

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL**

**IVANI VIEIRA DAMACENO**

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *LACTUCA SATIVA*  
(cv. ELBA) UTILIZANDO MEIOS DE CULTIVO  
ALTERNATIVOS**

**São Mateus, ES  
Fevereiro de 2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL**

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *LACTUCA SATIVA*  
(cv. ELBA) UTILIZANDO MEIOS DE CULTIVO  
ALTERNATIVOS**

**IVANI VIEIRA DAMACENO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo

**São Mateus, ES  
Fevereiro de 2016**

# **ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *LACTUCA SATIVA* (cv. ELBA) UTILIZANDO MEIOS DE CULTIVO ALTERNATIVOS**

**IVANI VIEIRA DAMACENO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

Aprovada em 29 de fevereiro de 2016.

---

Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(membro interno)

---

Dr. Omar Schmildt  
Sem vínculo  
(membro externo)

---

Prof. Dr. Adriano Fernandes Alves  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Co-orientador)

---

Dr<sup>a</sup>. Andreia Barcelos P. Lima Gontijo  
Universidade Federal do Espírito Santo  
(Orientadora)



## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela oportunidade e pela superação de todas as dificuldades e obstáculos enfrentados.

Aos meus familiares pelo apoio em todos os momentos, principalmente à minha mãe Carmelita Vieira Coelho, meu alicerce.

Aos meus irmãos, em especial, à minha irmã Oremilda Vieira Damaceno, por ter superado as fronteiras da irmandade.

Aos parceiros e amigos, Geferson Palaoro, Juliany Morosini, Rosiane Cipriano, Cássio Costa, Luciano Canal, Luciano Martins dos Santos, Drielly Gouveia, pelos ensinamentos, companheirismo, disponibilidade e a amizade.

Aos professores Ivoney Gontijo, Antelmo Falqueto e Edilson Schimidt pelas valiosas sugestões prestadas na realização deste trabalho.

A professora Andréia Barcelos Passos Lima Gontijo e ao professor Adriano Alves Fernandes pelas orientações, mas principalmente, pela oportunidade, confiança, incentivo e pelos ensinamentos.

Ao Centro Universitário Norte do Espírito Santo – Universidade Federal do ES pela realização deste curso.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos!

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>4</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
2.1 Aspectos gerais da alface.....	7
<b>3 CAPÍTULOS.....</b>	<b>8</b>
<b>3. 1 GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE LACTUCA SATIVA     (CV. ELBA) UTILIZANDO MEIO DE CULTIVO ALTERNATIVO</b>	<b>9</b>
.....	<b>9</b>
Resumo.....	9
Abstract.....	10
Introdução.....	11
Material e Métodos.....	13
Resultados e Discussão.....	19
Conclusões.....	29
Referências Bibliográficas.....	30
<b>3.2 DESENVOLVIMENTO DE LACTUCA SATIVA (CV. ELBA) EM     DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MEIO MS E FORMULAÇÃO     COMERCIAL</b>	<b>37</b>
.....	<b>37</b>
Resumo .....	37
Abstract.....	38
Introdução.....	39
Material e Métodos.....	41
Resultados e Discussão.....	44
Conclusões.....	65
Referências Bibliográficas .....	66

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da alface (*Lactuca sativa* L.) destaca-se pela grande importância econômica e alimentar, com expressiva produtividade no Brasil, sendo considerada a hortaliça folhosa mais consumida no país (Lopes et al., 2005). Esta espécie tem sido utilizada como planta teste pela grande sensibilidade que tem apresentado aos adubos orgânicos, possibilitando, desta forma, diferenciar quantitativamente e qualitativamente um produto de outro (Nakagawa et al., 1992, p.173-180). A espécie também apresenta rápida germinação, em aproximadamente 24h; crescimento linear insensível às diferenças de pH em ampla faixa de variação e insensibilidade aos potenciais osmóticos, favorecendo sua utilização (Souza, 2005).

Sua propagação é feita através de sementes, que apresentam grande sensibilidade e são dependentes de vários fatores como temperatura, água, oxigênio, luz e substrato (Brasil, 2002). Uma das principais etapas do sistema produtivo da alface é a produção de mudas de boa qualidade, que determina o desempenho da planta no campo de produção, seja no aspecto nutricional ou produtivo (Filgueira, 2003). A alface também tem sido propagada *in vitro* utilizando como fonte de explantes, principalmente, folhas cotiledonares de plantas germinadas *in vitro* (Pinheiro, et al, 2012).

O emprego da biotecnologia para a *Lactuca sativa* L. requer um método de cultura de tecidos viável e eficiente (MOHEBODINI et al., 2011). Os programas de melhoramento genético da alface no Brasil visam a resistência à diversas doenças limitantes à produção, como as viroses, tolerância ao calor (ausência de pendoamento precoce), folhas com textura firme (CASALE, 1996) a propagação *in vitro* em larga escala, representando uma solução para os problemas da propagação tradicional que levam a transmissão de doenças (KARIM e AHMED, 2010). A utilização da técnica de Cultura de tecidos é muito empregada para a propagação de várias espécies para fins comerciais, devido à rápida propagação, boa qualidade genética e fitossanitária. Outro aspecto positivo é a possibilidade de produção o ano todo, uma vez que esta técnica independe de mudanças sazonais (Borges, 2009).

Mercier e Nievola (2003) consideram que a germinação de sementes *in vitro* é uma opção vantajosa para se conseguir plantas assépticas, e a partir delas iniciar-se a cultura de explantes, como folhas, segmentos nodais, entre outras. Porém, as principais desvantagens da propagação *in vitro* são o elevado custo dos reagentes e equipamentos utilizados, a necessidade das condições ambientais serem controladas e mão-de-obra capacitada, a ausência de protocolos para algumas espécies, a necessidade de longos períodos de pesquisa e o elevado valor final das mudas (Souza et al, 2000; Kozay et al, 1997).

Para o cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais, são utilizados meios nutritivos que fornecem as substâncias essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento. Por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender as necessidades específicas *in vitro* (Caldas et al., 1998). Têm sido utilizadas diversas formulações de meio básico, sendo, o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), o mais empregado, com suas modificações, sobretudo em relação à sacarose, vitaminas, reguladores de crescimentos e diluições para diversas espécies.

Os meios de cultivos comumente utilizados para a sua micropropagação de *L. sativa* têm sido o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), como descritos nos trabalhos de XINRUN e CONNER, (1992); ZHOU et al. (1992); STUART e MCCALL (1992) AMPOMAH-DWAMENA et al., (1997); SEABROOK e DOUGLASS (2000); HUNTER e BURRITT, (2002); KANAMOTO et al., (2006); NOLAN et al. (2009); FRANKLIN et al., (2011); MOHEBODINI et al., (2011); PINHEIRO et al., (2012).

Contudo, de acordo com alguns estudos com outras espécies, o meio MS não se mostra satisfatório e mudanças nos meios de cultura têm sido estudadas (Rego-Oliveira et al., 2003; Unemoto et al., 2007; Chapla et al., 2009; Gantait et al., 2009; Moreira et al, 2009; Pacek-Bieniek et al., 2010, Soares et al., 2012; Pinheiro et al., 2012; Pereira, 2014).

Segundo Prakash et al. (2004), o preparo de meios nutritivos para o cultivo *in vitro* de plantas, utilizando reagentes puro para análise (PA) é por conterem baixa quantidade de impurezas, reduzindo a influência de outras substâncias químicas no desenvolvimento das plantas cultivadas. Porém, a maioria desses reagentes é disponível comercialmente, apresentando a mesma concentração do nutriente e com baixo custo de aquisição. Devido à enorme demanda de meio de cultura nas biofábricas, a substituição dos sais PA por adubos comerciais, contribuiria



significativamente na redução do custo de produção de mudas micropropagadas (Pereira, 2014).

Estudos *in vitro* realizados por STANCATO, BEMELMANS E VEGRO (2001), PEDROSO-DE-MORAES et al. (2009), CHAPLA et al., (2009), GANTAIT et al., (2009); MOREIRA et al, (2009), PACEK-BIENIEK et al., (2010), SOARES et al., (2012); PINHEIRO et al., (2012), PEREIRA, (2014), SASAMORI et al., (2015) demonstram que através da simplificação dos meios de cultura atuais, utilizando, principalmente, fertilizantes como base destes meios de cultura é possível, além de diminuir os custos, garantir resultados satisfatórios para a produção de mudas.

Considerando a necessidade do desenvolvimento de meios de cultivo eficientes e de baixo custo para a produção de mudas e que possibilitem maior acesso dos produtores aos materiais propagativos de alta qualidade e com custo reduzido, o presente estudo objetivou-se no primeiro capítulo avaliar o desenvolvimento *in vitro* de *Lactuca sativa* (cv. Elba) comparando o Meio de cultura MS com uma formulação comercial à base de adubos minerais, ambos na presença e ausência de vitamina MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), enquanto que no segundo capítulo objetivou-se avaliar o desenvolvimento de *Lactuca sativa* L. (cv. Elba) em diferentes concentrações do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e de uma formulação comercial, ambos sem a presença de vitamina MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais da alface

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta herbácea anual, pertencente à família Compositae (BOO et al., 2011), subfamília Cichorioideae e do gênero *Lactuca* (FILGUEIRA, 2008). Apresenta caule pequeno, não ramificado, ao qual se prendem as folhas, que exibe ampla variabilidade quanto a sua forma, textura, coloração das folhas, caracterizando-se em diferentes tipos comerciais (CARVALHO FILHO et al., 2009).

A alface constitui uma das hortaliças mais consumidas no mundo, com grande importância como fonte alimentar, de vitaminas e sais minerais, como também pelo seu valor nutracêutico (Guimarães, 2005), sendo considerada a hortaliça folhosa mais importante na alimentação dos brasileiros, liderando a oitava posição entre as hortaliças em nosso país (FELTRIM et al., 2009). Geralmente é utilizada em alguns estudos científicos como planta teste, por apresentar sensibilidade às variações do meio, rápida germinação, possuir crescimento linear insensível às diferenças de pH em ampla faixa de variação (NAKAGAWA et al., 1992; SOUZA, 2005).

Os principais países produtores de *L. sativa* são China, Estados Unidos da América (EUA), Espanha, Itália, Índia, Japão e Turquia (FAOSTAT, 2011). É amplamente cultivada em todo o território nacional, desde pequenos cultivos caseiros até grandes áreas, apresentando alto índice tecnológico de produção (Laurett, 2015). Sua propagação é feita comumente por meio de sementes, as quais apresentam particular sensibilidade às variações na umidade e temperatura do meio onde germinam (BERTAGNOLLI et al., 2003). Também, tem sido propagada através do cultivo *in vitro*, pela regeneração de diferentes genótipos da alface por meio da indução da organogênese ou por via embriogênica, para isso, utiliza geralmente folhas cotiledonares, provenientes de plantas germinadas *in vitro* (Pinheiro, 2012).

### **3 CAPÍTULOS**

**3.1. GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *LACTUCA SATIVA* (CV. ELBA) UTILIZANDO MEIO DE CULTIVO ALTERNATIVO.**

## Resumo

A alface é uma planta herbácea, sendo considerada a hortaliça folhosa mais consumida no Brasil. É comumente utilizada para estudos científicos, devido à sensibilidade da espécie e à rápida germinação. A Cultura de Tecidos é uma importante ferramenta para a propagação de várias espécies, entretanto, os meios de cultivo utilizados apresentam custos elevados. Objetivou-se avaliar o desenvolvimento de *Lactuca sativa* (cv. Elba) comparando o Meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com uma formulação comercial, ambos com e sem adição de vitaminas. Sementes comerciais, após desinfestadas, foram inoculadas em tubos de ensaio com 10 ml de meio de cultivo contendo os seguintes tratamentos: Meio MS com vitaminas (T1), Meio MS sem vitamina (T2), Formulação comercial com vitamina (T3), Formulação comercial sem vitamina (T4). O experimento foi instalado em arranjo fatorial com delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições contendo 26 tubos por parcela. As variáveis analisadas foram índice de velocidade de germinação, tempo médio de germinação, porcentagem de germinação, número de folhas e raízes, comprimento aéreo e radicular, volume de raiz, massa da matéria fresca da parte aérea e radicular. Os dados foram avaliados segundo ANOVA, formando um esquema fatorial de 2x2 utilizando o programa Assistat versão 7.7. Foi utilizado o teste de Tukey para comparação múltipla de médias. Os resultados demonstraram que as plântulas *L. sativa* (cv. Elba), cultivadas em meio com formulação comercial apresentaram as maiores médias para todas as variáveis analisadas quando comparadas ao meio MS, podendo ser utilizado por apresentar maior facilidade e baixo custo de produção em relação ao meio MS.

**Palavras-chave:** Alface, cultivo *in vitro*, fertilizantes comerciais.

## **Abstract**

Lettuce is a herbaceous plant, being considered the leafy vegetable most consumed in Brazil. Commonly used for scientific studies, due to the sensitivity of the species and the rapid germination. Plant Tissue Culture is an important tool for the propagation of various kinds, however, the culture medium used may be costly. Aimed to evaluate the development of *Lactuca sativa* (cv. Elba) comparing the MS culture medium with a commercial formulation with and without vitamin. We used commercial seeds with 99.5% purity and 74% germination rate, which, after sterilized, they were inoculated in test tubes with 10 ml of culture medium containing the following treatments: MS medium with vitamin (T1), MS medium without vitamin (T2) commercial means with vitamin (T3) commercial means without vitamin (T4). Each treatment comprised five replicates with 26 test tubes, totaling 130 seeds per treatment. The IVG was carried out scores from the 4th day to the 7th day of germination. They were considered germinated the seeds that had 2 mm of root protrusion in accordance with recommendations of the Seed Analysis Rule. Data were evaluated according to analysis of variance with a completely randomized design, forming a 2x2 factorial design using the GENES program (Cruz, 2001). Tukey's test for multiple comparison of averages was used.

**Keywords:** lettuce, germination, commercial fertilizers.

## Introdução

A cultura da alface (*Lactuca sativa* L.) destaca-se pela grande importância econômica e alimentar, com expressiva produtividade no Brasil, sendo considerada a hortaliça folhosa mais consumida no país (Lopes et al., 2005). Esta espécie tem sido utilizada como planta teste pela grande sensibilidade que tem apresentado aos adubos orgânicos, possibilitando, desta forma, diferenciar quantitativamente e qualitativamente um produto de outro (Nakagawa et al., 1992, p.173-180). A espécie também apresenta rápida germinação, em aproximadamente 24h; crescimento linear insensível às diferenças de pH em ampla faixa de variação e insensibilidade aos potenciais osmóticos, favorecendo sua utilização (Souza, 2005).

Sua propagação é feita através de sementes, que apresentam grande sensibilidade e são dependentes de vários fatores como temperatura, água, oxigênio, luz e substrato (Brasil, 2002). Uma das principais etapas do sistema produtivo da alface é a produção de mudas de boa qualidade, que determina o desempenho da planta no campo de produção, seja no aspecto nutricional ou produtivo (Filgueira, 2003). A alface também tem sido propagada *in vitro* utilizando como fonte de explantes, principalmente, folhas cotiledonares de plantas germinadas *in vitro* (Pinheiro, et al, 2012).

A técnica de Cultura de tecidos é muito utilizada para a propagação de várias espécies para fins comerciais, devido à rápida propagação, boa qualidade genética e fitossanitária. Outro aspecto positivo é a possibilidade de produção o ano todo, uma vez que esta técnica independe de mudanças sazonais (Borges, 2009). Mercier e Nievola (2003) consideram que a germinação de sementes *in vitro* é uma opção vantajosa para se conseguir plantas assépticas, e a partir delas iniciar-se a cultura de explantes, como folhas, segmentos nodais, entre outras. Porém, as principais desvantagens da propagação *in vitro* são o elevado custo dos reagentes e equipamentos utilizados, a necessidade das condições ambientais serem controladas e mão-de-obra capacitada, a ausência de protocolos para algumas espécies, a necessidade de longos períodos de pesquisa e o elevado valor final das mudas (Souza et al, 2000; Kozay et al, 1997).

Para o cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais, são utilizados meios nutritivos que fornecem as substâncias essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento. Por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas

quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender as necessidades específicas *in vitro* (Caldas et al., 1998). Têm sido utilizadas diversas formulações de meio básico, sendo, o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), o mais empregado, com suas modificações, sobretudo em relação à sacarose, vitaminas, reguladores de crescimento e diluições para diversas espécies. Contudo, de acordo com alguns estudos, o meio MS não se mostra satisfatório para algumas espécies, e mudanças nos meios de cultura têm sido estudadas (Rego-Oliveira et al., 2003; Unemoto et al., 2007; Chapla et al., 2009; Gantait et al., 2009; Moreira et al., 2009; Pacek-Bieniek et al., 2010; Soares et al., 2012; Pinheiro et al., 2012; Pereira, 2014).

