

Propagação *in vitro* de genótipos de alface via embriogênese somática

In vitro propagation of lettuce genotypes via somatic embryogenesis

Marcos Vinícius Marques Pinheiro^{1*} Thaís Cristina Ribeiro da Silva¹ Ciro Maia¹
Brenda Ventura Lima¹ Sérgio Yoshimitsu Motoike¹¹

RESUMO

A propagação *in vitro* via embriogênese somática é uma alternativa eficiente para a propagação em larga escala do material vegetal. No entanto, não há relatos do desenvolvimento de protocolos completos de embriogênese somática, com produção de plantas de alface. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer a propagação *in vitro* de genótipos de alface, Paris White e Red Salad Bowl, avaliando a indução dos calos embriogênicos, regeneração dos embriões somáticos e posterior conversão em plantas. Para a indução de embriogênese somática, duas fontes de explante (folhas cotiledonares inteiras e seccionadas) foram cultivadas em meio MS+10,75µM de ANA+0,89µM de BA. A proliferação dos calos embriogênicos foi realizada em meio MS+24µM de AIA+0,15µM de BA. Para a maturação dos embriões somáticos e conversão em plantas, utilizou-se meio MS sem regulador de crescimento (semi-sólido sem carvão ativado e com carvão ativado e meio líquido). A fonte do explante seccionada foi estatisticamente superior apenas para o genótipo Paris White. Para a regeneração dos embriões somáticos, observou-se que, no genótipo Paris White, o meio líquido foi superior estatisticamente, quando comparado aos meios semi-sólidos e, para o genótipo Red Salad Bowl, foi o meio semi-sólido com acréscimo de carvão ativado. Tendo em vista o potencial da aplicabilidade comercial da embriogênese somática para a produção em larga escala de plântulas de alface do genótipo Paris White, os protocolos de indução, proliferação, maturação dos embriões somáticos e conversão em plantas, foram adequados, em especial, em sistema líquido.

Palavras-chave: *Lactuca sativa*, embrião somático, micropropagação.

ABSTRACT

In vitro propagation via somatic embryogenesis is an efficient alternative to large-scale propagation of plant

material. Nevertheless, there are no reports of development of complete somatic embryogenesis protocols, with plant production of lettuce. This study aimed to establish lettuce *in vitro* propagation of Paris White and Red Salad Bowl genotypes, evaluating embryogenic callus induction, somatic embryos regeneration and subsequent conversion into plants. For somatic embryogenesis induction, two sources of explants (whole and sectioned cotyledons) were grown on MS medium containing 10.75µM NAA and 0.89µM BA. Callus proliferation occurred in MS medium supplemented with 24µM AIA and 0.15µM BA. For somatic embryos maturation and conversion into plants, we used MS medium devoid of growth regulator under three conditions: semi-solid medium with and without activated charcoal, and liquid medium. The sectioned explant source was statistically superior only for genotype Paris White. For somatic embryos regeneration, we observed that, in genotype Paris White, the liquid medium was statistically higher than semi-solid media, and for genotype Red Salad Bowl, activated charcoal-added semi-solid medium was the better. Considering the potential commercial applicability of somatic embryogenesis for seedlings mass production of lettuce Paris White genotype, somatic embryos induction, proliferation, maturation and conversion into plants protocols were adequate, especially in liquid system.

Key words: *Lactuca sativa*, somatic embryo, micropropagation.

INTRODUÇÃO

Alface (*Lactuca sativa*) é uma olerícola pertencente à família *Asteraceae*, tribo *Chicoreae*, e originária do Mediterrâneo, sendo esta uma das primeiras hortaliças cultivadas pelo homem (RYDER,

¹Universidade Federal de Viçosa (UFV), Av. P. H. Rolfs, s/n, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: macvini@gmail.com. *Autor para correspondência.

¹¹Departamento de Fitotecnia, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, UFV, Viçosa, MG, Brasil.

1986). É uma importante olerícola cultivada comercialmente em vários países, como: China, Estados Unidos da América (EUA), Itália, Índia, Espanha, Japão e França, sendo estes os principais países produtores (FAOSTAT, 2009). No Brasil, a alface é uma das olerícolas de maior volume de comercialização, ocupando a oitava posição entre as hortaliças (FELTRIM et al., 2009).

