**REGENERAÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DE PROTOPLASTOS
DE ALFAFA (*Medicago sativa* L.) E OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA
DE FUSÃO QUÍMICA ENTRE *M. sativa* L. e *M. arborea* L.**

MARIZA MONTEIRO

Bióloga

Orientadora: Profa. Dra. **MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Dezembro/2000

ERRATA

REGENERAÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DE PROTOPLASTOS DE ALFAFA (*Medicago sativa* L.) E OTIMIZAÇÃO DA FUSÃO QUÍMICA ENTRE *M. sativa* L. e *M. arborea* L.

<i>Página</i>	<i>item</i>	<i>linha</i>	<i>onde se lê</i>	<i>leia-se</i>
6	2.2.1.	2º Par. 4ª/5ª L.	A primeira tentativa de se isolar protoplastos foi feita por KLERCKER, em 1982...	A primeira tentativa de se isolar protoplastos foi feita por Klercker, em 1892...
6	2.2.1.	2º Par. 6ª L.	...(FUNGARO & VIEIRA, 1989)...	...(revisão de FUNGARO & VIEIRA, 1989)...
6	2.2.1.	3º Par. 3ª/4ª L.	...(ALVES, 1996)...	...(revisão de ALVES, 1996)...
8	2.2.1.	2º Par. 7ª L.	KAO & MICHAYLUK (1980) regeneraram plantas...	KAO & MICHAYLUK (1980) regeneraram plantas...
11	2.2.1.	Linhas 3-4-5	...A regeneração de plantas de <i>M. arborea</i> tem sido como sendo organogênese.	...A regeneração de plantas de <i>M. arborea</i> tem sido relatada sendo a via organogênica.
11	2.2.1.	3ª Par. 4ª L.	... redução de nitrogênio...	... nitrogênio reduzido...
12	2.2.1.	Linhas 6-7	... redução de nitrogênio...	... nitrogênio reduzido...
13	2.2.1.1.	2º Par. 9ª L.	... não se mostraram competentes...	... não se mostraram totalmente competentes...
16	2.3.	1º Par. 3ª/4ª L.	...(VIEIRA & APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2000)...	...(VIEIRA & APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2001)...
17	2.3.	1º Par. 3ª/4ª L.	...(VIEIRA & APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2000)...	...(VIEIRA & APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2001)...
19	3.1	Linhas 1-2	Foram realizadas inoculações <i>in vitro</i> de sementes de <i>M. sativa</i> var. Rangelander, oriundas da Austrália (CSIRO, Division of Plant Industry)...	Foram realizadas inoculações <i>in vitro</i> de sementes de <i>M. sativa</i> var. Rangelander, cedidas pelo Dr. Phil Larkin, do CSIRO, Division of Plant Industry, Austrália.