Segundo Prakash et al. (2004), o preparo de meios nutritivos para o cultivo *in vitro* de plantas, utilizando reagentes puro para análise (PA) é por conterem baixa quantidade de impurezas, reduzindo a influência de outras substâncias químicas no desenvolvimento das plantas cultivadas. Porém, a maioria desses reagentes é disponível comercialmente, apresentando a mesma concentração do nutriente e com baixo custo de aquisição. Devido à enorme demanda de meio de cultura nas biofábricas, a substituição dos sais PA por adubos comerciais, contribuiria significativamente na redução do custo de produção de mudas micropropagadas (Pereira, 2014).

Considerando a necessidade do desenvolvimento de meios de cultivo eficientes e de baixo custo para a produção de mudas e que possibilitem maior acesso dos produtores aos materiais propagativos de alta qualidade e com custo reduzido, objetivou-se avaliar o desenvolvimento *in vitro* de *Lactuca sativa* (cv. Elba) comparando o Meio de cultura MS com uma formulação comercial à base de adubos minerais, ambos na presença e ausência de vitamina MS.

## **Material e Métodos**

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES/UFES), município de São Mateus-ES.

### **1) Assepsia das sementes**

Sementes comerciais de *Lactuca sativa* com 99,5% de pureza e taxa de germinação de 85% foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, com álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio (NaOH) a 1% por 5 minutos em agitação, lavadas por três vezes, em água destilada autoclavada e secas em papel filtro autoclavados.

### **2) Instalação do Experimento**

Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio com 10 ml de meio contendo os tratamentos, conforme quadro abaixo:



Tratamento 1 MS Padrão	Tratamento 2 MS sem Vitamina	Tratamento 3 Formulação comercial com vitamina MS	Tratamento 4 Formulação Comercial sem vitamina
Solução de Macronutrientes	Solução de Macronutrientes	Solução nutritiva A com minerais comerciais	Solução nutritiva A com minerais comerciais
Solução de Cloreto de cálcio	Solução de Cloreto de cálcio	Solução nutritiva B com minerais comerciais	Solução nutritiva B com minerais comerciais
Solução de Micronutrientes	Solução de Micronutrientes	-	-
Solução de Ferro- EDTA	Solução de Ferro- EDTA	-	-
Mistura orgânica	-	Mistura orgânica	-
Mio-inositol	Mio-inositol	Mio-inositol	Mio-inositol
Ágar	Ágar	Ágar	Ágar
Sacarose	Sacarose	Sacarose	Sacarose

Para efeito de comparação, a tabela 1 mostra a formulação básica do meio Murashige & Skoog, 1962 (MS) e a formulação comercial (Fernandes *et al.*, 2002) adaptada.

Tabela 1 – Composição dos meios com Formulação comercial (Fernandes *et al.*, 2002) adaptada e MS (Murashige & Skoog, 1962) MS para propagação de *L. sativa* (cv. Elba).

Formulação Comercial		Meio MS
Fonte	Quantidade (g L <sup>-1</sup> )	Quantidade (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Macronutrientes</b>		
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,941	-
KNO <sub>3</sub>	0,100	1,900

KCl	0,475	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,144	-
MgSO <sub>4</sub>	0,625	-
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,133	-
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	440
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	1,650
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	170
<b>Micronutrientes</b>		
MnSO <sub>4</sub>	7,06 <sup>-03</sup> <sub>x10</sub>	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,92 <sup>-03</sup> <sub>x10</sub>	6,2
ZnSO <sub>4</sub>	4,3 <sup>-04</sup> <sub>x10</sub>	-
NH <sub>4</sub> /Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	2,12 <sup>-04</sup> <sub>x10</sub>	-
CuCl <sub>2</sub>	1,2 <sup>-04</sup> <sub>x10</sub>	-
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	-	22,3
ZnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	-	8,6
KI	-	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	0,25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	-	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	0,025
<b>FeEDTA</b>		
Quelato de Ferro	0,042	-
Na <sub>2</sub> Edta.2H <sub>2</sub> O	-	37,3
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	-	27,8
<b>Vitaminas e</b>		
<b>Aminoácidos</b>		
Ácido nicotínico		0,5
Piridoxina.HCl		0,5
Tiamina.HCl		0,1
Glicina		2,0
Mio-inositol		100
Sacarose		30,000
<b>Agente</b>		

---

**geleificante**

---

Ágar

---

O pH dos meios de cultivo foi aferido para  $5,8 \pm 0,02$ , sendo autoclavados a  $121^\circ\text{C}$  e  $1,5\text{atm}$ , por 20 minutos. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro sob intensidade luminosa de  $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , à temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Cada tratamento foi composto por cinco repetições com 26 sementes, totalizando 130 sementes por tratamento.

### **3) Avaliações**

As avaliações iniciaram-se aos quatro dias após a inoculação das sementes, quando da protusão das radículas. Após vinte e quatro dias da germinação *in vitro* das plântulas de alface Elba foram avaliadas as seguintes variáveis: Índice de velocidade de germinação (IVG), Tempo médio de germinação (TMG), porcentagem de germinação (%G), número de folhas (NF), número de raízes (NR), volume de raiz (VR), comprimento da parte aérea (CPA) e radicular (CPR), massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA) e radicular (MSPR).

#### **3.1) Determinação do Índice de Velocidade de Germinação, Tempo Médio de Germinação e porcentagem de germinação:**

Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2 mm de protusão radicular (BRASIL, 1992).

Germinação (G): calculada pela fórmula  $G = (N/50) \times 100$ , em que: N = número de sementes germinadas ao final do teste. Unidade: %. Os valores obtidos em porcentagem de germinação foram transformados em arco seno (Snedecor, 1962) e a comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey a 5%.

Índice de velocidade de germinação (IVG): A determinação do índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes foi realizada conforme Maguire (1962), sendo:  $IVE = E_1/N_1 + E_2/N_2 + \dots + E_n/N_n$ . Em que:  $E_1$ ,  $E_2$  e  $E_n$  - número de plântulas normais computadas na primeira, segunda e última contagem.  $N_1$ ,  $N_2$  e  $N_n$  - número de dias após a implantação do teste.

Tempo médio de germinação (TMG): calculado pela fórmula  $TMG = (\sum n_i t_i) / \sum n_i$ , onde:  $n_i$  = número de sementes germinadas por dia;  $t_i$  = tempo de incubação;  $i = 4$  a 24 dias. Unidade: dias.

### **3.2) Determinação do Número de Folhas e Raízes**

Para determinar o número de folhas e de raízes, foi contada a quantidade de folhas e raízes primárias e secundárias individualmente.

### **3.3) Determinação do comprimento da parte aérea e radicular da planta**

Para a determinação do comprimento da parte aérea, utilizou-se uma régua graduada, posicionada na base do hipocótilo até a altura da folha-bandeira. E para o comprimento da parte radicular, mediu o comprimento da base do hipocótilo até a maior raiz.

### **3.4) Determinação do volume de raízes**

O volume de raízes foi dado com auxílio de uma proveta com volume inicial de água conhecido. Imediatamente após a separação da parte aérea, as raízes foram completamente submersas na proveta, sendo considerado seu volume total o deslocamento da água na proveta.

### **3.5) Determinação da massa da matéria fresca**

As plantas de cada tratamento tiveram suas partes aérea e radicular separadas para a obtenção de massa de matéria fresca. As pesagens foram realizadas em balança analítica de precisão, marca Marte® modelo AY 220.

#### **4) Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância com delineamento inteiramente casualizado, formando um esquema fatorial de 2x2, sendo, meio de cultura (meio MS e com formulação comercial) e vitamina (com e sem vitamina), utilizando-se o programa estatístico Assistat versão 7.7 (Silva; Azevedo, 2009). As médias dos tratamentos e suas interações com diferenças significativas pelo teste F na análise de variância foram submetidas ao teste Tukey ao nível de significância de 5%.

## Resultados e Discussão

Os resultados demonstraram que as plântulas de *L. sativa* (cv. Elba), cultivadas em meio com formulação comercial apresentaram as maiores médias para todas as variáveis analisadas quando comparadas ao meio MS. Cavalini et al. (2014) ressaltam que o uso de fertilizantes comerciais tem se intensificado como forma de facilitação para o preparo de meios e redução de custos de produção em várias espécies vegetais, propiciando o desenvolvimento de plantas em larga escala e com menor custo.

Para a variável TMG, houve interação entre os fatores meio de cultivo e vitaminas, sendo que o tratamento 3, formulação comercial com vitaminas apresentou o menor TMG (4,24), conforme tabela 2.

**Tabela 2** - Comparação da interação meio de cultivo (A) x vitamina (B) sobre as médias do TMG no cultivo *in vitro* de *L. sativa*.

Fator meio de cultivo (A) x Fator vitamina (B)		
A	B	
	Com vitamina	Sem vitamina
Meio MS	4.96 aA	4.42 Aa
Formulação comercial	4.24 bA	4.56 Aa
CV(%)		8,0

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Krikorian (1991) salienta que o meio de cultivo com adição de vitaminas influencia diretamente no crescimento e desenvolvimento dos cultivos, devido às funções catalíticas desempenhadas pelas mesmas.

Para a variável IVG, não houve interação significativa, porém, ocorreu efeito significativo para o fator meio de cultivo e vitaminas, sendo que a formulação comercial obteve significativamente os maiores resultados (5,48) para o primeiro fator, enquanto, que os meios com suplementação de vitaminas apresentaram as melhores médias (5,54), conforme Tabela 3.

**Tabela 3** – Efeito do meio de cultivo e vitamina sobre as médias do índice de velocidade de germinação (IVG) no cultivo *in vitro* de *L. sativa*.

Médias do fator meio de cultivo	
Meio com formulação comercial	5,48 a
Meio MS	3,64 b
CV (%)	19,22
Médias do fator vitamina	
Com vitamina	5,54 a
Sem vitamina	3,57 b
CV (%)	19,22

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para a variável porcentagem de germinação (%G), houve efeito significativo em relação ao meio de cultivo e as vitaminas, porém, não houve interação entre os fatores. O meio de cultivo com formulação comercial obteve significativamente a maior média (69,31%), quando comparado com o MS, com 51,51%. Os meios de cultivo com adição de vitaminas obtiveram as maiores médias (Tabela 4).

**Tabela 4** – Efeito do meio de cultivo e vitamina sobre as médias da porcentagem de germinação no cultivo *in vitro* de *L. sativa*.

Médias do fator meio de cultivo	
Meio com formulação comercial	69,31a
Meio MS	51,51 b
Médias do fator vitamina	
Com vitamina	74,99 a
Sem vitamina	45,83 b
CV (%)	17,15

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com George (1993) ocorre um decréscimo considerável no potencial osmótico do meio quando são adicionados alguns componentes, principalmente macronutrientes. Provavelmente, a presença de maior concentração de sais no meio

de cultivo MS em relação ao meio com formulação comercial interferiu no potencial osmótico, dificultando o processo de embebição das sementes e conseqüentemente a sua germinação. Reis et al (2008), testando a influência de diferentes concentrações do meio de cultura MS na germinação *in vitro* de sementes de *Melissa officinalis* L. observaram que quanto maior a concentração de macronutrientes no meio, menor foi o IVG, corroborando com os resultados aqui apresentados.

Brasil (2002) ressalta que a fisiologia da germinação de sementes de *L. sativa* é bastante complexa, sendo alvo de estudos por várias décadas. Sua germinação é dependente de fatores como temperatura, água, oxigênio, luz, ausência de microrganismos e substrato. Os resultados demonstraram que a adição de vitaminas (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina e glicina), foi importante para a germinação *in vitro* das sementes de *L. sativa* L., com médias de 74,99%, ao contrário dos meios desprovidos de vitaminas, em que houve baixa germinação, com médias de 45,83%.

Figueiredo et al (2007), estudando variações no meio de cultura sobre o crescimento *in vitro* em híbridos de orquídea, obtiveram resultados diferentes para cada híbrido. No híbrido A, *LC. lisa ann "magnificent maroon" x (Cattleya chocolate drops kodama x BLC. hawaii galaxi x Golden tang)* o maior crescimento foi observado no meio em que houve acréscimo de vitaminas, glicina e mio-inositol. No híbrido B, *(BC. pastoral innocence x Cattleya loddigesii) x LC. Luminosa*, o melhor desenvolvimento foi no meio em que houve a ausência desses elementos e no híbrido C, *BLC. Arrow gold x Pot. red crab* e D, *Cattleya loddigesii*, os autores observaram os menores resultados independentemente do meio utilizado e da adição de vitaminas.

Caldas, Haridasan e Ferreira (1998) salientam que as pesquisas envolvendo diferentes vitaminas parecem ser específicas para cada espécie, dependendo também do tipo de explante, estando seu efeito benéfico relacionado à capacidade de biossíntese de cada um nos tecidos ou órgãos cultivados.

Para melhor visualização deste resultado, a figura 1 mostra os valores de IVG, TMG e porcentagem de germinação para os quatro tratamentos.



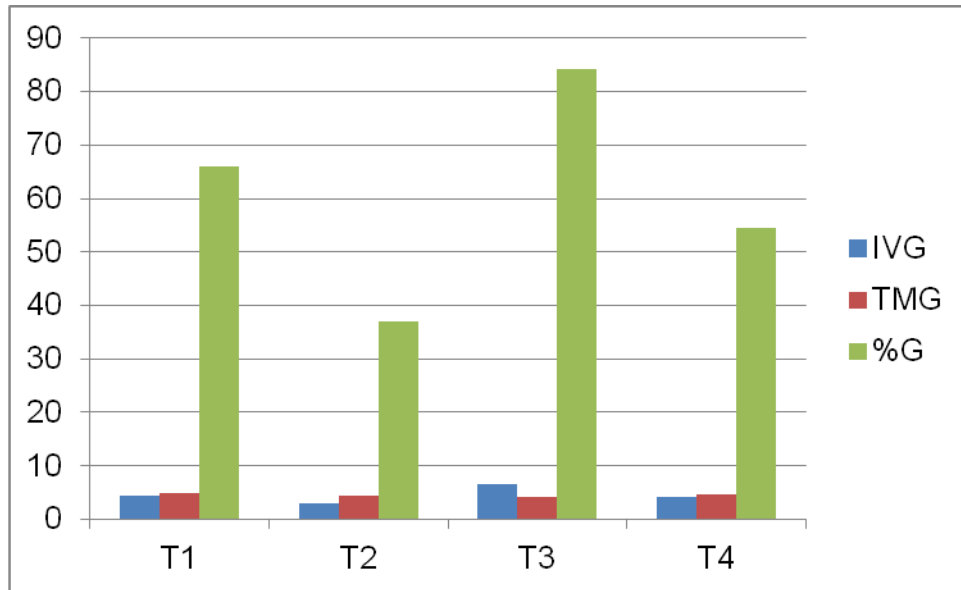


Figura 1: Porcentagem de germinação (%G), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Tempo Médio de Germinação (TMG) de *L. sativa* (cv.Elba) em diferentes meios de cultivo. São Mateus-ES, 2016.

A análise de variância (Apêndice Tabela 1A) mostra que para a variável, número de folhas (NF), houve efeito significativo em relação ao meio de cultivo e as vitaminas. Os meios de cultivo com formulação comercial proporcionaram maior incremento de folhas às plântulas (8,08) em relação às cultivadas em meio de cultivo MS (5,64). Nos meios de cultivo em que não houve suplementação com vitaminas, foram observados as melhores médias de NF (7,36), conforme Tabela 5.

**Tabela 5** – Efeito do meio de cultivo e vitamina sobre as médias do número de folhas no cultivo *in vitro* de *L. sativa*.

Médias do fator meio de cultivo	
Meio com formulação comercial	8,0816 a
Meio MS	5,6402 b
Médias do fator vitamina	
Sem vitamina	7,3576 a
Com vitamina	6,3643 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Estes resultados diferem dos encontrados por Pereira (2014), que estudando fontes alternativas de minerais e sacarose na micropropagação de bananeira (cv. Williams) não obteve efeito significativo para as fontes de sais minerais, porém, salienta que embora os produtos comerciais tenham ocasionado redução na área foliar, não causaram prejuízo no crescimento das plantas. Entretanto, para o fator vitamina, Villas et al. (2014), estudando a micropropagação de híbridos de orquídea em meio Knudson com adição de vitaminas do meio MS, benzilaminopurina e carvão ativado, observaram que o aumento gradativo das concentrações das vitaminas MS reduziu a emissão de novas folhas, inferindo que tais vitaminas não são necessárias para promover número de folhas para o híbrido de orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow*.