A alface tem sido propagada *in vitro* mediante a utilização, principalmente, de folhas cotiledonares como fonte de explantes de plantas germinadas *in vitro*. Alguns autores relatam a regeneração *in vitro* de diferentes genótipos de alface por meio da indução de organogênese (XINRUN & CONNER, 1992; AMPOMAH-DWAMENA et al., 1997; HUNTER & BURRITT, 2002; KANAMOTO et al., 2006; FRANKLIN et al., 2011; MOHEBODINI et al., 2011). Já para a via embriogênica, ZHOU et al. (1992); STUART & MCCALL (1992) e NOLAN et al. (2009) induziram apenas a produção de calos embriogênicos de *L. sativa* L., no entanto, SEABROOK & DOUGLASS (2000) induziram e proliferaram os calos embriogênicos produzidos.

A embriogênese somática é uma alternativa eficiente para a propagação *in vitro* em larga escala do material vegetal e representa uma solução para os problemas da propagação tradicional, como transmissão de doenças (KARIM & AHMED, 2010). No entanto, para a espécie estudada, não há relatos do desenvolvimento de protocolos completos e eficientes de embriogênese somática, com produção de plantas.

O objetivo do trabalho foi estabelecer a propagação *in vitro* para duas cultivares de alface (*Lactuca sativa*) via embriogênese somática, avaliando, em relação a cada genótipo, a indução das culturas embriogênicas, maturação e conversão de plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

Estabelecimento *in vitro* dos genótipos de alface

Utilizou-se, como material vegetal, sementes de dois genótipos de alface (*Lactuca sativa* L.), cvs. 'Paris White' e 'Red Salad Bowl'. Para a desinfestação, as sementes foram mergulhadas em etanol (70%) por 30 segundos e transferidas para uma solução de NaClO (1%), acrescida de duas gotas de Tween 20, por 20 minutos, e, em seguida, lavadas três vezes em água destilada esterilizada, modificado de AMPOMAH-DWAMENA et al. (1997).

Após a desinfestação das sementes de cada genótipo, estas foram inoculadas separadamente em placas de Petri de 90x15mm (J. Prolab, Brasil), contendo 25mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com metade da força de sais, acrescido de 30g L⁻¹ de

sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol e 6,5g L⁻¹ de ágar gel (Sigma®), modificado de AMPOMAH-DWAMENA et al. (1997). O pH foi ajustado para 5,7 anteriormente à autoclavagem, sendo inoculadas dez sementes por placa, com 15 placas para cada genótipo. O material foi mantido por sete dias em sala de crescimento, à temperatura de 25±2°C, sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 36µmol m⁻² s⁻¹.

Indução de embriogênese somática

Os explantes foram obtidos a partir do seccionamento de plantas de alface germinadas *in vitro*. Utilizaram-se, como explantes, folhas cotiledonares inteiras (Figura 1A) e seccionadas transversalmente dos dois genótipos (Figura 1B), sendo inoculados com a superfície abaxial em contato com o meio. Foram inoculados em placas de Petri contendo 25mL de meio de cultura MS, acrescido com 10,75µM de ácido naftalenoacético (ANA), 0,89µM de 6-benziladenina (BA), segundo ZHOU et al. (1992), e 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol e solidificado com 6,5g L⁻¹ de ágar gel (Sigma®). O pH foi ajustado para 5,7, anteriormente à autoclavagem. O material vegetal foi mantido por 28 dias em sala de crescimento, a 25±2°C, no escuro.

Proliferação dos calos embriogênicos

Buscando-se a estabilização da capacidade embriogênica e proliferação dos calos embriogênicos, induzidos na fase anterior, adotou-se a subdivisão de dez calos em placas de Petri contendo 25mL de meio MS, suplementado com 24µM de ácido indolacético (AIA), 0,15µM de BA, 100mg L⁻¹ de mio-inositol e 30g L⁻¹ de sacarose, modificado de SEABROOK & DOUGLASS (2000), solidificado com 6,5g L⁻¹ de ágar gel (Sigma®) e pH ajustado para 5,7 anteriormente à autoclavagem. O material vegetal foi mantido por 21 dias em sala de crescimento, a 25±2°C, sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 36µmol m⁻² s⁻¹.

