 menor que o tabelado a 1% portanto a hipótese tem a probabilidade superior a 99% de estar certa
 $\chi^2_t = 11,345$

Tabela 42 - Proporção de plantas doentes e com antocianina n=19.

	sadias			doentes			total
	obs.	esp.	χ^2	obs.	esp.	χ^2	
c/antocianina	11	8,1	1,04	3	5,9	1,42	14
s/antocianina	0	2,9	2,89	5	2,1	4,00	5
total	11	11		8	8		19

Os testes feitos para a "tipburn" que suspeitava ser virose deram negativos. Esperava-se lesão clorótica local no entanto os sintomas não apareceram descartando portanto a hipótese de ser o vírus do mosaico da alface.

Os cruzamentos: Maioba X (Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão) F₅; (Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão)F₆ X (Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão)F₅ e seus recíprocos tiveram a geração F₁ plantadas e selecionadas apenas retirando as plantas doentes e pequenas. Suas sementes de cada cruzamento foram colhidas em Bulk pois não houve aparentemente diferenças entre as plantas. Também não houve nenhuma diferença dos fatores mitocondriais.

Durante o período de florescimento e produção de sementes, heterópteros da família Lygaeidae invadiram as plantas e colocaram seus ovos nos botões e quando as larvas emergiam estas penetravam as flores já fecundadas e se alimentavam das sementes. Esta praga causou perda considerável na produção de sementes durante a condução do experimento.

Os insetos do gênero *Aphis* transmissores do vírus do mosaico da alface atacaram as plantas desde o período de plântula até a fase de produção de sementes. Esse inseto não é um parasita comum desta planta, no entanto a densidade de indivíduos por planta era tanta que a face inferior das folhas se apresentavam cobertas. Não houve necessidade de controle com químicos, apenas o controle natural feito pela família Coccinellidae, Sub-família Coccinellinae sem prejudicar as plantas. Não houve o aparecimento do vírus.

6. CONCLUSÕES

O meio MS modificado revelou-se ótimo para indução de calos.

O meio MS completo foi ótimo para regeneração de plantas sem haver necessidade do uso de hormônios para a enraizamento ou crescimento.

A metodologia utilizada para transferência de calos, aclimatação e transferência para o campo foi muito boa. Sendo aconselhável o uso de lâminas de bisturi de aço inoxidável.

A alface mostrou-se muito boa para o estudo da variação somaclonal. Pelos dados de vitamina A obtidos pode-se concluir que a variação somaclonal é hereditária e é capaz de segregar-se.

A análise de vitamina A mostrou pequenas variações por lotes.

Os cruzamentos Moreninha de Uberlândia X Vitória de Santo Antão deram alguns indivíduos muito bons e que talvez revelem ótima adaptação a solos pobres.

Todos os cruzamentos feitos entre a *Lactuca sativa* e a *Lactuca indica* não formaram híbridos.

Um grande número de caracteres que segregaram nestes estudos sugerem que muitos deles tenham determinação genética relativamente simples como por exemplo:

- resistente a "tipburn"/ susceptível 15:1, presença de 2 genes e modificadores
- cabeça simples/ bifurcada 63:1
- espigamento tardio/precoce 15:1
- resistente a septoriose/susceptível 15:1, presença de 2 genes e modificadores
- formato alface/almeirão 63:1
- folha larga/estreita 3:1
- com antocianina/sem antocianina 3:1
- sabor não amargo/amargo 13:3
- folha crespa/folha lisa 15:1

Devido à quantidade de abelhas antes das 6 horas é possível que a taxa de cruzamento natural seja maior que 3% (5 a 8%).

As plantas atingidas por insetos do gênero *Aphis* sp, mostraram não precisar de outro controle além do natural feito pela família Coccinellidae.