Para a variável número de raízes (NR) houve efeito significativo em relação ao meio de cultivo e as vitaminas e interação significativa entre meio de cultivo x vitamina. Para o fator meio de cultivo, a formulação comercial apresentou as maiores médias (20,58), enquanto que para vitaminas, os meios em que não houve suplementação obtiveram os maiores resultados (16,24 raízes), conforme tabela 6. O maior NF desenvolveu-se no tratamento 4, meio de cultivo com formulação comercial com a ausência de vitaminas, que obteve médias de 27,53 raízes por plântula (Tabela 7).

**Tabela 6** – Efeito do meio de cultivo e vitamina sobre as médias do número de raízes no cultivo *in vitro* de *L. sativa*.

Médias do fator Meio de Cultivo	
Meio com formulação comercial	20,5804 a
Meio MS	3,7093 b
Médias do fator vitamina	
Sem vitamina	16,2412 a
Com vitamina	8,0484 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 7** - Comparação da interação fator meio de cultivo (A) x vitamina (B) sobre as médias do número de raízes no cultivo *in vitro* de *L. sativa* (cv.Elba).

Fator meio de cultivo (A) x Fator vitamina (B)
--

A	B	
	Com vitamina	Sem vitamina
Meio MS	2,4720 Ba	4,9466 Ba
Formulação comercial	13,6249 aB	27,5359 Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Unemoto et al. (2007), estudando a propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado, observaram que para esta mesma variável, as plantas cultivadas em meio à base de adubo NPK (6-6-8) apresentaram médias superiores em relação às plantas cultivadas em meio MS, corroborando com o resultado apresentado no presente trabalho. Rego-Oliveira e Faria (2005) ao avaliarem o crescimento de *Catasetum fimbriatum* (E. Morren) Lindl. & Paxton empregando diferentes meios de cultivo, entre eles Knudson C e a formulação NPK 10-30-20, verificaram que o NR foi significativamente maior com a formulação 10-30-20. Resultados antagônicos no que se refere ao fator vitamina foram encontrados por Villa et al. (2014), em que houve maior número de raízes de plântulas de orquídea *BC Pastoral* x *LC Amber Glow* cultivadas em variações do meio Knudson, à medida em que se aumentaram as concentrações de vitaminas MS do meio Knudson.

Em relação à variável comprimento da parte aérea (CPA), houve efeito significativo para o fator meio de cultivo (Tabela 8) e interação significativa entre os fatores, sendo as maiores médias obtidas no meio com formulação comercial, com ou sem vitaminas (4,72 e 4,16 cm, respectivamente), em relação ao meio MS (Tabela 9).

**Tabela 8** – Efeito do meio de cultivo sobre as médias do comprimento da parte aérea (cm) no cultivo *in vitro* de *L. sativa*.

Médias do fator Meio de Cultivo	
Meio com formulação comercial	4,4412 a
Meio MS	2,8774 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 9** - Comparação da interação fator meio de cultivo (A) x vitamina (B) sobre as médias do comprimento da parte aérea (cm) no cultivo *in vitro* de *L. sativa*.

Fator meio de cultivo (A) x Fator vitamina (B)		
A	B	
	Com vitamina	Sem vitamina
Meio MS	2.6169 bA	3.1380 Ba
Formulação comercial	4.7246 aA	4.1578 Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Resultados semelhantes foram encontrados por Moraes et al. (2009) analisando o desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley na presença de fertilizantes comerciais. Os autores mostraram que as plantas cultivadas em meio suplementado com o fertilizante Kristalon laranja apresentaram as maiores médias (6,05 cm), quando comparados aos meios MS (2,92 cm).

Para a variável comprimento radicular (CR) houve efeito significativo para o fator meio de cultivo e vitamina e interação significativa entre os mesmos. A formulação comercial obteve as maiores médias (7,47 cm) para o primeiro fator, enquanto que o meio com a presença de vitaminas apresentou médias superiores aos meios em que não houve suplementação (6,78 cm), conforme Tabela 10. Para a interação significativa os maiores valores foram encontrados no meio de cultivo com formulação comercial na presença de vitaminas, no qual obteve médias de 8,83 cm (Tabela 11).

**Tabela 10** – Efeito do meio de cultivo e vitamina sobre as médias do comprimento da parte radicular (cm) no cultivo *in vitro* de *L. sativa*

Médias do fator Meio de Cultivo	
Meio com formulação comercial	7,4687 a
Meio MS	5,0602 b

Médias do fator vitamina	
Com vitamina	6,7776 a
Sem vitamina	5,7513 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 11** - Comparação da interação fator meio de cultivo (A) x vitamina (B) sobre as médias do comprimento da parte radicular (cm) no cultivo *in vitro* de *L. sativa*

Fator meio de cultivo (A) x Fator vitamina (B)		
A	B	
	Com vitamina	Sem vitamina
Meio MS	4,7220 bA	5,3985 aA
Formulação comercial	8,8333 aA	6,1041 aB

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

A formulação comercial associado à vitamina MS apresentou os melhores resultados. Oliveira e Faria (2005) comparando o cultivo *in vitro* de *C. fimbriatum* e *Cyrtopodium paranaenses* nos meios nutritivos MS, Knudson C, Vacin e Went e meios à base de adubos NPK (10-5-5) e NPK (10-30-20) na concentração de 3,0 g.L<sup>-1</sup>, obtiveram as melhores médias para comprimento da maior raiz (8,04 cm) quando utilizaram o meio à base do adubo NPK (10-5-5), quando comparado ao meio MS (5,00 cm). Ainda, Moraes et al. (2009) observaram que o desenvolvimento radicular de *C. loddigesii*, em meio suplementado com o fertilizante Kristalon laranja apresentaram as maiores médias (3,99 cm), quando comparados aos meios MS (3,09 cm). Da mesma forma, Villa et al. (2014) observaram um maior valor de CR das plântulas de orquídea BC Pastoral x LC Amber Glow cultivadas em variações do meio Knudson, acrescido de aumento gradativo de vitaminas MS. Com isso, é possível inferir que as vitaminas do meio MS influenciaram como catalisadores metabólicos no crescimento de órgãos, confirmando sua função de estimular o crescimento geral das plântulas (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

Analisando a variável matéria fresca da parte aérea (MFPA), houve efeito significativo em relação ao meio de cultivo e as vitaminas. Os meios com formulação comercial proporcionaram maior produção de matéria fresca às plântulas (0,1707 g) em relação às cultivadas em meio de cultivo MS (0,0905 g). Os meios de cultivo em que não houve suplementação com vitaminas, apresentaram as melhores médias (0,1566 g), conforme Tabela 12.

**Tabela 12** – Efeito do fator meio de cultivo e vitamina sobre as médias da massa da matéria fresca da parte aérea no cultivo *in vitro* de *L. sativa*.

Médias do fator meio de cultivo	
Meio com formulação comercial	0,1707 a
Meio MS	0,0905 b
Médias do fator vitamina	
Sem vitamina	0,1566 a
Com vitamina	0,1046 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para a variável massa de matéria fresca da parte radicular (MFPR), os fatores meio de cultivo e vitamina apresentaram significância, e ainda, houve interação significativa entre os mesmos. Para o fator meio de cultivo, a formulação comercial apresentou as maiores médias (0,0405 g), enquanto, que o meio em que não houve adição de vitaminas, apresentou a melhor média, com 0,0366 gramas para o segundo fator (Tabela 13). As melhores médias para esta variável foram obtidas no tratamento constituído de formulação comercial sem vitaminas com 0,0634 gramas, (Tabela 14).

**Tabela 13** – Efeito do fator meio de cultivo e vitamina sobre as médias da massa da matéria fresca da parte radicular no cultivo *in vitro* de *L. sativa*.

Médias do fator meio de cultivo	
Meio com formulação comercial	0,0405 a
Meio MS	0,0090 b
Médias do fator vitamina	

Sem vitamina	0,0366 a
Com vitamina	0,0128 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 14** - Comparação da interação fator meio de cultivo (A) x vitamina (B) sobre as médias da massa da matéria fresca da parte radicular no cultivo *in vitro* de *L. sativa*

Fator meio de cultivo (A) x Fator vitamina (B)		
A	B	
	Com vitamina	Sem vitamina
Meio MS	0,0081 aA	0,0100 bA
Formulação comercial	0,0176 aB	0,0634 aA

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Os valores médios observados para as variáveis são similares aos obtidos para *C. loddigesii* (Pedroso-de-Moraes et al. 2009), no qual o meio de cultivo a base de fertilizante Kristalon laranja apresentou as maiores médias para a variável massa fresca. Hermann et al. (2011), estudando o cultivo *in vitro* de plântulas de orquídeas em meio de cultura alternativo, observaram que o meio alternativo apresentou resultados superiores aos meios MS e Knudson C para a massa fresca das plântulas. Silva (2003) em estudo de propagação *in vitro* de *Cattleya tigrina* A.Rich., também obteve melhores resultados utilizando um meio de cultivo com fertilizante comercial Dyna-Gro® 7-9-5, tomate e água de coco, comparando-o com o meio MS, obtendo resultados similares ao do presente estudo.

De acordo com os dados obtidos para a germinação e desenvolvimento *in vitro* de *L. sativa* (cv. Elba), é possível afirmar que o meio constituído de formulação comercial apresentou resultados superiores ao meio MS para todas as variáveis analisadas, podendo substituir satisfatoriamente, o meio MS para a propagação dessa espécie. O meio com formulação comercial utiliza componentes de fácil acesso, com custo reduzido e não utilizam reagentes que tem a sua compra controlada, como o

nitrate de amônia e o nitrate de potássio, necessários para o preparo da solução estoque do meio MS.

Embora, tenha havido resultados satisfatórios para o desenvolvimento de *L. sativa*, poucos são os estudos que envolvem a nutrição mineral de plantas no cultivo *in vitro*, dificultando a comparação com outros trabalhos desenvolvidos.

## **Conclusões**

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que:

- I. Os adubos comerciais como base para o preparo de meios para o cultivo *in vitro* de *L. sativa* L influenciou em todas as variáveis analisadas, podendo utilizá-los em substituição aos sais PA.
- II. A presença de vitamina ao meio de cultivo influenciou nos valores de TMG, IVG, %G, NF, NR, CPR e não houve diferença estatística para CPA.
- III. A ausência de vitaminas ao meio de cultivo influenciou nos valores de NR, MFPA e MFPR.
- IV. O meio de cultura constituído de formulação comercial demonstrou ser o mais eficaz no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Lactuca sativa* L. (cv. Elba), podendo ser utilizado por apresentar maior facilidade e baixo custo de produção em relação ao meio MS.



## Referências bibliográficas

BERNARDI, W.F., RODRIGUES, B.I., NETO, P.C., ANDO, A., NETO, A.T., CERAVOLO, L.C., MONTES, S.M.N.M. Micropropagação de baixo custo em bananeira cv. Maçã em meios com diferentes fontes de carbono e avaliação da performance em campo das mudas produzidas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26 (3): 503-506, (2004).

BORGES, A.L., SILVA, A.L., BATISTA, D.C., MOREIRA, F.R.B., FLORI, J.E., OLIVEIRA, J.E.M., ARAÚJO, J.L.P., PINTO, J.M., CASTRO, J.M.C., MOURA, M.S.B., AZOUBEL, P.M., CUNHA, T.J.F., SILVA, S.O., CORDEIRO, Z.J.M. Sistema de Produção da Bananeira Irrigada, Sistemas de Produção – Embrapa. 2009. Disponível em:

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananeiraIrrigada/plantio.htm>. Acessado em 31/09/2015.

BRASIL. Decreto Nº 3665 de 20 de novembro de 2000. Dá nova redação ao Regulamento para a Fiscalização de Produtos Controlados (R-105). Disponível em: [http://www.5csm.eb.mil.br/5CSM\\_Internet/sfpc/r105.htm](http://www.5csm.eb.mil.br/5CSM_Internet/sfpc/r105.htm). Acesso em: 28 ago. 2015.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, v.1, 864 p., 1998.

CAVALINI S.C.G.; GIANINI, P.F.; PEDROSO-DE-MORAES, C. Crescimento in vitro de *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) em meios de cultivo simplificados. *Natureza on line* 12 (2): 75-78, 2014.

CHAPLA, P. I. et al. PH, carvão ativado e agentes geleificantes do meio de cultura no crescimento in vitro de *Miltonia flavescens* Lindl. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, v. 5, n. 2, p. 87-93, 2009.

EMBRAPA, Germinação de Sementes de Alface. Circular técnica. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2002.

FERNANDES, A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, P.R.G.; FONSECA, M.C.M. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em

hidroponia, em função de fontes de nutrientes. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, p. 195-200, junho 2002.

FIGUEIREDO, M.A.; SANTOS, F.M.; SILVA, J.O.C.; COSTA, F.H.S.; PASQUAL, M. Variações no Meio de Cultura sobre o Crescimento in vitro em Híbridos de Orquídea. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 294-296, jul. 2007.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003.

GANTAIT, S.; MANDAL, N.; DAS, P. K. Impact of auxins and activated charcoal on in vitro rooting of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. cv Golden Boy. *Journal of Tropical Agriculture*, v. 47, p. 84-86, 2009.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. Factors affecting growth and morphogenesis. In: GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. (Ed.). *Plant propagation by tissue culture*. London: Exegetics, 1984. cap. 5, p. 125- 171.

GEORGE, E.F. *Plant propagation by tissue culture. Part 1: The Technology*. 2a ed. Basingstoke, Exegetics Limited. 510p., 1993.

HERMANN, M. H.; FREITAS, E.M.; PÉRICO, E. Cultivo in vitro de plântulas de orquídea em meio de cultura alternativo. *R. Bras. Agrobiologia*, Pelotas, v.17, n.1-4, p.162-166, 2011.

KOZAY, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 51, p. 49-56, 1997.

KRIKORIAN, A.D. Meios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, p.41-77, 1991.

LOPES, J. C. et al. Produção de alface com doses de lodo de esgoto. *Horticultura Brasileira*, v. 23, n. 1, p. 143-147, 2005.

MERCIER, H.; NIEVOLA, G.B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: Bajaj YPS (Ed.) Biotechnology in agriculture and Forest. 40: High tech and micropropagation VI. Berlin, Springer-Verlag. p. 43-57, 2003.

MORAES, C.F.; SUZIN, M.; NIENOW, A.A.; GRANDO, M.F.; MANTOVANI, N.; CALVETE, E.O.; DONIDA, B.T. Germinação *in vitro* de sementes de alcachofra. Horticultura Brasileira 28: 64-69, 2010.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F.A. A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497, 1962.

NAKAYAMA, L.H.I. Alternativas para propagação das mudas sadias de bananeiras (Musa spp.). Folha Técnica Nº 6, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Belém – PA, 2 p., 2012.

OLIVEIRA, R.L.; FARIA, R.T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. Acta Scientiarum, v. 27, p. 1-5, 2005.

PACEK-BIENIEK, A.; DYDUCH-SIEMIŃSKA, M.; RUDAŚ, M. Influence of activated charcoal on seed germination and seedling development by the asymbiotic method in *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf. (Orchidaceae). Folia Horticulturae, v. 22, n.2, p. 45-50, 2010.

PEDROSO DE MORAES, C. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. Revista Brasileira de Biociências, v. 7, p. 67-69, 2009a.

PEDROSO-DE-MORAES C.; SANTAMBROSIO, N.S.; MASSARO, R; CORDEIRO, G.M.; SOUZA-LEAL, T. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. Ensaios e Ciência 13: 57-65, (2009b).

PEREIRA, M.R. Fontes alternativas de minerais e sacarose na micropropagação da bananeira cv. Williams. Dissertação. Campo dos Goytacazes – RJ. 2014.

PINHEIRO, M.V.M.; MAIA, T.C.R.S.C.; LIMA, B.V.; MOTOIKE, S.Y. Propagação *in vitro* de genótipos de alface via embriogênese somática. Ciência Rural, v.42, n.11, nov, 2012.

PRAKASH, S.; HOQUE, M.I.; BRINKS, T. Culture media and containers. In: Technical meeting of low costs options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings, IAEA: FAO, p. 29-40, 2004.