Maturação dos embriões somáticos e conversão em plantas

Os calos embriogênicos, provenientes da fase de proliferação, foram subdivididos e inoculados em meio MS acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose e 100mg L⁻¹ de mio-inositol, com e sem 1g L⁻¹ de carvão ativado (apenas para o meio semi-sólido). Os calos embriogênicos foram cultivados em Erlenmeyers de 125mL, contendo 25mL de meio de cultura líquido, e também em placas de Petri, contendo 25mL, solidificado com 6,5g L⁻¹ de ágar gel (Sigma®). O pH dos meios de cultura foram ajustados para 5,7 antes da autoclavagem. O material vegetal foi mantido por 21 dias em sala de crescimento, a 25±2°C, sob fotoperíodo de 16 horas

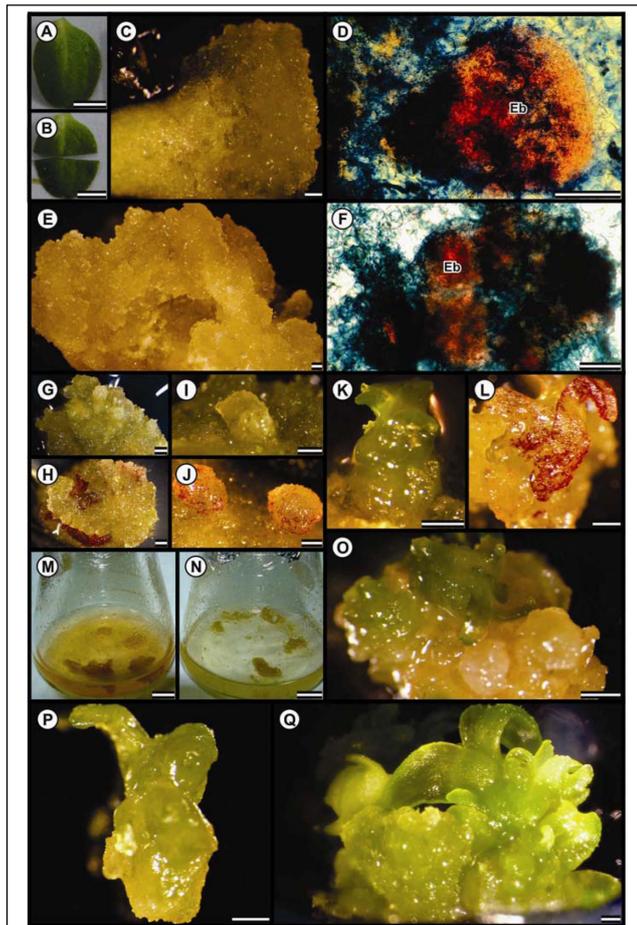


Figura 1 - Propagação *in vitro* de cultivares de *Lactuca sativa* L., ‘Paris White’ (C; D; G; I; K; N; O; P; Q) e ‘Red Salad Bowl’ (E; F; H; J; L) via embriogênese somática. (A; B) Explantes de folhas cotiledonares inteiras e seccionadas, respectivamente. (C; E) Formação de calos embriogênicos dos genótipos de alface induzidos em meio MS acrescido com 10,75 μ M de ANA e 0,8930 μ M de BA, após 28 dias. (D; F) Culturas embriogênicas de genótipos contendo embrião em estágio globular com coloração vermelha, revelando características embriogênicas. (G; H) Proliferação dos calos embriogênicos de genótipos de alface, após 21 dias de cultivo em meio MS acrescido de 24 μ M de AIA, 0,15 μ M de BA. (I; J) Embriões somáticos dos genótipos Paris White e Red Salad Bowl, respectivamente, em início de maturação. (K; L) Embriões somáticos dos genótipos Paris White e Red Salad Bowl, respectivamente, no final da maturação, com formação de plantas. (M; N) Explante inicial (tempo zero): calos embriogênicos dos genótipos Paris White e Red Salad Bowl, respectivamente, inoculados em meio MS líquido sem regulador de crescimento, por 21 dias. (O) Calo embriogênico com presença de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento, de globular até estágio de maturação. (P) Explante final: Maturação de embrião somático em planta de *L. sativa* L. (Q) Plantas de *L. sativa* L. em meio MS semi-sólido no final do processo. Eb: embriões. Barras: A; B: 2,5mm, D; F: 250 μ M, C; E; G; H; I; J; K; L; O; P; Q: 500 μ M, M; N: 10mm.

com irradiância de $36\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No entanto, o meio líquido permaneceu sob agitação orbital a 100rpm. Foram utilizadas 30 placas de Petri, sendo 15 placas para cada genótipo e 10 Erlenmeyers, sendo cinco para cada genótipo.