19	3.1	Linhas 2-3-4	... e de <i>M. sativa</i> var. Crioula, Alfa 200, Valley Plus e Semit 921, oriundas da Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho, SP...	... e de <i>M. sativa</i> var. Crioula, Alfa 200, Valley Plus e Semit 921, oriundas da Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho, do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, SP...
21	3.2	1º Par. 1ª L.	Para a manutenção da osmolaridade...	Para a redução da osmolaridade...
21	3.2	2º Par. 8ª/9ª L.	...a formação de estruturas diferenciadas.	...a formação de estruturas diferenciadas. Avaliação idêntica a anterior.
23	3.4.1.	Linha 4	1) Meio líquido K8P, por 60 dias,...	1) Meio líquido K8, por 60 dias,...
23	3.4.1.	Linhas 6-7	...em meio SHb (WALKER, <i>et al.</i> , 1979)...	...em meio SHb (SCHENK & HILDEBRANDT, 1972, modificado por ATANASSOV & BROWN, 1984)...
24	3.4.1.	1º Par. 1ª/2ª/3ª L.	Calos derivados de protoplastos de ambos os explantes, das variedades Crioula, Alfa 200, Valley Plus e Semit 921, foram submetidos aos seguintes tratamentos:	Calos derivados de protoplastos de ambos os explantes, aos 28 dias de cultivo, das variedades Crioula, Alfa 200, Valley Plus e Semit 921, foram submetidos aos seguintes tratamentos:
24	3.4.1.	2º Par. 4ª/5ª L.	...de meio A (TÉOULÉ & DATTÉE, 1987) líquido, contendo 10g/L de amido solúvel...	...de meio A (TÉOULÉ & DATTÉE, 1987) líquido, sem fitorreguladores, contendo 10g/L de amido solúvel...
24	3.4.1.	2º Par. 9ª/10ª L.	...em meio A, líquido, sem a presença de amido solúvel;	...em meio A, líquido, sem a presença de amido solúvel e fitorreguladores;
28	3.9.1.	1º Par. 5ª/6ª L.	O sobrenadante foi retirado e a ele foi adicionado...	O sobrenadante foi retirado e ao "pellet" foi adicionado...
28	3.9.1.	1º Par. 8ª/9ª L.	... CPW-13 (em mL): 0,25; 0,5; 1,0; 1,0 e 1,5.	... CPW-13 (em mL): 0,25; 0,5; 1,0 (2 vezes) e 1,5.
33	4.2.	Linha 3	Figura 1- ...a) protoplastos recém isolados, sem a parede vegetal (400x);...	Figura 1- ...a) protoplastos recém isolados (400x);...

36	4.2.	Linhas 1-2	...enquanto a variedade Rangelandier mostrou-se melhor quando foram utilizados explantes foliares.	...enquanto a variedade Rangelandier mostrou-se melhor quando foram utilizados explantes foliares, em comparação com os demais genótipos.
43	4.2.	1 ^o Par. 8 ^a /9 ^a L.	... nos tratamentos nos quais o NAA foi ausente não observou-se divisão celular.	... nos tratamentos 8 e 10, nos quais o NAA foi ausente não observou-se divisão celular.
46	4.2.	Linha 2	Figura 7- ...microcolônias derivadas de protoplastos de <i>M. sativa</i> var. Semit 921.	Figura 7- ...microcolônias derivadas de protoplastos de explantes cotiledonares de <i>M. sativa</i> var. Semit 921.
47	4.3.1.	2 ^o Par. 6 ^a /7 ^a L.	...Plantas das variedades Answer e Regen S foram obtidas.	...Plantas das variedades Answer e Regen S foram obtidas a partir de protoplastos.
61	4.8.2.	1 ^o Par. 5 ^a /6 ^a L.	...Foram então ressuspensos à uma população de 3×10^5 protoplastos de <i>M. sativa</i> e $1,5 \times 10^5$ protoplastos de <i>M. arborea</i> /mL de PEG.	...Foram então ressuspensos à uma população de $3,0 \times 10^5$ protoplastos de <i>M. sativa</i> e $1,5 \times 10^5$ protoplastos de <i>M. arborea</i> /mL de PEG a 20, 30 e 35%.
63	4.8.2.	Linha 1	Tabela 11: Frequência de heterocáries formados, com as respectivas viabilidades,...	Tabela 11: Frequência de heterocáries formados, com as viabilidades celulares,...
63	4.8.2.	Linha 2	Tabela 11- ... oriundos da fusão entre protoplastos de <i>M. sativa</i> e <i>M. arborea</i> .	Tabela 11- ... oriundos da fusão entre protoplastos de <i>M. sativa</i> var. Rangelandier e <i>M. arborea</i> .

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Monteiro, Mariza

Regeneração de plantas a partir de protoplastos de alfafa (*Medicago sativa* L.) e
otimização da técnica de fusão química entre *M. sativa* L. e *M. arborea* L. / Mariza
Monteiro. - - Piracicaba, 2000.

83 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.

Bibliografia.