7. ABSTRACTS

The lettuce (*Lactuca sativa*) is among the most eaten vegetables in Brazil and is abundantly cultivated. Unfavourable environmental factors and diseases are the majors problems its cultivation. The majority of lettuce cultivars that are sold at the market is very poor in provitamin A. The aim of this work was the obtainment of lettuce cultivars that were rich in vitamin A, more sweet, tolerant or resistant to *Septoria lactucae*, wide leaves, tolerant to the strong summer rain fall, late flowering, and adapted to pH from 4 to 8. In order to reach these goals the following cultivars were used: "Moreninha de Uberlândia", "Maioba", "Vitória de Santo Antônio" and "Simpson". Two methods were utilized: 1^{sts}) culture of the cotyledonary proximal portion in modified MS medium. 2nd) crosses among all cultivars followed by self-fertilization and selection for characters of economical interest. The method used for the determination of provitamin A is described by RODRIGUEZ *et al.*(1976). The calli were divided fifteen days after the explants had been inoculated. The developed calli were put in regeneration medium after 13 days. The regenerated seedling were put into pots in green house where they stayed for 10 days, then plants were transferred to the field. Differences among plants within and among populations P₀, F₁ and F₂, showed somaclonal variation. All 61 crosses carried out between *Lactuca indica* and *Lactuca sativa* were unsuccessful. In ours crosses the following genetical data were obtained: resistance to tipburn/susceptibility 15:1; double head/ single head, 63:1; late flowering/ early flowering, 15:1; resistance to *Septoria* /susceptibility, 15:1; round leaves/narrow leaves, 63:1; wide leaves/narrow leaves, 3:1; anthocyanin/green, 3:1; sweet/bitter, 13:3; crisped leaves/smooth leaves, 15:1. Plants with antocianin are more resistant to *Septoria lactucae* and do not show leaves with burned tips. Tests for virus in plants with burned tip leaves gave negative results.

8. BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALMEIDA, E. L. JR. (1991). Duas novas cultivares de alface ricas em vitamina A e tolerantes a solos ácidos. Monografia apresentada à Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do título de Engº Agrônomo, 32 p.
- BABCOCK, E. B., STEBBINS, G. L., & JENKINS, G. A. (1937). Chromosomes and Phylogeny in Some Genera of the Crepidineae. *Cytologia*, **1**: 188-210.
- † CASALE, C. M. O.; USBERTI FILHO, J. A. e SIQUEIRA, W. J. (1994). Definição de metodologia de regeneração somática *in vitro* de cultivares comerciais de alface (*Lactuca sativa* L.). *Horticultura Brasileira*. **12**. (1): .75.
- ✧ DUARTE, R. L.R.; SETÚBAL, J.W.; ANDRADE JÚNIOR, A.S.; SOBRINHO, C.A.; SILVA, P.H.S. e RIBEIRO, V.Q. (1991). Introdução e Avaliação de Cultivares de Alface (*Lactuca sativa* L.) nos Períodos Seco e Chuvoso em Teresina- P.I. **EMBRAPA**, 1-8.
- DURST, C. E. (1929). Inheritance in Lettuce. *Science* **69**: 553-554.
- ENGLER, D.E. & GROGAN,R.G. (1983). Isolation, Culture and Regeneration of Lettuce Leaf Mesophyll Protoplasts. *Plant. Sci. Lett.*, **28** (2): 223-229.
- ENGLER, D.E. & GROGAN, R.G. (1984). Variation in Lettuce Plants Regenerated from Protoplast. *J. Hered.*, **75**: 426-30.
- † FILGUEIRA,F.A.R. (1982). **Manual de Olericultura: cultura e comercialização de hortaliças**. 2.ed, São Paulo, Agronômica Ceres, 77-86.

- GIUGLIANO, R.; SHRIMPTON, R.; ARCKCOLL, D.B.; GIUGLIANO, L. G. & PETRERE JÚNIOR, M. (1978). Diagnóstico da Realidade Alimentar e Nutricional do Estado do Amazonas. *Acta Amaz.* **8** (2). Suplemento,2: 1-54.
- GOODWIN, T.W. & BRITTON, G. (1988). Distribution and Analysis of Carotenóids In **Plant Pigments**. Goodwin, T.W. (ed) London, Academic Press: 61-132.
- HEDRICK, U. P. (ed) (1919). Sturtevant's notes on edible plants. **N.Y., Dep. Agric. Ann. Rep.** **27** (2/2): 685.
- ISLABÃO,N. (1977). **Vitaminas seu metabolismo no homem e nos animais domésticos**. 2 ed., São Paulo, Nobel: 29-48.
- KERR, W.E.; LEÃO, P.L.S.; CAMPOS,F.S.e SANTOS-FILHO,J.R. (1986a). Variação genética oculta em alface da cultivar Salad Bowl. **Rev. Bras. de Genética**, **9** (2):375-379.
- KERR, W. K.; CAMPOS,F. I. e BARROS, M. J. B. (1986b). Notas sobre os recursos naturais da horticultura na Amazônia. **Anais do I Simpósio do Trópico Umido** , **6**: 451-456.
- KERR, W. K.; ALMEIDA,E.L.Jr.; CAMPOS, F.J.e SANTOS-FILHO,J.R. (1990). Maioba: nova cultivar de alface para solos ácidos. **Horticultura Brasileira**, **8** (2):33-34.
- LINDQVIST, K. (1960). On the Origin of Cultivated Lettuce. **Hereditas** **46**: 319-50.