Procedimentos estatísticos

Para a fase de indução de embriogênese somática, os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 2×2 , sendo dois genótipos de *L. sativa* L. (Paris White e Red Salad Bowl) e duas fontes de explante (folhas cotiledonares inteiras e seccionadas), com cinco repetições, e a unidade experimental constituída por dez explantes/placa, totalizando 50 explantes/tratamento. As respostas morfogenéticas dos explantes foram avaliadas aos 28 dias quanto à presença de calos embriogênicos.

Para a maturação dos embriões somáticos e conversão em plantas, os tratamentos foram dispostos em DIC, em arranjo fatorial 2×3 , sendo dois genótipos de *L. sativa* L. e três condições de cultivo (meio MS semi-sólido sem carvão ativado; com 1g L^{-1} de carvão ativado e meio líquido MS), além de cinco repetições, sendo a unidade experimental constituída por dez explantes/placa, totalizando 50 explantes/tratamento (nos tratamentos com o meio semi-sólido), e, para o meio MS líquido, a unidade experimental foi constituída por cinco explantes/Erlenmeyers, totalizando 25 explantes/tratamento. As respostas morfogenéticas dos explantes foram avaliadas aos 21 dias quanto ao número de embriões somáticos por calo e número de plantas convertidas por calo.

Todos os procedimentos estatísticos foram analisados no programa Sisvar (FERREIRA, 2003).

Procedimentos morfológicos e identificação de calos embriogênicos

Para o experimento de indução de embriogênese somática, a identificação de calos embriogênicos foi avaliada por meio da dupla coloração com carmim acético (2%) e azul de Evans (0,1%) (DURZAN, 1988). A captura das imagens foi realizada em microscópio de luz (Jenaval da Zeiss). Para as análises morfológicas utilizaram microscópio estereoscópio (modelo Olympus SZX), com sistema de captura de imagens acoplado (modelo Olympus E-330) para os demais registros fotográficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Germinação das sementes e indução de embriogênese somática

No presente estudo, após a germinação das sementes dos dois genótipos de *L. sativa* L., Paris White

e Red Salad Bowl, constatou-se uma germinação de 86,3% e 95,7%, respectivamente (Figura 2A).

Na análise de variância da indução de calos embriogênicos, nos genótipos Paris White e Red Salad Bowl de *L. sativa* L. (Figura 1C e 1E, respectivamente), diferenças estatísticas não foram constatadas, a 5% de probabilidade pelo teste F. No entanto, o explante mais competente para a indução de calos embriogênicos, no genótipo Paris White, foi folha cotiledonar seccionada transversalmente, sendo esta diferente estatisticamente do explante de folha cotiledonar inteira. Para o genótipo Red Salad Bowl, não houve diferença estatística entre as fontes de explantes (Figura 2B). Os calos produzidos nos genótipos eram friáveis, de coloração amarelo-pardo e crescimento radial.