REGO-OLIVEIRA L.V.; FARIA, R.T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and comercial fertilizers formulations. Acta Scientiarum: Agronomy, 27:1-5. 2005.

REGO-OLIVEIRA, L.; FARIA, R. T.; FONSECA, I.C.B.; Saconato, C. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl.(Orchidaceae). Semina, v. 24, n. 2, p. 265-272, 2003.

REIS, E.S.; PINTO, J.E.B.P.; ROSADO, L.D.S.; CORRÊA, R.M. 2008. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. 55(3): 160- 167, Revista CERES, 2008.

SILVA, A.L.L. Avaliação de uma receita para o cultivo de orquídeas *in vitro*. Orquidário, Rio de Janeiro, v.17, n.1, p. 28-30, 2003.

SILVA, F. A. S. E; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal components analysis in the software assistat-statistical assistance. In: 7th World Congress on Computers in Agriculture, Reno. Proceedings of the 7th World Congress on Computers in Agriculture. St. Joseph: ASABE, v. CD-Rom. p.1-5, 2009.

SNEDECOR, G.W. Statistical methods. Ames, Iowa State University Press, 422p., 1962.

SOARES, J.S.; ROSA, Y.B.C.J.; MACEDO, M.C; SORGATO, J.C.; ROSA, D.B.C.J.; ROSA, B.C.J. Cultivo *in vitro* de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado Magistra, Cruz das Almas-BA, v. 24, n. 3, p. 226-233, jul./set. 2012.

SOUZA, A.S.; CORDEIRO, Z.J.M.; TRINDADE, A.V. Produção de mudas. In: Cordeiro, Z.J.M. (org.) Banana Produção: aspectos técnicos. Brasília: Embrapa, p. 39-46, (2000).

SOUZA, H.U.; SILVA, C.R.R.; CARVALHO, J.G.; MENEGUCCI, J.L.P. Nutrição de mudas de bananeira em função de substratos e doses de superfosfato simples. *Ciência Agrotécnica*, 24 (Edição especial): 64-73, (2000).

SOUZA, S.A.M. Biotestes na Avaliação da Fitotoxicidade de Extratos Aquosos de Plantas Medicinais Nativas do Rio Grande do Sul. Monografia de conclusão de curso. Universidade Federal de Pelotas – RS, 2005.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 640p, 2005.

UNEMOTO, L.K. Propagação in vitro de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 13, p. 267-269, 2007.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; SILVA, E.F. Micropropagação de híbridos de orquídea em meio knudson com adição de vitaminas do meio ms, benzilaminopurina e carvão ativado. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 35, n. 2, p. 683-694, mar./abr. 2014.

## APÊNDICE

Tabela 1A: Resumo da análise de variância para as variáveis N<sup>o</sup> de folhas (NF), N<sup>o</sup> de raiz (NR), Comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da parte radicular (CPR), Peso da massa fresca da parte aérea (MFPA), Peso da massa fresca da parte radicular (MFPR), São Mateus – ES, 2016.

FV	GL	Quadrado Médio					
		NF	NR	CPA (cm)	CPR(cm)	MFPA(g)	MFPR(g)
<b>Fator 1: Meio de cultivo</b>	1	29.80209	1423.16652	12.22687	29.00264	0.03220	0.00495
<b>Fator 2: Vitamina</b>	1	4.93233	335.61169	0.00262	5.26698	0.01350	0.00283
<b>Int. F1x F2</b>	1	0.53020	163.48790	1.47942	14.49765	0.00197	0.00241
<b>Tratamentos</b>	3	11.75487	640.75537	4.56963	16.25576	0.01589	0.00340
<b>Resíduo</b>	16	0.23759	15.96458	0.18760	0.49912	0.00094	0.00030
<b>Total</b>	19						
<b>F1</b>		125.4338 **	89.1453 **	65.1758 **	58.1070 **	34.3573 **	16.5200 **
<b>F2</b>		20.7596 **	21.0223 **	0.0140 ns	10.5524 **	14.3999 **	9.4540 **
<b>F1x F2</b>		2.2316 ns	10.2407 **	7.8861 *	29.0462 **	2.1073 ns	8.0570 *
<b>CV (%)</b>		7.10	32.90	11.84	11.28	23.43	69.86

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

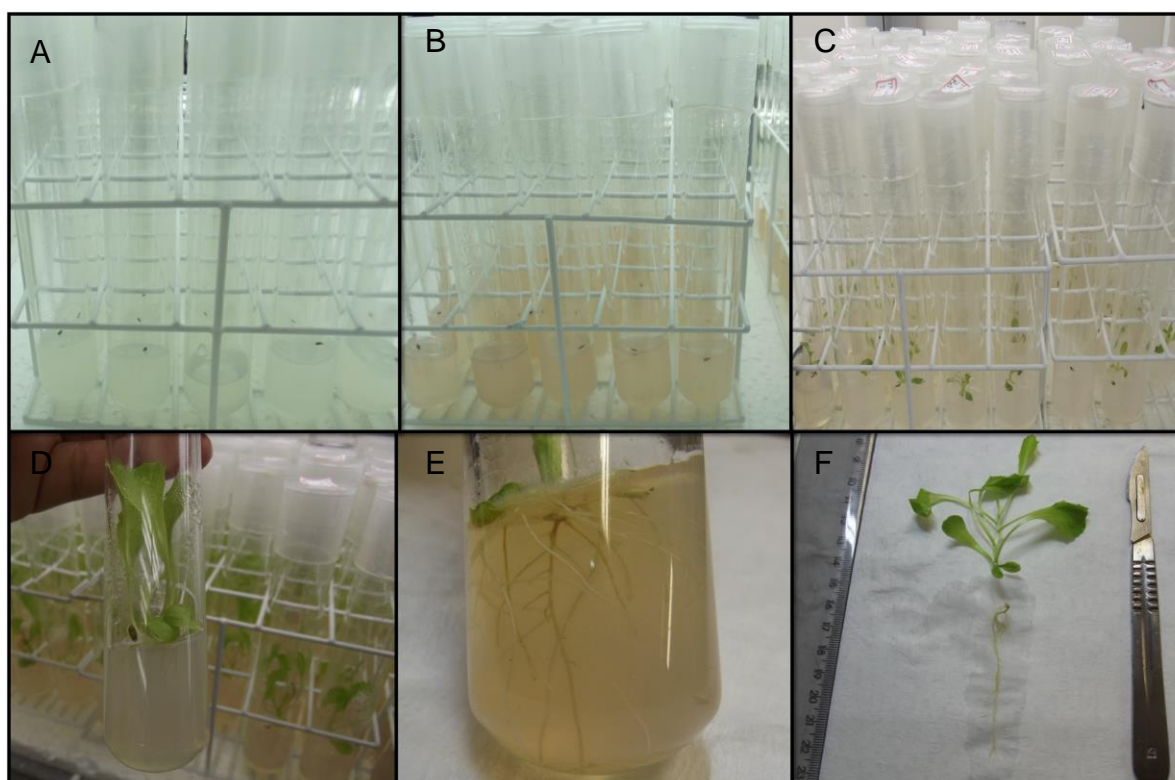


Figura 1A: Desenvolvimento *in vitro* de sementes de *Lactuca sativa* L. (cv. Elba) em diferentes meios de cultura. A – Meio MS. B – Meio com formulação comercial. C – Sementes germinadas. D e E – Desenvolvimento da parte aérea e radicular. F – Plântulas de alface retirada do tubo de ensaio ao final do experimento.

### 3.2 DESENVOLVIMENTO DE *LACTUCA SATIVA* (CV. ELBA) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO MEIO MS E FORMULAÇÃO COMERCIAL

#### Resumo

Para a técnica de cultura de tecidos vegetais são utilizados meios nutritivos que fornecem as substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* das plantas. O mais empregado é o meio MS, que contém reagentes puros em sua formulação, ocasionando elevados custos para a produção *in vitro* das espécies. Objetivou-se avaliar o cultivo *in vitro* de *Lactuca sativa*, em diferentes concentrações do meio MS e do meio com formulação comercial, ambos com ausência de vitaminas MS. Utilizou-se sementes comerciais, que após desinfestadas, foram inoculadas em tubos de ensaio com 10 ml de meio de cultura contendo meio MS e formulação comercial nas seguintes concentrações (20%, 40%, 60%, 80% e 100%). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, montado em esquema fatorial 2 X 5, com 5 repetições. As variáveis analisadas foram %G, nº de folhas e raízes, comprimento aéreo e radicular, volume de raiz, massa da matéria fresca da parte aérea e radicular. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico GENES (CRUZ, 2001), e os efeitos do fator quantitativo submetidos à análise de regressão.

Palavras-chave: propagação, alface, meio simplificado.



## Introdução

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma importante olerícola folhosa consumida em várias partes do mundo (BRASIL, 2002). Os principais países produtores são China, Estados Unidos da América (EUA), Espanha, Itália, Índia, Japão e Turquia (FAOSTAT, 2011). No Brasil, lidera a oitava posição entre as hortaliças (FELTRIM et al., 2009).

Esta hortaliça geralmente utilizada em estudos científicos como planta teste, devido à sensibilidade da espécie, rápida germinação, sensibilidade à adubação orgânica e crescimento linear insensível às diferenças de pH (NAKAGAWA et al., 1992; SOUZA, 2005). Pode ser propagada através de sementes (BRASIL, 2002) ou *in vitro* utilizando principalmente folhas cotiledonares, oriundas de plantas germinadas *in vitro* (PINHEIRO et al., 2012).

O emprego da biotecnologia para a (*Lactuca sativa* L.) requer um método de cultura de tecidos viável e eficiente (MOHEBODINI et al., 2011). Os programas de melhoramento genético da alface no Brasil visam a resistência à diversas doenças limitantes à produção, como as viroses, tolerância ao calor (ausência de pendoamento precoce), folhas com textura firme (CASALE, 1996) a propagação *in vitro* em larga escala, representando uma solução para os problemas da propagação tradicional que levam a transmissão de doenças (KARIM e AHMED, 2010).

Os meios de cultivos comumente utilizados para a sua micropropagação, tem sido o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), como descritos nos trabalhos de XINRUN e CONNER, (1992); ZHOU et al. (1992); STUART e MCCALL (1992) AMPOMAH-DWAMENA et al., (1997); SEABROOK e DOUGLASS (2000); HUNTER e BURRITT, (2002); KANAMOTO et al., (2006); NOLAN et al. (2009); FRANKLIN et al., (2011); MOHEBODINI et al., (2011); PINHEIRO et al., (2012). Entretanto, este meio tem custos elevados por utilizar em sua formulação, reagentes puros para análise (PA).

Estudos *in vitro* realizados por STANCATO, BEMELMANS E VEGRO (2001), PEDROSO-DE-MORAES et al. (2009), CHAPLA et al., (2009), GANTAIT et al., (2009); MOREIRA et al, (2009), PACEK-BIENIEK et al., (2010), SOARES et al., (2012); PINHEIRO et al., (2012), PEREIRA, (2014), SASAMORI et al., (2015) demonstram que através da simplificação dos meios de cultura atuais, utilizando, principalmente, fertilizantes como base destes meios de cultura é possível, além de diminuir os custos, garantir resultados satisfatórios para a produção de mudas.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar o desenvolvimento de *Lactuca sativa* L. (cv. Elba) em diferentes concentrações do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e de uma formulação comercial.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES/UFES), no município de São Mateus-ES.

### 1) Assepsia das sementes

Sementes comerciais de *Lactuca sativa* (cv. Elba) com 99% de pureza e taxa de germinação de 85% foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar com álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio (NaOH) a 1% por 5 minutos em agitação, lavadas por três vezes em água destilada autoclavada e secas em papel filtro autoclavado.

### 2) Condução do Experimento

Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio com 10 ml contendo meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) e formulação comercial (Fernandes et al., 2002 adaptada), nas seguintes concentrações (20, 40, 60, 80 e 100%), acrescida de sacarose como fonte de carbono a 3% e ágar a 8% para solidificação, ambos sem presença de vitamina MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962).

Para efeito de comparação, a tabela 1 mostra a formulação básica do meio MS e da Formulação de Fernandes *et al.* (2002) adaptada.

Tabela 1 – Composição dos meios com formulação comercial (Fernandes *et al.* 2002) adaptada e MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) para propagação *in vitro* de *L. sativa* (cv. Elba).

Formulação Comercial		Meio MS
Fonte	Quantidade (g L <sup>-1</sup> )	Quantidade (mg L <sup>-1</sup> )
Macronutrientes		
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>(**)</sup>	0,941	-
KNO <sub>3</sub> <sup>(*)</sup>	0,100	1,900
KCl <sup>(*)</sup>	0,475	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>(*)</sup>	0,144	-

MgSO <sub>4</sub> <sup>(*)</sup>	0,625	-	(*) Prod uto come rcial
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>(*)</sup>	0,133	-	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	440	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	1,650	(**) Prod uto PA
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	370	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	170	
Micronutrientes			O
MnSO <sub>4</sub> <sup>(**)</sup>	7,06 <sup>-03</sup> <sub>x10</sub>	-	pH
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> <sup>(**)</sup>	2,92 <sup>-03</sup> <sub>x10</sub>	6,2	dos
ZnSO <sub>4</sub> <sup>(**)</sup>	4,3 <sup>-04</sup> <sub>x10</sub>	-	mei
NH <sub>4</sub> /Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O <sup>(**)</sup>	2,12 <sup>-04</sup> <sub>x10</sub>	-	os
			foi
CuCl <sub>2</sub> <sup>(**)</sup>	1,2 <sup>-04</sup> <sub>x10</sub>	-	aferi
			do
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	-	22,3	para
ZnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	-	8,6	5,8±
KI	-	0,83	0,02
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	0,25	,
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	-	0,025	sen
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	0,025	do
FeEDTA			auto
Quelato de Ferro <sup>(*)</sup>	0,042	-	clav
			ado
Na <sub>2</sub> Edta.2H <sub>2</sub> O	-	37,3	s a
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	-	27,8	121°

C e

1,5atm, por 20 minutos. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro sob intensidade luminosa de 25 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, à temperatura de 26 ± 1 °C. Cada tratamento foi composto por 4 repetições, com 12 tubos de ensaio por parcela, sendo que cada tubo, continha uma semente.

### 3) Avaliações

As avaliações iniciaram-se aos quatro dias após a inoculação das sementes, quando da protusão das radículas. Após vinte e quatro dias da germinação *in vitro*, foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de germinação (%G), número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento da parte aérea (CPA) e radicular (CPR), massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA) e radicular (MSPR), volume de raiz (VR), fluorescência da clorofila a e do índice fotossintético.

### **3.1) Determinação da porcentagem de germinação:**

Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2 mm de protusão radicular (BRASIL, 1992).

Germinação (G): calculada pela fórmula  $G = (N/48) \times 100$ , em que: N = número de sementes germinadas ao final do teste. Unidade: %.

Os valores obtidos em porcentagem de germinação foram transformados em arco seno (Snedecor, 1962) e a comparação entre as médias foi feita pelo teste de Tukey a 5%.

### **3.2) Determinação do Número de Folhas e Raízes**

Para determinar o número de folhas e de raízes, foi contada a quantidade de folhas e raízes primárias e secundárias individualmente.

### **3.3) Determinação do comprimento da parte aérea e radicular das plântulas**

Para a determinação do comprimento da parte aérea utilizou-se uma régua graduada, posicionada na base do hipocótilo até a altura da folha. Para o comprimento da parte radicular, mediu-se o comprimento da base do hipocótilo até a maior raiz.

### **3.4) Determinação da massa da matéria fresca**

As plântulas de cada tratamento foram divididas em sistema radicular e parte aérea, sendo pesagem em balança analítica de precisão, marca Marte® modelo AY 220, para obtenção de massa de matéria fresca.

### **3.5) Determinação do volume da raiz**

O volume da raiz foi dado com auxílio de uma proveta com volume inicial de água conhecido. Imediatamente após a separação da parte aérea, as raízes foram completamente submersas na proveta, sendo considerado seu volume total o deslocamento da água na proveta.

### **3.6) Determinação da fluorescência da clorofila a e do índice fotossintético**

A fluorescência da clorofila a e o índice fotossintético (PI) foram determinados por meio de um medidor portátil de clorofila (clorofilômetro) da marca Minolta SPAD-502, que realiza leituras instantâneas. Os resultados estão apresentados em unidade SPAD. Foi amostrada a folha totalmente desenvolvida, sendo utilizadas cinco plântulas por tratamento.