1. Alfafa 2. Embriogênese somática 3. Fusão de protoplasto 4. Híbridação somática
5. Isolamento 6. Leguminosa forrageira I. Título

CDD 633.31

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

WALDOMIRO,

MIRIAM E

MARCUS

COM AMOR

DEDICO

-ANEXO 1-

Tabela 1: Meios de cultura utilizados para cultivo de protoplastos derivados de explantes cotiledonares de *M. sativa* var. Semit 921.

Tratamentos	Meio de cultura para protoplastos	Meio de cultura para células
controle	K8P	K8
1	K8P contendo 0,2 mg/L de 2,4-D; 0,5 mg/L de Zeatina e 1,0 mg/L de NAA	K8 contendo 0,2 mg/L de 2,4-D; 0,5 mg/L de Zeatina e 1,0 mg/L de NAA
2	K8P contendo 0,4 mg/L de 2,4-D; 1,0 mg/L de Zeatina e 2,0 mg/L de NAA	K8 contendo 0,2 mg/L de 2,4-D; 0,5 mg/L de Zeatina e 2,0 mg/L de NAA
3	K8P contendo 0,6 mg/L de 2,4-D; 1,5 mg/L de Zeatina e 3,0 mg/L de NAA	K8 contendo 0,3 mg/L de 2,4-D; 0,75 mg/L de Zeatina e 3,0 mg/L de NAA
4	K8P contendo 0,8 mg/L de 2,4-D; 2,0 mg/L de Zeatina e 4,0 mg/L de NAA	K8 contendo 0,4 mg/L de 2,4-D; 1,0 mg/L de Zeatina e 4,0 mg/L de NAA
5	K8P	K8 sem 2,4-D
6	K8P	K8 sem 2,4-D e NAA
7	K8P	K8P e K8 sem 2,4-D
8	K8P	K8P e K8 sem 2,4-D e NAA
9	K8P sem 2,4-D	K8 sem 2,4-D
10	K8P sem 2,4-D e NAA	K8 sem 2,4-D e NAA

-ANEXO 2-

1. Incluir nas REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

SCHENK, R. U.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**. v. 50, p. 199-204, 1972.

-ANEXO 3-

Meio K8P (Fórmula para 500 mL de meio 2x concentrado)

a. Sais minerais (mg)

NH ₄ NO ₃	600,0	KI	0,75
KNO ₃	1.900,0	H ₃ BO ₃	3,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	600,0	MnSO ₄ .H ₂ O	10,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	300,0	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,00
KH ₂ PO ₄	170,0	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
KCl	300,0	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Sequestrene 330 Fe	28,0	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025

b. Açúcares (mg)

Glicose	100.000,0	Manose	125,0
Sacarose	250,0	Rhamnose	125,0
Frutose	125,0	Celobiose	125,0
Ribose	125,0	Sorbitol	125,0
Xilose	125,0	Manitol	125,0

c. Ácidos orgânicos (mg)

Piruvato de sódio	5,0	Ácido málico	10,0
Ácido cítrico	10,0	Ácido fumárico	10,0

d. Vitaminas (mg)

Inositol	100,0	Biotina	0,005
Nicotinamida	1,0	Clorida colina	0,5
Piridoxina	1,0	Riboflavina	0,1
Tiamina	1,0	Ácido ascórbico	1,0
Pantotenato D-cálcio	0,5	Vitamina A	0,005
Ácido fólico	0,2	Vitamina D ₃	0,005
Ác. p-Aminobenzoico	0,01	Vitamina B ₁₂	0,01

e. Fitorreguladores (mg)

2,4-D	0,2
Zeatina	0,5
NAA	1,0

f. Caseína hidrolisada (mg)

g. Água de coco (mL)	10,0
----------------------	------

Meio K8

Idem ao descrito para o meio K8P exceto:

Glicose	10.000,0
Sacarose	20.000,0
2,4-D	0,1
Zeatina	0,2

Meio A.

a. Sais minerais (mg/L)