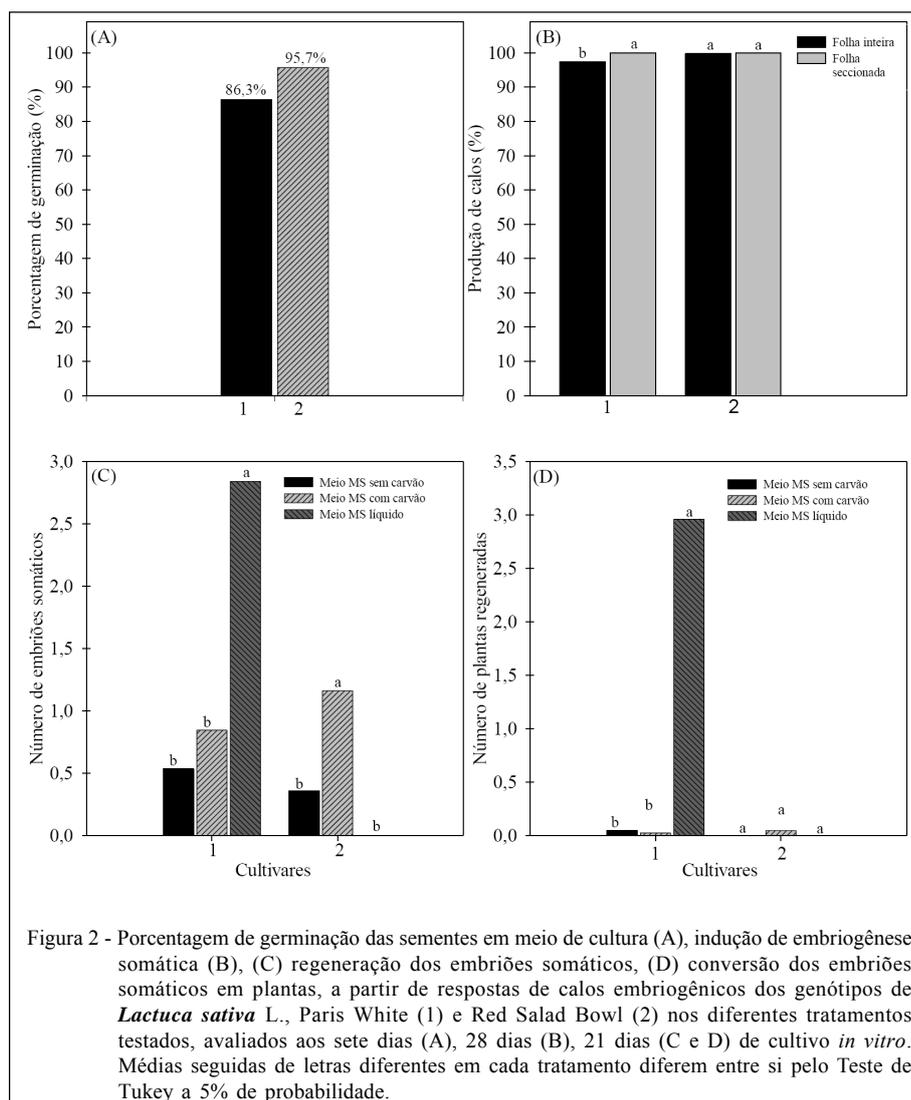
ZHOU et al. (1992) e NOLAN et al. (2009) também tiveram sucesso ao induzir calos embriogênicos a partir de folhas cotiledonares de alface cultivados em meio MS suplementado com $10,75\mu\text{M}$ de ANA e $0,89\mu\text{M}$ de BA. STUART & MCCALL (1992) induziram embriogênese somática em secções de hipocótilo e folhas cotiledonares de alface mantidos em meio MS acrescido de 6-furfurilaminopurina (CIN) e um análogo de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Pode-se observar que folhas cotiledonares de alface possuem elevada resposta à morfogênese *in vitro*, tanto para embriogênese somática (STUART & MCCALL, 1992; ZHOU et al., 1992; NOLAN et al., 2009) quanto para organogênese, quando se utilizam cotilédones inteiros (HUNTER & BURRITT, 2002; KANAMOTO et al., 2006; FRANKLIN et al., 2011) ou folhas cotiledonares seccionadas (HUNTER & BURRITT, 2004).

HUNTER & BURRITT (2002) demonstraram ainda não haver diferenças significativas entre os genótipos de alface para a produção de brotos. Diferente do que foi observado por AMPOMAH-DWAMENA et al. (1997), os quais induziram a organogênese a partir de folhas cotiledonares inteiras e seccionadas de diferentes genótipos de alface.

No presente artigo, realizou-se a identificação de calos embriogênicos, a partir da dupla coloração com carmim acético e azul de Evans, para comprovar a natureza embriogênica dos calos produzidos. Dessa forma, observou-se que os calos produzidos nos genótipos de *L. sativa* L. Paris White e Red Salad Bowl reagiram fortemente ao carmim acético, revelando possuírem características embriogênicas, e não apenas massas calosas (Figuras 1D e 1F, respectivamente).

Já na fase de proliferação dos calos embriogênicos, foi possível observar o início da maturação dos embriões somáticos, no caso do



genótipo Paris White (Figura 1G), até a completa maturação dos embriões em plantas do genótipo Red Salad Bowl (Figura 1H), após 21 dias de cultivo, antes mesmo de submeter os calos no meio de cultura para maturação e conversão em plantas.