## **4) Análise estatística**

Os dados de todas as variáveis foram avaliados segundo análise de variância com delineamento inteiramente casualizado, formando um esquema fatorial de 2x5, sendo, meio de cultura (meio MS e com formulação comercial) e concentrações (100%, 80%, 60%, 40%, 20%), utilizando-se o programa estatístico GENES (CRUZ, 2001). Os efeitos do fator quantitativo (concentração) foram submetidos à análise de regressão.

## Resultados e Discussão

De acordo com a análise de variância houve interação significativa entre os fatores meio de cultivo e concentrações de sais em todas as variáveis analisadas, exceto germinação (Anova em anexo).

Houve efeito significativo para o fator meio de cultivo nas variáveis germinação (%G), nº de folhas (NF) e raízes (NR), massa de matéria fresca da parte aérea (MFPA) e radicular (MFPR).

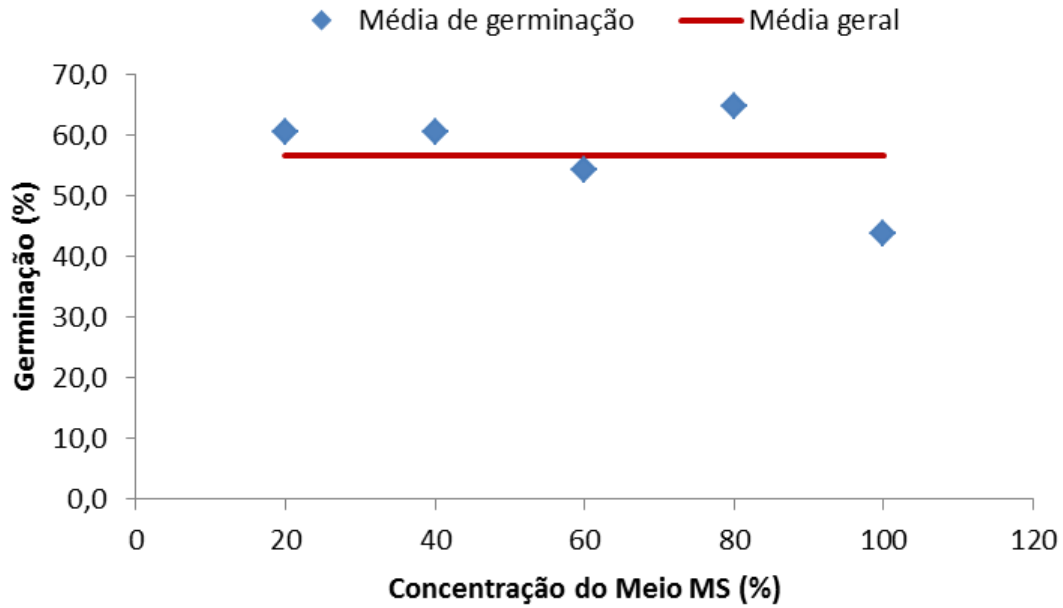
Para a variável **porcentagem de germinação** (%G), o meio com formulação comercial apresentou os maiores resultados, com 96,67% em relação ao meio MS com 56,67% (Tabela 2). Reis et al. (2008) afirmam que o meio de cultivo com maior concentração de sais interfere no potencial osmótico e, conseqüentemente, na disponibilidade de água para o processo de embebição da semente na germinação. Dessa maneira, a maior concentração de sais do meio MS provavelmente causou efeitos negativos na germinação de *L. sativa* quando comparado ao meio com formulação comercial.

**TABELA 2** – Efeito do meio de cultivo sobre as médias da porcentagem de germinação no cultivo *in vitro* de *L. sativa*.

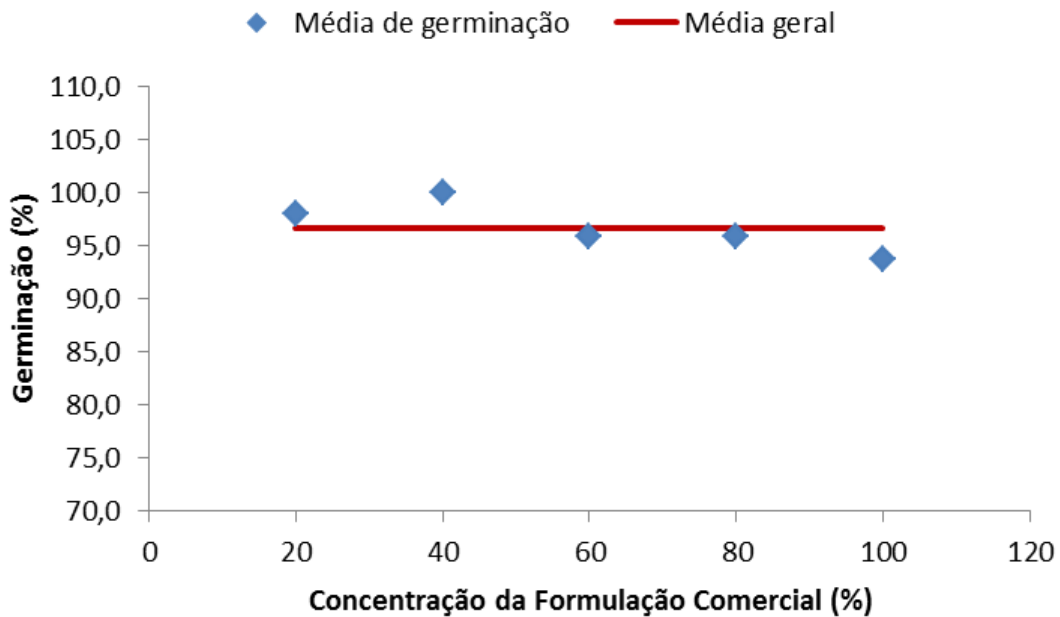
Médias do fator meio de cultivo	
Meio com formulação comercial	96.6667 a
Meio MS	56.6667 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Como não houve efeito para essa variável no fator concentração dos meios de cultivo e interação entre os fatores, pode ser observada, a dispersão de suas médias em torno da média geral de germinação para o meio MS e Formulação Comercial, nas Figuras 1e 2, respectivamente.



**FIGURA 1:** Porcentagem de germinação de *L. sativa* em função do efeito das concentrações do Meio de Cultivo MS.



**FIGURA 2:** Porcentagem de germinação de *L. sativa* em função do efeito das concentrações do Meio de Cultivo com formulação comercial. CEUNES/UFES. São Mateus, ES.



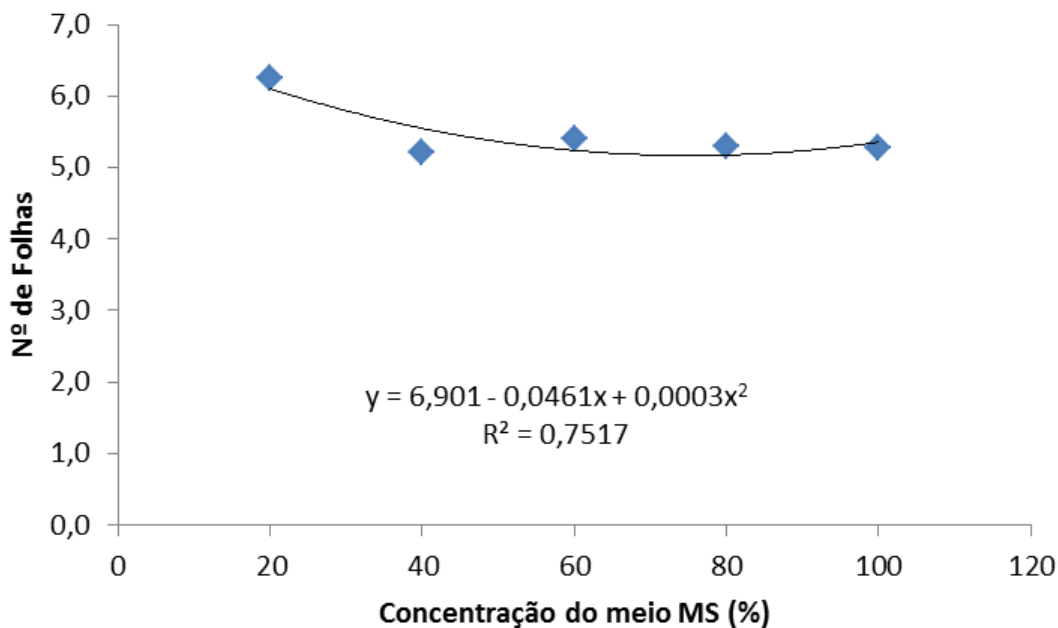
Em relação à variável **número de folhas** (NF), o melhor tratamento foi o meio de cultivo com formulação comercial nas concentrações de 60% e 80%. Para o fator meio de cultivo, a formulação comercial apresentou significativamente os melhores resultados nas concentrações de 60, 80 e 100%, com número médio de folhas de 8,37, 7,81 e 6,44, respectivamente (Tabela 3).

**TABELA 3:** Médias da Interação meio de cultivo X concentração na variável nº de Folhas de *L. Sativa* cultivada *in vitro*.

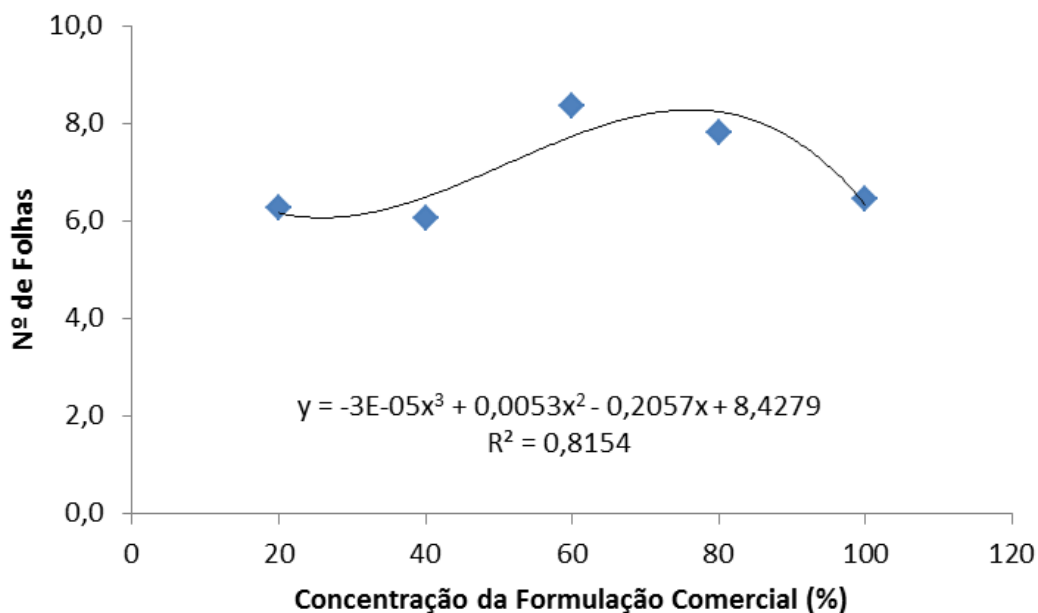
<b>Concentração (%)</b>	<b>Meio MS</b>	<b>Formulação Comercial</b>
<b>100</b>	5.2667 B	6.4375 A
<b>80</b>	5.2992 B	7.8125 A
<b>60</b>	5.4000 B	8.3693 A
<b>40</b>	5.2093 A	6.0625 A
<b>20</b>	6.2447 A	6.2690 A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si.

A análise de regressão para o fator concentração mostrou que à medida que a concentração meio MS diminui (MS 20%), ocorre um aumento quadrático no número de folhas (6,24), porém sem efeito significativo (Figura 3). Em relação à formulação comercial, a regressão polinomial cúbica, mostrou que as concentrações de 60 e 80% de meio apresentaram, significativamente as maiores médias para NF 8,37 e 7,81, respectivamente (Figura 4).



**FIGURA 3:** Número de folhas de *L. sativa* (cv. Elba) em função do efeito das concentrações do meio de cultivo MS. CEUNES/UFES. São Mateus, ES.



**FIGURA 4:** Número de folhas de *L. sativa* (cv. Elba) em função do efeito das concentrações do meio de cultivo com formulação comercial. CEUNES/UFES. São Mateus, ES.

Esses resultados podem estar relacionados à concentração de sais do meio de cultura. O nitrogênio é um dos principais nutrientes essenciais e ativos no cultivo *in vitro*, que por sua vez, é absorvido, principalmente, na forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) (SAKUTA et al., 1987), sendo o crescimento das culturas, seu metabolismo químico e a formação e produção de metabólitos influenciados diretamente pela quantidade e pela fonte de nitrogênio (RUSSOWSKI e NICOLOSO, 2003). Ribeiro et al. (2008) também ressaltam que a disponibilidade de nitrogênio e a forma de como é apresentado, podem influenciar no crescimento e na morfogênese em culturas *in vitro*. Sakuta (1998), referindo-se ao meio MS, afirma que a concentração de sais na composição desse meio é elevada, quando comparada a outros meios de cultura. Provavelmente, a formulação comercial possibilitou um melhor desempenho para o aumento do número de folhas de *L. sativa*, por ser constituída por menores percentagens de nitrogênio amoniacal.

Em relação às concentrações de sais do meio MS, Villa et al. (2006) obtiveram resultados similares com as variações do Meio MS (0, 50, 100, 150 e 200%) em estudos da multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de videira, os autores relatam que o meio MS contendo 50% dos sais e  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose, apresentou o maior número de folhas (2,51) e que na ausência de meio MS (MS 0) ocorreu um decréscimo desta variável. Este último fato pode ser explicado, devido o meio conter os macro e micronutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* da cultura (VILLA et al, 2006).

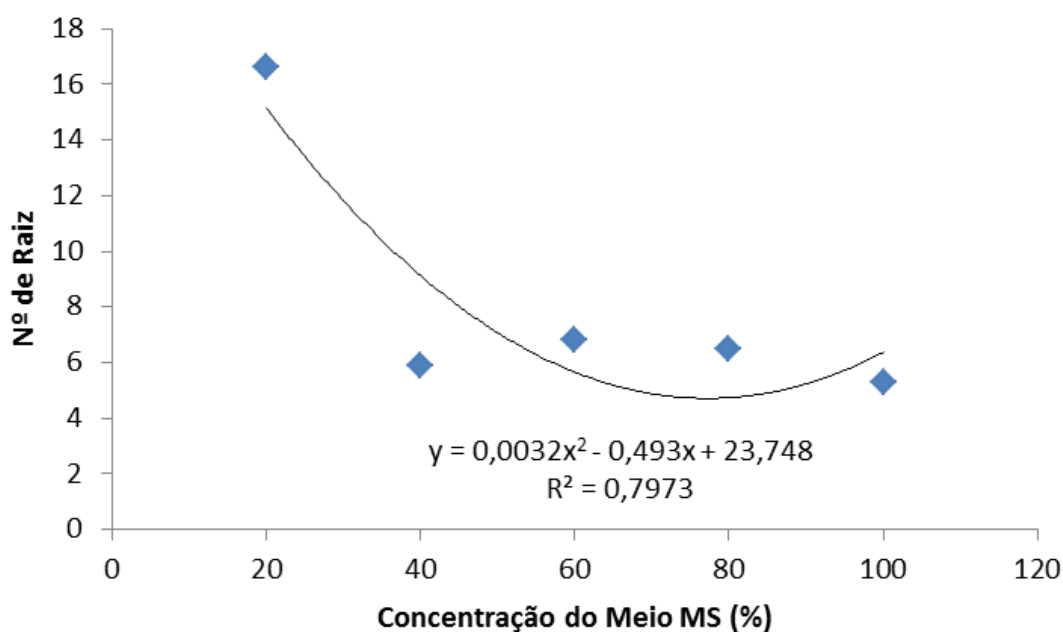
Para a variável, **número de raízes (NR)**, as plântulas de *L. sativa* apresentaram melhor desempenho radicular no meio com formulação comercial na concentração de 60%. Quando se observa o efeito do fator meio de cultivo, a formulação comercial apresentou os melhores resultados para as concentrações de 100, 80 e 60%, não diferindo estatisticamente com o meio MS na concentração de 40%. Enquanto que o meio MS apresentou o melhor resultado para a concentração de 20%, conforme Tabela 4.