NH ₄ NO ₃	600,0	MnSO ₄ .H ₂ O	10,0
KNO ₃	2.200,0	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	295,0	H ₃ BO ₃	3,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	310,0	KI	0,75
KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	170,0	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
NaH ₂ PO ₄	75,0	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
(NH ₄) ₂ SO ₄	67,0		
Sequestrene 330 Fe	28,0		

b. Componentes orgânicos (mg/L)

mio-Inositol	100,0	Ac. cítrico	10,0
Ac. nicotínico	1,0	Ac. málico	10,0
Piridoxina	1,0	Ac. fumárico	10,0
Tiamina	10,0	N-Z amina	500,0
Piruvato de Sódio	5,0		

c. Carboidratos (mg/L)

Sacarose	25.000,0
Glicose	5.000,0
Xilose	250,0

Em todos os meios, acertar o pH 5.7 com NaOH e HCL 0,1N. Filtro esterilizar a vácuo, utilizando membrana (0,2 µm). Armazenar em frascos escuros, em alíquotas de 20 mL, à -20°C. No meio A foi acrescentado 10 mL/L de uma solução (1:1) de amido solúvel autoclavada.

Meio MS

a. Sais minerais (mg/L)

NH ₄ NO ₃	1.650,0	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
KNO ₃	1.900,0	ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,0	H ₃ BO ₃	6,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0	KI	0,83
KH ₂ PO ₄	170,0	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8 ¹	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA	37,3 ¹	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025

b. Componentes orgânicos (mg/L)

mio-Inositol	100,0
Ac. nicotínico	0,5
Piridoxina	0,5
Tiamina	0,1
Glicina	2,0

c. Carboidratos (mg/L)

Sacarose	30.000,0
----------	----------

¹ 5 mL/L de uma solução estoque contendo 5,57 g de FeSO₄.7H₂O e 7,45 g de Na₂EDTA/L de água destilada.

Meio UM

a. Sais minerais (mg/L)

NH ₄ NO ₃	1.650,0	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
KNO ₃	1.900,0	ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,0	H ₃ BO ₃	6,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0	KI	0,83
KH ₂ PO ₄	170,0	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8 ¹	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA	37,3 ¹	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025

b. Componentes orgânicos (mg/L)

mio-Inositol	100,0
Ac. nicotínico	5,0
Piridoxina	10,0
Tiamina	10,0
Glicina	2,0
Caseína hidrolizada	2.000,0

c. Carboidratos (mg/L)

Sacarose	30.000,0
----------	----------

d. Fitorreguladores mg/L

Cinetina	0,25
2,4-D	2,0

¹ 5 mL/L de uma solução estoque contendo 5,57 g de FeSO₄.7H₂O e 7,45 g de Na₂EDTA/L de água destilada.

Meio B5

a. Sais minerais (mg/L)

KNO ₃	2.500,0	MnSO ₄ .H ₂ O	10,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	150,0	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	250,0	H ₃ BO ₃	3,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	134,0	KI	0,75
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150,0	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25
Sequestrene 330 Fe	28,0	CuSO ₄	0,025
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025

b. Componentes orgânicos (mg/L)

mio-Inositol	100,0
Ac. nicotínico	1,0
Piridoxina	1,0
Tiamina	10,0

c. Carboidratos (mg/L)

Sacarose	20.000,0
----------	----------

Meio B5h

a. Sais minerais (mg/L)

KNO ₃	3.000,0	MnSO ₄ .H ₂ O	10,0
CaCl ₂	895,0	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	500,0	H ₃ BO ₃	3,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	134,0	KI	0,75
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150,0	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25
Sequestrene 330 Fe	28,0	CuSO ₄	0,025
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025

b. Componentes orgânicos (mg/L)

mio-Inositol	100,0
Ac. nicotínico	1,0
Piridoxina	1,0
Tiamina	10,0
L-glutamina	800,0
Serina	100,0
L-glutationa	10,0
Adenina	1,0

c. Carboidratos (mg/L)

Sacarose	30.000,0
----------	----------

d. Fitorreguladores (mg/L)

Cinetina	0,2
2,4-D	1,0

Meio SHb

a. Sais minerais (mg/L)