Maturação dos embriões somáticos e conversão em plantas

Na análise de variância, as interações das fontes de variação (genótipos e condições de cultivo) foram significativas, a 5% de probabilidade pelo teste F, para as variáveis analisadas número de embriões somáticos por calo e número de plantas convertidas por calo.

Após 21 dias de cultivo, para a regeneração de embriões somáticos, observou-se que, para o genótipo Paris White, os meios semi-sólidos com e

sem carvão (Figura 1I) foram inferiores estatisticamente ao meio líquido. Para o genótipo Red Salad Bowl, o meio semi-sólido com acréscimo de carvão ativado foi superior estatisticamente aos meios líquido e semi-sólido sem carvão (Figura 1J; 2C). Foi possível observar a ocorrência de conversão dos embriões somáticos em plantas nos dois genótipos de alface, Paris White e Red Salad Bowl, inoculados em meio semi-sólido (Figura 1K e 1L, respectivamente).

Após a maturação completa dos embriões somáticos, as plantas regeneradas do genótipo Paris White, produzidas em meio semi-sólido, foram subcultivadas em meio MS semi-sólido sem regulador de crescimento e mantidas nas mesmas condições da fase anterior.

Para a conversão dos embriões somáticos em plantas, observou-se que, no genótipo Red Salad

Bowl, o meio líquido não apresentou diferenças significativas aos meios semi-sólidos com e sem carvão, sendo encontradas médias bem baixas de conversão em plantas (Figura 2D). Para a conversão dos embriões somáticos em plantas, do genótipo Paris White, o meio líquido foi superior estatisticamente aos meios semi-sólido com e sem carvão.

Foi possível observar que a conversão dos embriões somáticos em plantas ocorreu diretamente no calo (Figura 1O), ou mesmo em embriões liberados no meio de cultura líquido (Figura 1P). Após a conversão em plantas do genótipo Paris White, produzidas em meio líquido, estas foram transferidas para meio MS semi-sólido sem regulador de crescimento (Figura 1Q).

Para a fase de maturação e conversão em plantas dos genótipos de alface, foi possível observar que o genótipo Paris White foi superior quando comparado ao Red Salad Bowl, comprovando que o genótipo é um importante fator para capacitar a resposta das espécies em condições de cultivo *in vitro* (HUNTER & BURRITT, 2002). Confirmado no presente trabalho e por MOHEBODINI et al. (2011) que a morfogênese *in vitro* de *L. sativa* L. é genótipo dependente. Como observado por AMPOMAH-DWAMENA et al. (1997), induzindo a organogênese, a produção de brotos por explante foi maior no genótipo Paris White, quando comparado ao Red Salad Bowl.

A variação entre os genótipos pode estar relacionada com o potencial regenerativo dos brotos adventícios em condições *in vitro* (XINRUN & CONNER, 1992; AMPOMAH-DWAMENA et al., 1997). O mesmo fato foi observado no presente trabalho, em que o genótipo Paris White teve maior potencial regenerativo dos embriões somáticos com posterior conversão das plantas, quando em meio líquido. Já para o genótipo Red Salad Bowl, o meio semi-sólido com acréscimo de carvão ativado teve maior potencial regenerativo dos embriões somáticos, quando comparado às demais condições de cultivo.

Outra possibilidade para a queda do potencial regenerativo do genótipo Red Salad Bowl em meio líquido pode ser explicada devido à liberação de antocianina ao meio de cultura, sendo esta produzida a partir de sete dias de cultivo na presença de luz, e maior acúmulo aos 14 dias (Figura 1M). Em *Vaccinium macrocarpon* Ait, o acúmulo de antocianina nas culturas de calos ocorre quando expostas à luz, alcançando a máxima concentração aos 12 dias de cultivo (MADHAVI et al., 1995).

A adoção de um sistema líquido torna-se eficiente para a produção elevada de embriões somáticos, favorecendo a propagação em larga escala das culturas (CASTILLO et al., 1998; YANG et al., 2010),

tornando bastante apropriado a utilização desta técnica em escala industrial. No entanto, não se tem relatos na literatura de culturas de alface em suspensão, para a conversão de embriões somáticos em plantas. MALIK (2008) obteve uma maior produção de embriões somáticos de *Narcissus* L. em meio líquido, quando comparado com o meio semi-sólido. YANG et al. (2010) cultivaram explantes de raiz, hipocótilo e cotilédono de *Brassica oleracea* L. var. *italica* para a indução de embriogênese somática, em cultura líquida, sendo este mais efetivo quando comparado ao meio semi-sólido. Já CASTILLO et al. (1998) compararam a maturação de embriões somáticos e posterior regeneração em plantas de *Carica papaya* L. produzidos em meio semi-sólido e meio líquido, no qual relataram que o meio líquido é mais efetivo para a propagação massiva da cultura, podendo ser utilizado para a automação, por meio da propagação por biorreatores. Ele pode ser empregado no presente trabalho, para a cultura da alface.