**TABELA 4:** Médias da Interação Meio de Cultura X Dose na variável nº de Raízes de *L. Sativa*

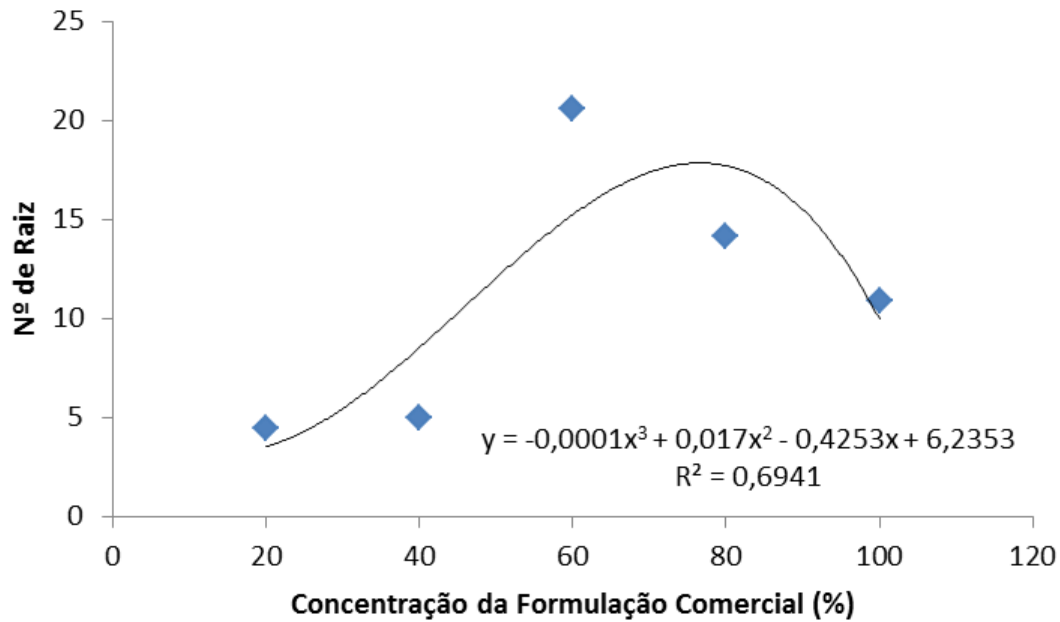
Concentração (%)	Meio MS	Formulação Comercial
100	5.3083 B	10.8856 A
80	6.4703 B	14.1553 A
60	6.8000 B	20.5777 A
40	5.8780 A	4.9792 A
20	16.6029 A	4.4394 B

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si.

Quando se refere ao fator concentração para a variável NR, a regressão quadrática demonstrou que para o meio MS, a concentração de 20% apresentou significativamente o melhor desempenho, com médias de 16,60 raízes por plântula, ou seja, o número de raízes aumentou de acordo com a diminuição na concentração desse meio (Figura 5). Para o meio com formulação comercial, a concentração 60%, apresentou significativamente a melhor média, com 20,58 raízes por plântula (Figura 6).



**FIGURA 5:** Número de raiz de *L. sativa* (cv. Elba) em função do efeito das concentrações do Meio MS. CEUNES/UFES. São Mateus, ES.



**FIGURA 6:** Número de raiz de *L. sativa* (cv. Elba) em função do efeito das concentrações do Meio de Cultivo com formulação comercial. CEUNES/UFES. São Mateus, ES.

Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira e Faria (2005) em estudo comparativo entre os meios MS, Knudson C, Vacin e Went e meios à base de adubos NPK (10-5-5) e NPK (10-30-20) na concentração de  $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ , obtendo as melhores médias para NR na espécie *Catasetum fimbriatum* paranaenses quando utilizaram o meio à base do adubo NPK (10-30-20). Do mesmo modo, Ventura (2007), estudando o cultivo *in vitro* de *Sophronis coccinea* em diferentes formulações químicas do meio de cultura (Peter's, GB<sub>5</sub> e MS), também obteve resultados significativos para essa variável para o meio constituído por formulação comercial; o GB<sub>5</sub> (Gambor et al., 1968) apresentou as melhores médias (7,0 raízes por planta), enquanto que o meio MS e Peter's tiveram médias de 4,5 e 4,2, respectivamente.

Para o fator concentração para o meio MS, Kanashiro et al. (2007), estudando os efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) cultivada *in vitro*, obtiveram a mesma tendência na variável NR, encontrando maior quantidade de raízes (9,20) na menor quantidade de nitrogênio (15mM). Da mesma forma, Grossi (2000) observou, em *Aechmea nudicaulis*, a mesma

tendência na variável número de raízes, encontrando maior quantidade de raízes na menor concentração de nitrogênio (1,78 mM). Portanto, meios de cultivo simplificados e a utilização de fertilizantes comerciais em sua formulação, constituem-se uma alternativa para a propagação e produção comercial de espécies de interesse econômico.

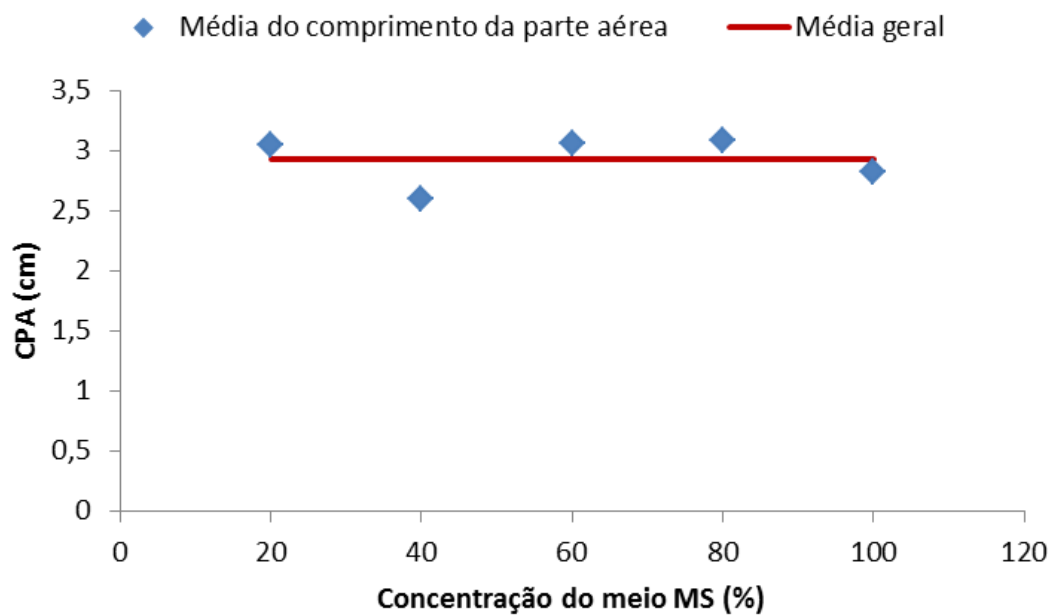
Em relação ao **comprimento da parte aérea** (CPA), houve interação significativa, ocorrendo um melhor crescimento aéreo de plântulas no meio com formulação comercial nas concentrações de 100, 60 e 80%. Para o fator meio de cultivo não houve efeito significativo (Tabela 5).

**TABELA 5:** Médias da Interação Meio de Cultura X Dose na variável Comprimento da parte aérea de *L. Sativa*

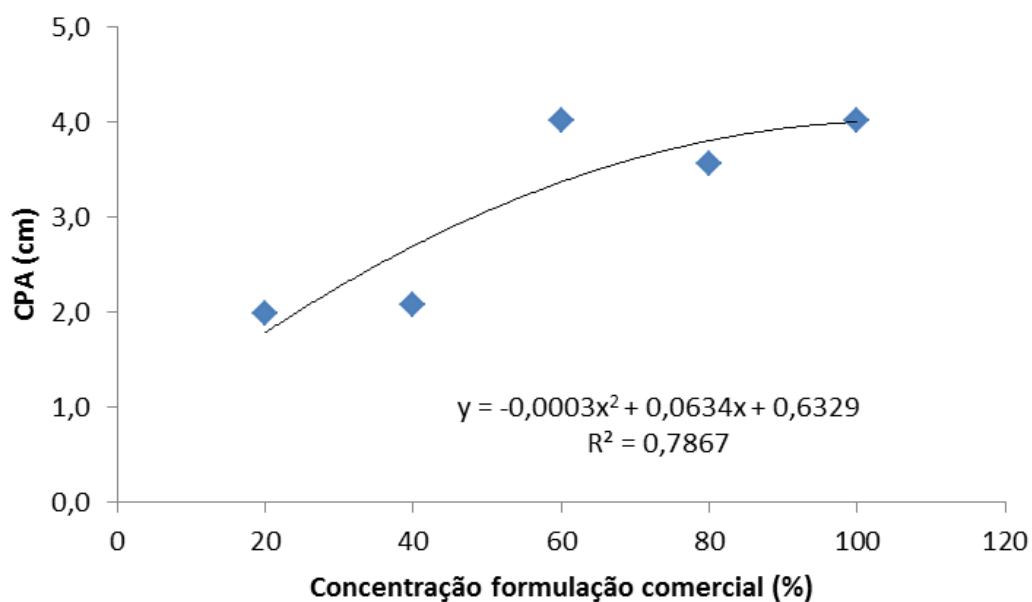
<b>Concentração (%)</b>	<b>Meio MS</b>	<b>Formulação Comercial</b>
<b>100</b>	2.8259 B	4.0090 A
<b>80</b>	3.0878 A	3.5566 A
<b>60</b>	3.0613 B	4.0061 A
<b>40</b>	2.5966 A	2.0813 A
<b>20</b>	3.0531 A	1.9813 B

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si.

Quanto ao fator concentração, não ocorreu diferença significativa para as concentrações do meio MS. Por não haver modelo ajustado, a dispersão da média dos tratamentos pode ser verificada em torno da média geral na Figura 7. Para o meio com formulação comercial, a concentração de 100% apresentou o maior valor de CPA (4,009 cm), seguida das concentrações 60 e 80%, com médias de 4,006 e 3,556, respectivamente (Figura 8).



**FIGURA 7:** Comprimento da parte aérea de *L. sativa* (cv. Elba) em função do efeito das concentrações do Meio MS. CEUNES/UFES. São Mateus, ES.



**FIGURA 8:** Comprimento da parte aérea de *L. sativa* (cv. Elba) em função do efeito das concentrações do Meio de Cultivo com formulação comercial. CEUNES/UFES. São Mateus, ES.

Resultados similares foram encontrados por Unemoto et al. (2007), analisando o desenvolvimento aéreo de *Oncidium nanum* Lindl., em que obtiveram as melhores médias para CPA com a utilização de meio de cultura com adubo comercial na concentração NPK (6-6-8), (2,39 cm), enquanto que o meio MS, obteve médias de 1,79 cm.

Para o **comprimento da parte radicular** (CPR), houve interação significativa entre os fatores, sendo que a formulação comercial obteve os melhores resultados para a concentração de 60, 100, 80 e 40%. Para o fator meio de cultivo, não houve efeito significativo (Tabela 6).

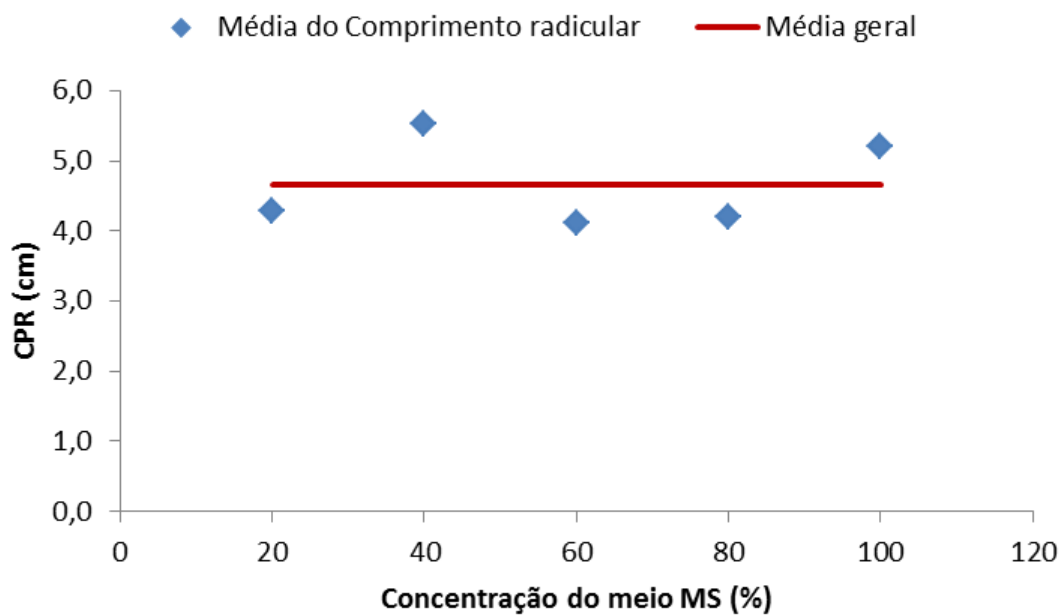
**TABELA 6:** Médias da Interação Meio de Cultura X Dose na variável Comprimento da parte radicular de *L. Sativa*

<b>Concentração (%)</b>	<b>Meio MS</b>	<b>Formulação Comercial</b>
<b>100</b>	5.2083 A	5.7354 A
<b>80</b>	4.1965 A	5.2487 A
<b>60</b>	4.1067 B	6.1322 A
<b>40</b>	5.5149 A	4.5000 A
<b>20</b>	4.2915 A	3.3112 A

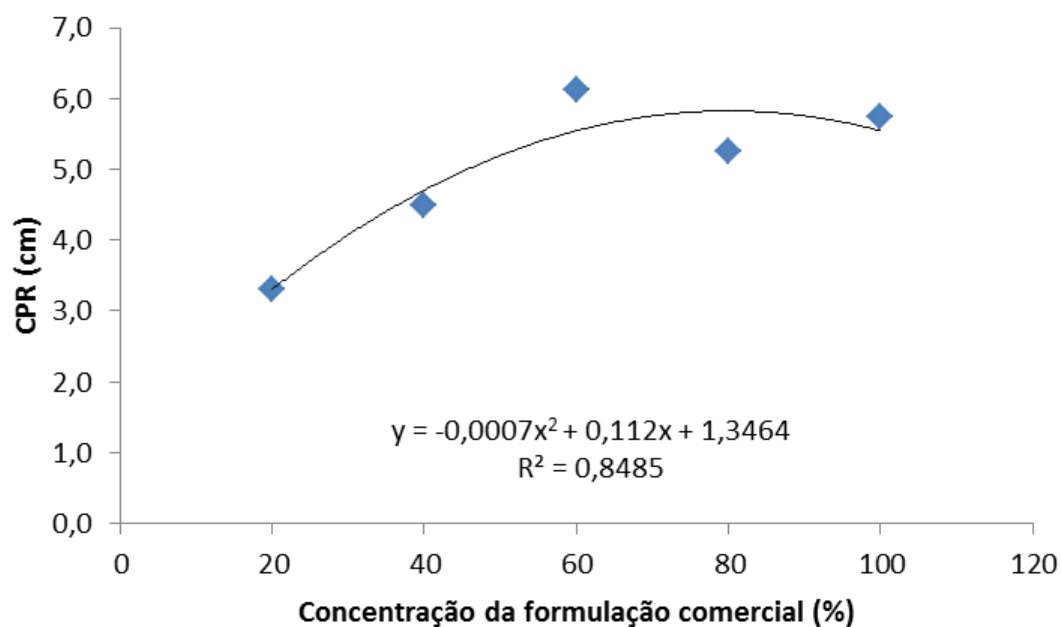
Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si.

Para as concentrações do meio MS, não houve modelo ajustado, sendo suas médias representadas na Figura 9. Para as concentrações do meio com formulação comercial, de acordo, com a regressão quadrática, a concentração de 60% obteve as melhores médias, seguidas de 100, 80 e 40% (Figura 10).





**FIGURA 9:** Comprimento da parte radicular de *L. sativa* (cv. Elba) em função do efeito das concentrações do Meio MS. CEUNES/UFES. São Mateus, ES.



**FIGURA 10:** Comprimento da parte radicular de *L. sativa* (cv. Elba) em função do efeito das concentrações do Meio de Cultivo com formulação comercial. CEUNES/UFES. São Mateus, ES.