- LEUNG, W.T.& FLORES, M. (1961). Food Composition Tables for Use in Latin America. Panamá, Instituto de Nutricion de America Central, 144p.
- MAC DONALD, W. (1981). Menores estão desnutridos. Entrevista dada ao Imparcial de São Luis- MA, em 28.08.1981.
- MACKEY, J. (1986). Genetic interaction and breeding strategies in relation to fungal cereal diseases. In: SIDDIQUI, K.A. & FARUQUI, A.M. **New Genetical Approaches to Crop Improvement**. Karachi, Pidc Printing Press (PUT) Ltda: 503-525.
- MENEZES, O. B. (1943). Número de cromossômios em *Brassica e Lactuca*. Rio de Janeiro, **Revista de Agricultura 18**: 277-278.
- MERCADANTE, A. Z. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (1990). Carotenoid composition and Vitamine A value of some native Brazilian green leafy vegetables. **Inst. J. Food Sci. Technol.**25: 213-219.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473-497.
- NAGAI, H. (1983) Caracterização de Resistência ao Calor em Alface. In: XXIII Congresso Brasileiro de Olericultura (18 a 23 de julho) Rio de Janeiro-R.J.: Resumos, Sociedade de Olericultura do Brasil, Instituto Agrônômico, S.P., 123p.
- PHILLIPIS, R. L.; KAEPLER, S. M. & OLHOFT, P. (1994). Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 5222-5226.

Recommended Dietary Allowance, (1980) 9 ed, Washington, D.C. **National Academy of Science-National Research Council: 55-60.**

RODRIGUES, D. B., RAYMUNDO, L. C., LEE, T. C., SIMPSON, K. L. & CHICHESTER, C. O. (1976). Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. **Ann. Bot. 40: 615-24.**

RODRIGUES-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; GODOY, H.T. & ARIMA, H.K. (1988). Assessment of Provitamin A Determination by Open Column Chromatography/Visible Absorption Spectrophotometry. **Journal of Chromatographic Science 26: 624-29.**

RYDER, E. J. An epistatically controlled pollen steriles in lettuce. **Proceeding Amer. Soc. Hort. Sci., 91: 366-368. 1967.**

RYDER, E. J., WHITAKER, T. W. Lettuce. In SMARTT, J. & SIMMONDS, N.W. (1990) **Evolution of Crop Plants.15: 53-56, 2ª ed. Ed. Longman Scientific & Technicae.**

SANTOS, C.L.dos; FIGUEIREDO JÚNIOR, M.M.; BARROS,P.C. de e RABELO,S.M.S. (1981). Avaliação do Estado Nutricional de Pré-escolares e escolares de Três Comunidades da Periferia de São Luís-MA. Mimeografado, 1-5.

SIMPSON, K. L. (1983). Relative value of Carotenoids as precursors of Vitamine A. **Proc. Nutr. Soc. 42:7-17.**

SOUZA, G.S. (1587) Notícia do Brasil. Reproduzido em 1948 na coleção Biblioteca Histórica Brasileira, 16, (Tomo 1º e 2º). Livraria Martins, Editora São Paulo, 1-2.

- TOKESHI, H. e CARVALHO, P.C.T. (1990). Doenças do tomateiro. In: GALLI, F. (Coord) **Manual de Fitopatologia- Doenças das Plantas Cultivadas**. 2 ed, Piracicaba, Agronômica Ceres.
- TORRES, A.C. & CALDAS,L.S. (1990). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, **ABCTP/EMBRAPA-CNPH**, 433p.
- WINGES, P.A. (1972). Descriptive list of vegetable varieties. **Am. Soc. Hort. Sci.** 194 p., St. Joseph, MI., USA.
- WOLF, S.J. & EARLE, E.D. (1990). Inhibition of corn callus growth by *Helminthosporium carbonum* race 1 toxin. **Crop Science**, **30**: 728-734.

ANEXO I



ALFACE MAIOBA - *Lactuca sativa*

Warwick Estevam Kerr
Francisco Raimundo da Silva
Aparecida Celia Paula dos Santos
Departamento de Genética e Bioquímica
Bl. 2E, Sala 37, Campus Umuarama
38400-902, Fone/FAX: (034) 232 3436

A alface Maioba é uma hortaliça com alto conteúdo de Vitamina A (6500 U.I.), selecionada no Maranhão e em Uberlândia por W. E. Kerr. A alface Maioba, se colocada habitualmente na alimentação diária, supriria as necessidades de Vitamina A, tão importante na manutenção e conservação da saúde do homem desde a mais tenra idade até a fase adulta. Crianças, habituadas a uma alimentação rica em vitaminas terão boa saúde e adquirirão maior resistência às enfermidades e não sofrerão da cequeira noturna. O organismo humano tem uma demanda diária de vitamina A de 1600 U.I., por isso adultos e crianças precisam buscá-la em várias hortaliças (cenoura, couve, alface). A alface Maioba é de fácil cultivo. Começa-se com o preparo da sementeira e do canteiro definitivo para onde serão transplantadas as mudas. Temos várias opções de sementeiras:

1 - **EM CAIXOTES** - Usando-se uma mistura de partes iguais de esterco curtido, solo e areia.