CONCLUSÃO

Tendo em vista o potencial da aplicabilidade comercial da embriogênese somática para a produção em larga escala de plântulas de alface do genótipo Paris White, os protocolos de indução, proliferação, maturação dos embriões somáticos e conversão em plantas foram adequados, em especial, em sistema líquido, sendo este eficaz para a eficiente maturação dos embriões somáticos e conversão em plantas em curto espaço de tempo (21 dias).

Para o desenvolvimento dos embriões somáticos e conversão em plantas, do genótipo Red Salad Bowl, é necessário a passagem por meio semi-sólido acrescido de carvão ativado, além de aumentar o tempo de cultivo (21 dias).

REFERÊNCIAS

- 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 jun. 2011. doi: 10.1016/S0304-4238(97)00098-8.
- CASTILLO, B. et al. Liquid System scale up of *Carica papaya* L. somatic embryogenesis. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.73, p.307-311, 1998.
- DURZAN, D.J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: HALLGREN, J.E. **Frans symposium department of forest genetics and plant physiology**. Swedish: University of Agricultural Sciences, 1988. p.147-186.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics). **Top production - Lettuce and chicory**, 2009. Acesso em: 24 out. 2011. Online. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>.

- 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 jun. 2011.
- FERREIRA, D.F. **Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de experimentos**. SISVAR 5.0 (Build 67). 2003. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>>. Acesso em: 26 jun. 2010.
- 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>. Acesso em: 20 jun. 2011. doi: 10.5511/plantbiotechnology.10.1208a.
- 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 mar. 2011. doi: 10.1016/S0304-4238(02)00044-4.
- HUNTER, D.C.; BURRITT, D.J. Light quality influences adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.40, p.215-220, 2004. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/k873976455500217/>>. Acesso em: 12 mar. 2011. doi: 10.1079/IVP2003492.
- KANAMOTO, H. et al. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. 'Cisico' (lettuce) plastids. **Transgenic Research**, v.15, p.205-217, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/d01546015251026w/>>. Acesso em: 18 mar. 2011. doi: 10.1007/s11248-005-3997-2.
- 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 mar. 2011.
- MADHAVI, D.L. et al. Expression of anthocyanins in callus cultures of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait). **Journal of Food Science**, v.60, p.351-355, 1995. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1995.tb05671.x/abstract>>. Acesso em: 20 jun. 2011. doi: 10.1111/j.1365-2621.1995.tb05671.x.
- MALIK, M. Comparison of different liquid/solid culture systems in the production of somatic embryos from *Narcissus* L. ovary explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.94, p.337-345, 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/j81j7348682k7111/>>. Acesso em: 15 jun. 2011. doi: 10.1007/s11240-008-9415-8.
- 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>. Acesso em: 21 mar. 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- 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 jun. 2011. doi: 10.1093/jxb/erp046.
- RYDER, E.J. Lettuce breeding. In: BASSETT, M.J. **Breeding vegetable crops**. Conn: AVI Publishing Westport, 1986. Cap.12, p.433-474.
- SEABROOK, J.; DOUGLASS, L.K. **Regeneration of somatic embryos from plant tissues**. US. Pat. 6071746, 2000. 14p.
- SEABROOK, J. et al. PATENT, U. S. **Canadá**: Agriculture and Agri-Food Canada. 6,071,746: 1-14p. 2000.
- 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: 15 mar. 2011. doi: 0032-0889/92/99/0111/08/\$01.00/0.
- XINRUN, Z.; CONNER, A.J. Genotypic effects on tissue culture response of lettuce cotyledons. **Journal of Genetic Breeding**, v.46, p.287-290, 1992.
- YANG, J.L. et al. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.100, p.49-58, 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/137t120k70t21270/>>. Acesso em: 25 jun. 2011. doi: 10.1007/s11240-009-9615-x.
- 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.