Ventura (2007), estudando o cultivo *in vitro* de *S. coccinea* em diferentes formulações químicas do meio de cultura (Peter's, GB<sub>5</sub> e MS), verificou que o meio GB<sub>5</sub> apresentou as melhores médias, 3,2 cm de raízes por plântula, enquanto que os meios Peter's e MS tiveram médias de 1,9 e 1,8, respectivamente. De acordo com Raven e Edwards (2001) o sistema radicular desempenha funções primordiais para o desenvolvimento vegetal e necessárias para a sua sobrevivência, como a fixação das plantas, absorção e condução de água e nutrientes do meio externo até o caule, além de funções mais complexas. Observado na tabela 6, a formulação comercial apresentou um melhor desempenho no comprimento da raiz, sendo esta, uma característica importante, pois, plantas com sistema radicular bem desenvolvido para profundidade e área radicular permitirão aumentos de produtividade (PIMENTEL, 1998).

Para o fator concentração no meio MS, Kanashiro et al. (2007), no mesmo estudo sobre os efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *A. blanchetiana* (Baker) cultivada *in vitro*, obtiveram decréscimo linear na variável CPR, com o aumento da concentração de nitrogênio. Nas concentrações de 7,5mM de nitrogênio obteve média de 9,62 cm, enquanto que para as concentrações de 120 mM, as médias foram 5,71 cm.

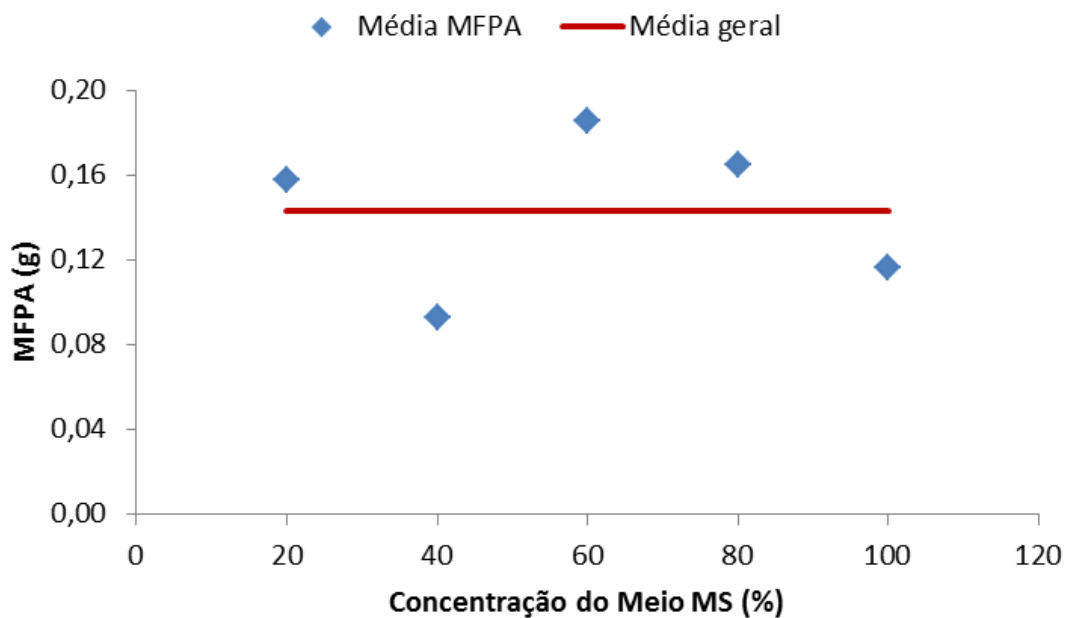
Para a variável **massa de matéria fresca da parte aérea** (MFPA) houve interação significativa, sendo que o meio MS na concentração de 20% apresentou o melhor resultado. Para o fator meio de cultivo, o MS diferiu da formulação comercial para a concentração de 20%, não diferindo das demais (Tabela 7).

**TABELA 7:** Médias da Interação Meio de Cultura X Dose na variável Massa de Matéria Fresca da Parte Aérea de *L. Sativa*

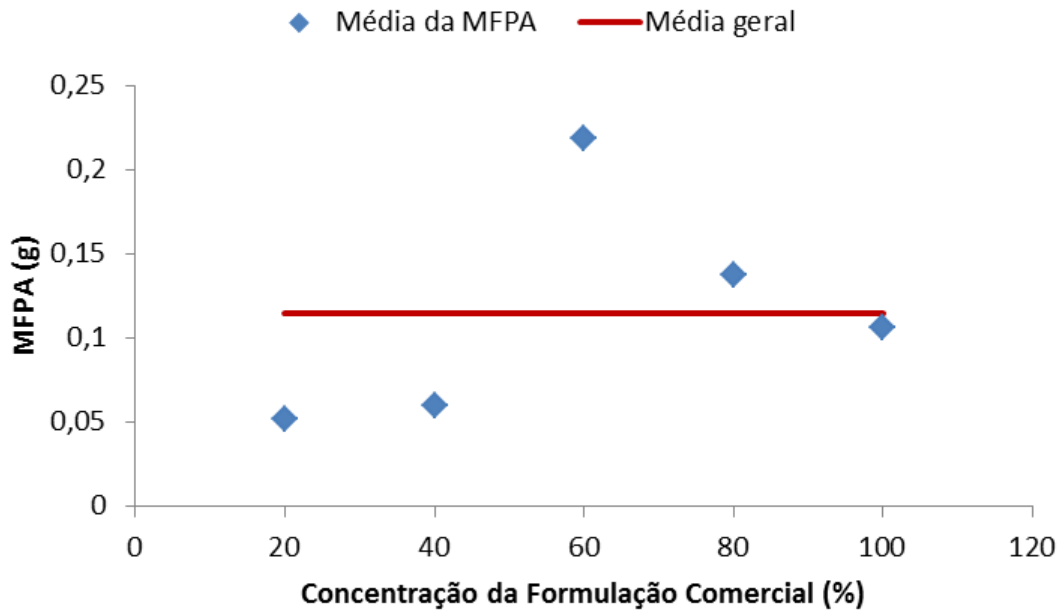
<b>Concentração (%)</b>	<b>Meio MS</b>	<b>Formulação Comercial</b>
<b>100</b>	0.1163 A	0.1059 A
<b>80</b>	0.1647 A	0.2190 A
<b>60</b>	0.1858 A	0.2190 A
<b>40</b>	0.0928 A	0.0595 A
<b>20</b>	0.1575 A	0.0522 B

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si.

Para o fator concentração, no meio MS, as concentrações de 20, 40, 60 e 100%, obtiveram as maiores médias. Enquanto que na formulação comercial, as concentrações de 60 e 80%, apresentaram os melhores resultados. Entretanto, não houve adequação de um modelo ajustado para as médias, sendo sua dispersão em torno da média geral ilustrados nas Figuras 11 e 12.



**FIGURA 11:** Matéria Fresca da parte aérea de *L. sativa* (cv. Elba) em função do efeito das concentrações do Meio MS. CEUNES/UFES. São Mateus, ES.



**FIGURA 12:** Matéria Fresca da parte aérea de *L. sativa* (cv. Elba) em função do efeito das concentrações do Meio de Cultivo com formulação comercial. CEUNES/UFES. São Mateus, ES.

Hermann et al. (2011), em estudo com plântulas de orquídea *Brassavola tuberculata* Hook em diferentes meios de cultura, mostraram que as plântulas submetidas ao meio MS modificado apresentaram crescimento menor do que as submetidas aos demais tratamentos. Com o meio T2 (Knudson C), as pesagens não indicaram crescimento homogêneo das plântulas, enquanto que em T3 (meio alternativo), percebeu-se crescimento progressivo das plântulas e elevado incremento de massa.

Com a diminuição na concentração de sais do meio MS, o potencial osmótico do meio foi maior, aumentando significativamente o peso da MFPA, pois provavelmente, as plântulas nesse meio de cultivo, conseguiram absorver mais água para seus tecidos, interferindo no peso de sua massa fresca. Chaves et al. (2005), ressaltam que os meios baseados em formulações básicas diluídas têm possibilitado melhores resultados para multiplicação das mais diversas espécies, além disso, muitas pesquisas estão sendo realizadas com a finalidade de redução de sais e reguladores de crescimento nos meios de cultivo, visando a diminuição do custo final de produção da muda, possibilitando o acesso ao produtor.

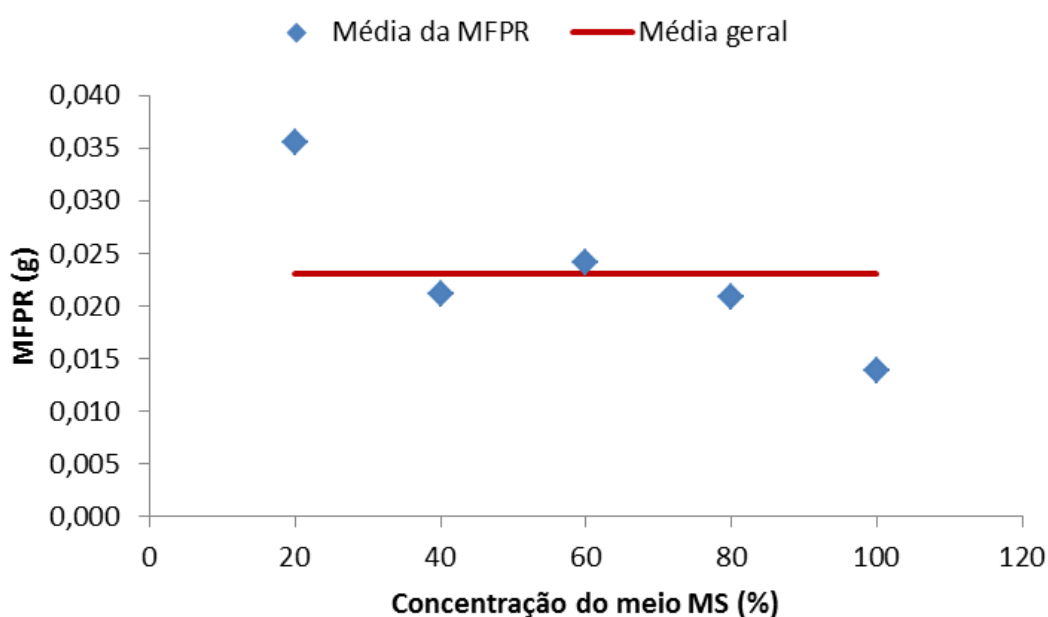
Para a **massa de matéria fresca da parte radicular** (MFPR), as plântulas de *L. sativa* apresentaram melhor desenvolvimento no tratamento constituído por formulação comercial a 60%. Para o fator meio de cultivo, a formulação comercial a 60% obteve diferença significativa, enquanto que o meio MS a 20% obteve as melhores médias (Tabela 8). Nas demais concentrações, os meios não diferiram estatisticamente.

**TABELA 8:** Médias da Interação Meio de Cultura X Dose na variável Massa de Matéria Fresca da Parte Radicular de *L. Sativa*

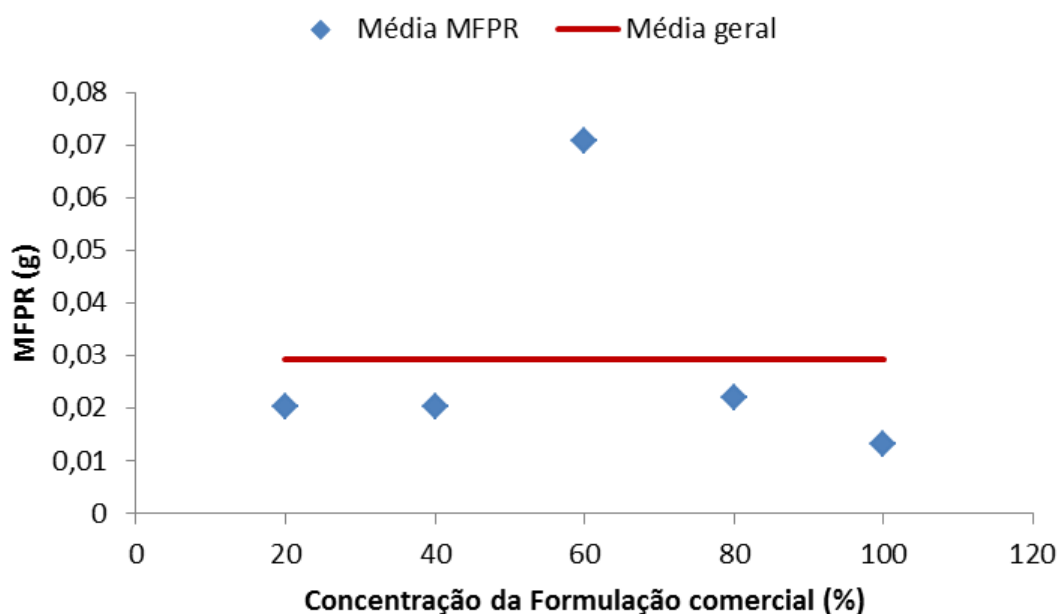
Concentração (%)	Meio MS	Formulação Comercial
100	0.0138 A	0.0133 A
80	0.0208 A	0.0220 A
60	0.0242 B	0.0707 A
40	0.0211 A	0.0202 A
20	0.0355 A	0.0202 B

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si.

Para o fator concentração, não houve um **modelo** ajustado, sendo possível verificar a dispersão das médias dos tratamentos em torno da média geral para o meio MS e formulação comercial. *Isso pode ser observado nas Figuras 13 e 14, respectivamente.*



**FIGURA 13:** Matéria Fresca da parte radicular de *L. sativa* (cv. Elba) em função do efeito das concentrações do Meio MS. CEUNES/UFES. São Mateus, ES.



**FIGURA 14:** Matéria Fresca da parte radicular de *L. sativa* (cv. Elba) em função do efeito das concentrações do Meio de Cultivo com formulação comercial. CEUNES/UFES. São Mateus, ES.

Pedroso de Moraes et al. (2009) comparando o desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard utilizando os meios de cultivo, MS com metade da concentração de macronutrientes ( $\frac{1}{2}$  MS), Hiponex e Kristalon laranja, obtiveram as melhores médias para MFPR no meio Kristalon laranja, com médias de 0,54 g, enquanto que os meios Hiponex e  $\frac{1}{2}$  MS, obtiveram médias de 0,38 e 0,34g, respectivamente. Resultados similares foram encontrados por Galdiano Júnior et al. (2012), estudando a propagação *in vitro* de *Cattleya trianaei* (Linden & Reichenbach fil.) em meios de cultivos e com diferentes concentrações de fertilizante comercial (MS reduzido; Peters® 1 g L-1; Peters® 2 g L-1; Peters® 3 g L-1 e Peters® 5 g L-1), obtendo melhor desenvolvimento nas concentrações do fertilizante, enquanto que o meio de cultura MS reduzido apresentou a menor eficiência. Esses estudos evidenciam a viabilidade da utilização de fertilizantes no preparo de meios de cultura em algumas espécies.

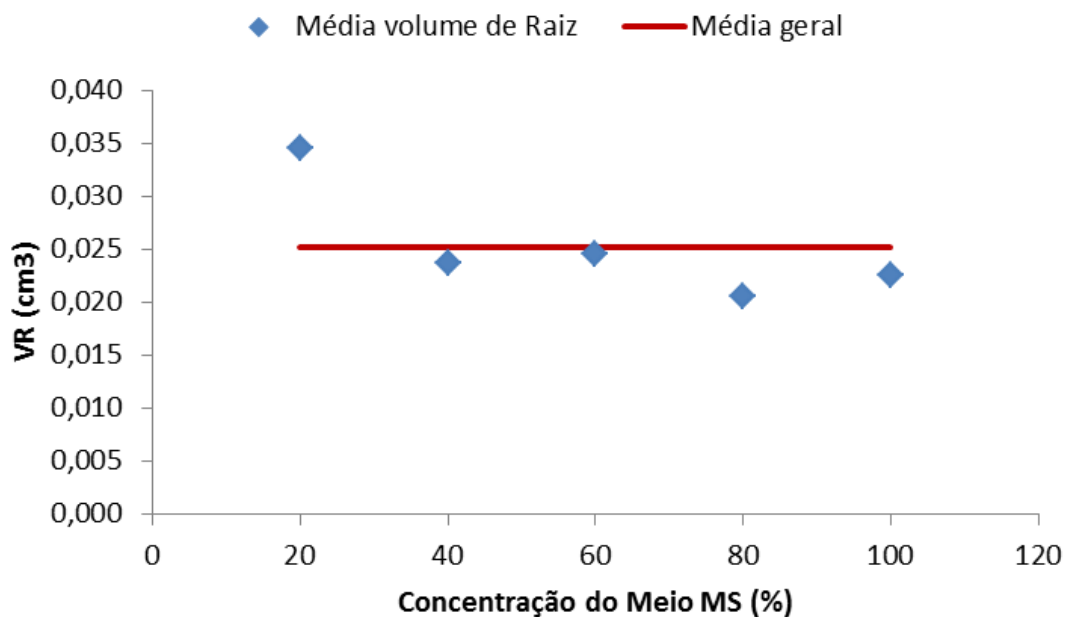
Para a variável **volume da raiz** (VR), os resultados foram semelhantes à MFPR. Houve interação significativa, sendo que o tratamento com formulação comercial a 60% proporcionou maior desempenho (0,0741 cm<sup>3</sup>). Para o fator meio de cultivo, a formulação comercial a 60% obteve diferença significativa, enquanto que o meio MS a 20% obteve as melhores médias (Tabela 9), nas demais concentrações, as médias não diferiram.