2 - **EM CANTEIROS** - Preparando os previamente revolvendo-se e destorroando o solo com uma enxada ou enxadão, a uma profundidade mínima de 1 palmo. Tendo à disposição uma peneira de malha bem aberta, pode-se peneirar o solo, ou usa-se um rastelo a fim de deixar o solo o mais livre possível de tóco e pedregulhos. Prepara-se uma área de 1 metro quadrado podendo ladeá-la com tijolos, pedras, tábuas ou até pau roliço. Faz-se uma adubação com até 5 litros de estêrco bem curtido, 100 gramas de adubo químico (NPK 4:14:8 = um punhado na mão quase cheia) e a mesma quantidade de calcáreo se disponível ou a metade de cal virgem. Faz-se a incorporação o mais homogeneamente possível, rega-se diariamente por no mínimo uma semana. No dia da sementeira, revolve-se e nivela-se o solo. Faz-se o plantio das sementes, tanto no caixote como no canteiro, fazendo pequenos sulcos contínuos a uma profundidade de 0.5 a no máximo 1 cm e distando entre linhas 10 cm.. No caixote as linhas dos sulcos podem ser mais próximas. Lança-se as

sementes nos sulcos e cobre-se com uma fina camada de terra, de preferência peneirada. As sementes precisam de luz para germinar, por isso não enterre mais de 1 cm.

Rega-se bem ,diariamente, até o nascimento das plantas.

3 - EM BANDEJAS DE ISOPOR - Compra-se as bandejas, próprias para formação de mudas de alface, e adquire-se o substrato. Coloca-se o substrato nas células da bandeja; faz-se um pequeno sulco em cada célula com a ponta de um lápis ou um pauzinho roliço, a uma profundidade de meio centímetro e coloca-se duas sementinhas no sulco. Regar-se diariamente com regador de furos pequenos ou comprime-se o jato de uma manqueira de forma a regar em forma de chuva.

4 - CANTEIRO PARA TRANSPLANTIO - Deverá ser preparado com uns 15 a 20 dias de antecedência. Prepara-se revolvendo e destorrendo bem o solo a uma profundidade de 25 cm. Aduba-se distribuindo 8 litros de esterco, 150 gramas de adubo químico 4:14:8 (um punhado na mão cheia) e a mesma quantidade de calcáreo. Incorpora-se bem, marca-se as extremidades com 2 estacas distanciadas a 1 metro; corre-se um barbante em volta para orientar a montagem do canteiro que ficará com 1 metro de largura e 20 cm de altura. Rega-se para ter a reação do adubo e aguardar as mudas ficarem prontas para o plantio no mínimo 20 dias da semeadura. Após a semeadura mantêm-se o solo limpo e fofo. Aos 15 dias faz-se uma adubação de cobertura com sulfato de amônia ou uréia usando-se cerca de 10 a 15 gramas em volta de cada planta (um punhado na ponta dos dedos). Repete-se a operação aos 30 dias.

Obs. Alface precisa ser cultivada em área a pleno sol.

Recomendação importante: Esta alface Maioba é preciosa fonte de vitamina A (6500 U.I.): cultive-a cuidadosamente. Ela produz sementes, observe as plantas de maior vigor, de cor verde intenso e reserve-as, não consumindo-as. Deixa-as para produzir suas próprias sementes. Após os 70 dias ela começará o espigamento. Não use para produção de sementes as que espigarem cedo. Duas folhas grandes numa salada ou em um sanduiche lhe dão toda a Vitamina A que voce precisa para todo o dia.

ANEXO II

Meio de MURASHIGE & SKOOG* em mg/l e mM

Componentes	Concentração	
	mg/l	mM
NH ₄ NO ₃	1.650	20,6
KNO ₃	1.900	18,8
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	2,99
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	1,5
KH ₂ PO ₄	170	1,25
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	0,100
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	0,0299
H ₃ BO ₃	6,2	0,100
KI	0,83	0,005
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,001
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,0001
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,0001
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,3	0,100
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	0,100
Glicina	2,0	0,0266
Ácido Nicotínico	0,5	0,001
Piridoxina HCl	0,5	0,0024
Tiamina HCl	0,1	0,0003
Mio-inositol	100	0,65
Sacarose	30.000	87,6