**TABELA 9:** Médias da Interação Meio de Cultura X Dose na variável Volume de Raiz de *L. Sativa*

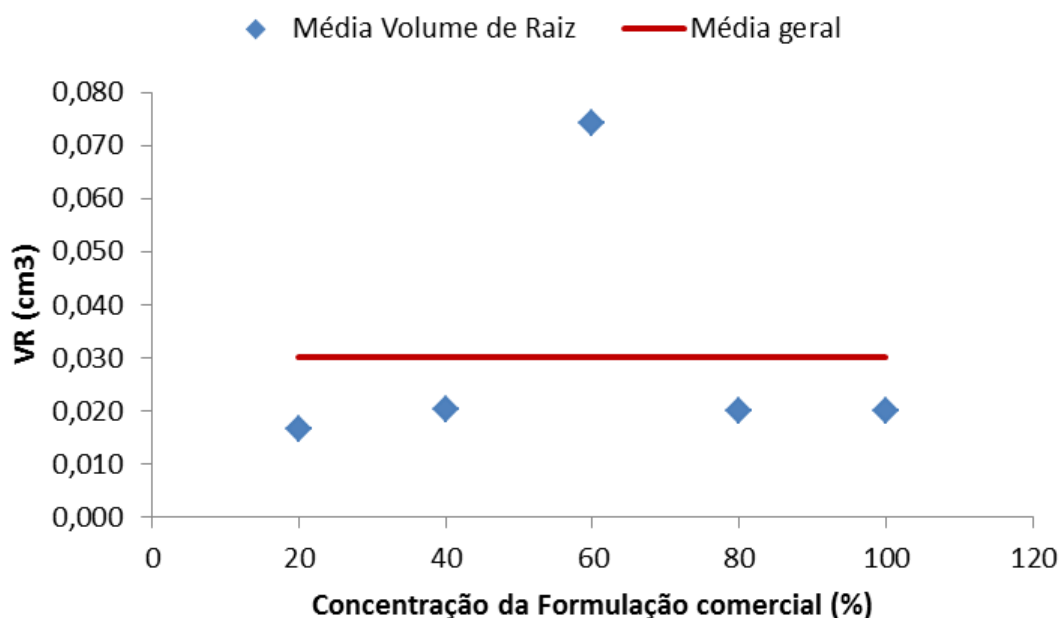
Concentração (%)	Meio MS	Formulação Comercial
100	0.0225 A	0.0200 A
80	0.0206 A	0.0201 A
60	0.0246 B	0.0741 A
40	0.0237 A	0.0204 A
20	0.0345 A	0.0167 B

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si.

Não foi possível ajustar um modelo para o fator concentração, sendo representada a dispersão das médias dos tratamentos em torno da média geral nas Figuras 15 e 16.



**FIGURA 15:** Volume da parte radicular de *L. sativa* (cv. Elba) em função do efeito das concentrações do Meio MS. CEUNES/UFES. São Mateus, ES.



**FIGURA 14:** Volume da parte radicular de *L. sativa* (cv. Elba) em função do efeito das concentrações do Meio de Cultivo com formulação comercial. CEUNES/UFES. São Mateus, ES.

Como se observa nos resultados, para as variáveis número de raiz (NR), comprimento da parte radicular (CPR), massa de matéria fresca da parte radicular (MFPR) e volume da raiz (VR), o tratamento constituído da formulação comercial a 60% apresentou, significativamente as melhores médias. Essas características são importantes, pois tem como funções determinar o potencial de absorção de água e nutrientes da planta, também indica a interação das raízes com os microorganismos, exercem conteúdo de reserva e determinam o volume de solo explorado pelas raízes (Atkinson, 2000). Miller et al., (1999), afirmam que um sistema radicular eficiente é aquele que otimiza a relação entre a quantidade de recursos adquiridos e empregados para a sua obtenção. A formulação comercial a 60% também obteve as maiores médias para a maioria das variáveis referentes à parte aérea, o que demonstra a eficiência da utilização desse meio de cultivo para a propagação *in vitro* de *L. sativa* L (cv. Elba), representando uma alternativa da utilização de sais comerciais no cultivo *in*



*vitro*. Isso se justifica, pois, recentemente, o uso de fertilizantes comerciais tem se intensificado como forma de facilitação para o preparo de meios e redução de custos de produção em várias espécies vegetais (Cavalini, 2014).

## **Conclusões**

De acordo com os resultados apresentados, conclui-se que:

- I. As plântulas de *L.sativa* (cv.Elba) apresentaram um maior desenvolvimento no meio de cultivo com formulação comercial em relação ao meio MS.
- II. As concentrações de sais no meio de cultivo afetaram significativamente no desenvolvimento *in vitro* de *L.sativa* (cv.Elba).
- III. O meio de cultivo com formulação comercial a 60% proporcionou significativamente as maiores médias para NF, NR, CR, MFPR, VR, CPA.
- IV. O meio de cultivo MS a 20% apresentou significativamente o melhor resultado para MFPA.

## Referências Bibliográficas

AMPOMAH-DWAMENA, C. et al. Genotypic response of lettuce cotyledons to regeneration in vitro. *Scientia Horticulturae*, v.71, p.137-145, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423897000988>>. Acesso em: 21 nov. 2015. doi: 10.1016/S0304-4238(97)00098-8.

ATKINSON, D. Root characteristics: Why and what to measure. In: SMIT, A.L.; BENGOUGH, A.G.; ENGELS, C.; VAN NOORDWIJK, M.; PELLERIN, S.; VAN DE GEIJN, S.C. (Eds) *Root methods: a handbook*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p.305-341. 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV, p. 365, 1992.

CASALE, C.M.O. Regeneração somática in vitro em cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) e aplicação no melhoramento genético. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Campinas – SP, 1996.

CAVALINI, S.C.G.; GIANINI P.F.; PEDROSO-DE-MORAES C. Crescimento in vitro de *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) em meios de cultivo simplificados. *Natureza on line* 12 (2): 75-78, 2014.

CHAPLA, P. I. et al. PH, carvão ativado e agentes geleificantes do meio de cultura no crescimento in vitro de *Miltonia flavescens* Lindl. *Plant Cell Culture & Micropopagation*, v. 5, n. 2, p. 87-93, 2009.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* (L). *Ciência & Agrotecnologia*, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, 2005.

EMBRAPA, Germinação de Sementes de Alface. Circular técnica. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2002.

FELTRIM, A.L. et al. Produção de alface-crespa em solo e em hidroponia, no inverno e verão, em Jaboticabal - SP. *Científica*, v.37, p.9-15, 2009. Disponível em:

<<http://cientifica.org.br/index.php/cientifica/article/view/259/146>>. Acesso em: 21 nov. 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAOSTAT). Core production data. 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>> Acesso em: 13 dez. 2015.

FRANKLIN, G. et al. In vitro flowering and viable seed setting of transgenic lettuce cultures. *Plant Biotechnology*, v.28,p.63-68, 2011. Disponível em: <[http://www.jstage.jst.go.jp/article/plantbiotechnology/28/1/63/\\_pdf](http://www.jstage.jst.go.jp/article/plantbiotechnology/28/1/63/_pdf)>. Acesso em: 20 nov.2015. doi: 10.5511/plantbiotechnology.10.1208<sup>a</sup>

GALDIANO JUNIOR, R.F.; MANTOVANI, C.; LEMOS, E. G. M. Propagação *in vitro* de *Cattleya trianaei* (Linden & Reichenbach fil.) Orchidaceae) em meios de culturas e com doses de fertilizante comercial. *Comunicata Scientiae* 3(3): 210-214, 2012.

GAMBOR, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutriente requirements os suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell.* 50: 151-158, 1968.

GANTAIT, S.; MANDAL, N.; DAS, P. K. Impact of auxins and activated charcoal on *in vitro* rooting of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. cv Golden Boy. *Journal of Tropical Agriculture*, v. 47, p. 84-86, 2009.

GROSSI, F. Aspectos da nutrição nitrogenada *in vitro* e atividade da redutase de nitrato em uma espécie de bromélia. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2000.

HERMANN, M. H.; FREITAS, E.M.; PÉRICO, E. 2011. Cultivo in vitro de plântulas de orquídea em meio de cultura alternativo. *R. Bras. Agrociência*, Pelotas, v.17, n.1-4, p.162-166.

HUNTER, D.C.; BURRITT, D.J. Improved adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Scientia Horticulturae*, v.95, p.269-276, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423802000444>>. Acesso em: 12 dezembro. 2015. doi: 10.1016/S0304-4238(02)00044-4.

KANAMOTO, H. et al. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. 'Cisco' (lettuce) plastids. *Transgenic Research*, v.15, p.205-217, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/d01546015251026w/>>. Acesso em: 18 nov. 2015. doi: 10.1007/s11248-005-3997-2.

KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R.C.S.; GONÇALVES, A. N.; DIAS, C.T.S.; JOCYS, T. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. cultivada *in vitro*. *Hoehnea* 34(1): 59-66, 3 tab., 2 fig., 2007.

KARIM, M.A.; AHMED, S.U. Somatic embryogenesis and micropropagation in teale gourd. *International Journal of Environmental Science and Development*, v.1, p.10-14, 2010. Disponível em: <<http://www.ijesd.org/papers/3-B019.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

MILLER, D. D., DE RUIJTER, N. C., BISSELING, T., EMONS, A. M. The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochito-oligosaccharides as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant Journal*. 17, 2:141-154, 1999.

MOHEBODINI, M. et al. Effects of genotype, explant age and growth regulators on callus induction and direct shoot regeneration of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Australian Journal of Crop Science*, v.5, p.92-95, 2011. Disponível em: <[http://www.cropj.com/mohebodini\\_5\\_1\\_2011\\_92\\_95.pdf](http://www.cropj.com/mohebodini_5_1_2011_92_95.pdf)>. Acesso em: 21 nov. 2015.

MOREIRA, M. J. S. et al. Diferentes meios de cultivo no desenvolvimento *in vitro* de *Aechmea miniata*. *Magistra*, Cruz das Almas, BA, v. 21, n. 4, p. 277-283, 2009.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F.A. 1962. A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

NOLAN, K.E. et al. Expression of the somatic embryogenesis receptor-like kinase1 (SERK1) gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, v.60, p.1759-1771, 2009. Disponível em: <<http://jxb.oxfordjournals.org/content/60/6/1759.short>>. Acesso em: 20 nov. 2015. doi: 10.1093/jxb/erp046.

OLIVEIRA, R.L.; FARIA, R.T. 2005. In vitro propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. *Acta Scientiarum*, v. 27, p. 1-5, 2005.

PACEK-BIENIEK, A.; DYDUCH-SIEMIŃSKA, M.; RUDAŚ, M. Influence of activated charcoal on seed germination and seedling development by the asymbiotic method in *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf. (Orchidaceae). *Folia Horticulturae*, v. 22, n.2, p. 45-50, 2010.

PEDROSO-DE-MORAES C, SANTAMBROSIO NS, MASSARO R, CORDEIRO GM, SOUZA-LEAL T (2009) Desenvolvimento in vitro de *Cattleya tigrina* A. Richard (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. *Ensaio e Ciência* 13: 57-65.

PEREIRA, M.R. 2014. Fontes alternativas de minerais e sacarose na micropropagação da bananeira cv. Williams. Dissertação. Campo dos Goytacazes – RJ.

PIMENTEL, C, A relação da planta com a água. Seropédica: EDUR. Editora da Univ.Fed. Rural do Rio de Janeiro. 159p. 1998.

PIMENTEL, C, Metabolismo de Carbono na Agricultura Tropical. Seropédica: EDUR. Editora da Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro. 159p. 1998.

PINHEIRO, M.V.M.; MAIA, T.C.R.S.C.; LIMA, B.V.; MOTOIKE, S.Y. Propagação in vitro de genótipos de alface via embriogênese somática. *Ciência Rural*, v.42, n.11, nov, 2012.

RAVEN, J. A. & EDWARDS, D. Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *Journal of Experimental Botany*, 52:381-401, 2001.

REIS, E.S.; PINTO, J.E.B.P.; ROSADO, L.D.S.; CORRÊA, R.M. 2008. Influência do meio de cultura na germinação de sementes in vitro e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. *Revista CERES*. 55(3): 160- 167, 2008.

RIBEIRO, M.N. O; PASQUAL, M.; SILVA, A.B.; RODRIGUES, V.A. Diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose na multiplicação in vitro de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-deleite). *Rev. Ciên. Agron. Fortaleza*, v. 39, n. 01, p. 101-106, Jan.- Mar., 2008.

RUSSOWSKI D.; NICOLOSO, F.T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata*(Spreng.) Pedersen] cultivadas in vitro. *Ciência Rural* 33: 57-63, 2003.

SAKUTA M.; TAKAGI T.; KOMAMINE, A. Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiologia Plantarum* 71: 459-463, 1987.

SAKUTA, M. Effects of nitrogen source on betacyanin accumulation and growth in suspension culture of *Phytolacca americana*. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, v. 71, p. 459-463, 1987.

SASAMORI, M. H.; ENDRES-JÚNIOR D.;DROSTE, A. Asymbiotic culture of *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae): the influence of macronutrient salts and sucrose concentrations on survival and development of plantlets. *Acta bot. bras.* 29(3): 292-298. 2015.

SEABROOK, J. et al. PATENT, U. S. Canadá: Agriculture and Agri-Food Canada. 6,071,746: 1-14p. 2000.

SEABROOK, J.; DOUGLASS, L.K. Regeneration of somatic embryos from plant tissues. US. Pat. 6071746, 2000. 14p.

SNEDECOR, G.W. Statistical methods. Ames, Iowa State University Press, 1962. 422p.

SOARES, J.S.; ROSA, Y.B.C.J.; MACEDO, M.C; SORGATO, J.C.; ROSA, D.B.C.J.; ROSA,.B.C.J. Cultivo in vitro de *Brassavola tuberculata* (Orchidaceae) em meio de cultura alternativo suplementado com diferentes concentrações de açúcar e carvão ativado *Magistra*, Cruz das Almas-BA, v. 24, n. 3, p. 226-233, jul./set. 2012.

SOUZA, S. A. M. Biotestes na Avaliação da Fitotoxicidade de Extratos Aquosos de Plantas Medicinais Nativas do Rio Grande do Sul. Monografia de conclusão de curso. Universidade Federal de Pelotas – RS, 2005.

STANCATO, Giulio Cesare; BEMELMANS, Paul Frans; VEGRO, Celso Luis Rodrigues. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes in vitro e sua

viabilidade econômica: estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, v. 7, n.1, p. 25-33, 2001.

STUART, D.A.; MCCALL, C.M. Induction of somatic embryogenesis using side chain and ring modified forms of phenoxy acid growth regulators. *Plant Physiology*, v.99, p.111-118, 1992. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/99/1/111.full.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2015. doi:0032-0889/92/99/0111/08/\$01.00/0.

UNEMOTO, L.K.; FARIA, R.T.; VIEIRA, A.O.S.; DALIO, R.J.D. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v.13, n.2, p.267-269, 2007.

VENTURA, G.M. Cultivo *in vitro* de orquídeas do grupo *Cattleya*, em diferentes meios de culturas e irradiâncias. Tese doutorado. UFV. 110 f. 2007.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L.A.S.; ASSIS, F.A. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de videira em variações do meio MS. *Acta Sci. Agron. Maringá*, v. 28, n. 3, p. 345-349, July/Sept. 2006.

XINRUN, Z.; CONNER, A.J. Genotypic effects on tissue culture response of lettuce cotyledons. *Journal of Genetic Breeding*, v.46, p.287-290, 1992.

ZHOU, X. et al. Somatic embryogenesis and analysis of peroxidase in cultured lettuce (*Lactuca sativa* L.) cotyledons. *Annals of Botany*, v.69, p.97-100, 1992.