KNO ₃	2.500,0	MnSO ₄ .H ₂ O	10,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	200,0	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	400,0	H ₃ BO ₃	5,0
NH ₄ H ₂ PO ₄	300,0	KI	1,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	15,0 ¹	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,1
Na ₂ EDTA	20,0 ¹	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,2
		CoCl ₂ .6H ₂ O	0,1

b. Componentes orgânicos (mg/L)

mio-Inositol	1000,0
Ac. nicotínico	5,0
Piridoxina	0,5
Tiamina	5,0

c. Carboidratos (mg/L)

Sacarose	30.000,0
----------	----------

d. Fitorreguladores (mg/L)

Cinetina	1,0
2,4-D	11,0

¹ 2,7 mL/L de uma solução estoque contendo 5,57 g de FeSO₄.7H₂O e 7,45 g de Na₂EDTA/L de água destilada.

Meio BOI2y

a. Sais minerais (mg/L)

NH ₄ NO ₃	1.000,0	MnSO ₄ .H ₂ O	4,4
KNO ₃	100,0	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	35,0	H ₃ BO ₃	1,6
KH ₂ PO ₄	300,0	KI	0,8
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	347,0		
KCl	65,0		
Ferro ¹			

b. Componentes orgânicos (mg/L)

mio-Inositol	100,0
Ac. nicotínico	0,5
Piridoxina	0,1
Tiamina	0,1
Glicina	2,0
Extrato de levedura	2.000,0

c. Carboidratos (mg/L)

Sacarose	30.000,0
----------	----------

¹ Para a adição de ferro foi utilizado 4,3 mL/L de uma solução estoque contendo 5,57 g de FeSO₄.7H₂O e 7,45 g de Na₂EDTA em 500 mL de água destilada

Meio B1INK

a. Sais minerais (mg/L)

NH ₄ NO ₃	1.000,0	MnSO ₄	4,4
KNO ₃	1.000,0	ZnSO ₄	1,5
MgSO ₄	35,0	H ₃ BO ₃	1,6
KH ₂ PO ₄	300,0	KI	0,8
Ca(NO ₃) ₂	347,0		
KCl	65,0		
NaFeEDTA	32,0		

b. Componentes orgânicos (mg/L)

Ac. nicotínico	0,5
Piridoxina	0,1
Tiamina	0,1
Glicina	2,0

c. Carboidratos (mg/L)

Sacarose	30.000,0
----------	----------

d. Fitorreguladores mg/L

Cinetina	2,0
Ac. Indolacético	2,0
Ac. Naftalenoacético	2,0

Em todos os meios acertar o pH para 5,7 com NaOH e HCL 0,1N. Solidificar com 6,0 g.L⁻¹ de Agar (Sigma). Autoclavar a 120°C, 1 atm, 20 min. Distribuir 10 mL em placas de Petri com 20 mL de capacidade, no fluxo laminar, sob condições estéreis, exceto para o meio B1INK, no qual o pH foi ajustado para 5,8 e solidificado com 3,0 g/L de Phytigel (Sigma, p/v).

Solução salina CPW-13

Solução estoque A:

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		7,4 g
Água destilada deionizada	q.s.p	500,0 mL

Solução estoque B:

KH_2PO_4		136,0 mg
KNO_3		505,0 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		1,23 mg
KI		8,0 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		0,125 mg
Água destilada deionizada	q.s.p	500,0 mL

Juntar 50 mL dos estoques A e B, 110 mg de MES, 65 g de manitol e completar o volume para 500 mL com água destilada deionizada. Ajustar o pH para 5,7 com NaOH e HCL 0,1N. Distribuir 50 mL de CPW em frascos com 300 mL de capacidade. Autoclavar a 120°C, 1 atm, 20 min.

solução de PEG

30% (p/v) de polietileno glicol, pm 6000

4% (p/v) de sacarose

0.01M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Ajustar o pH para 5,7 com NaOH e HCL 0,1N. Autoclavar a 120°C, 1 atm, 20 min. e armazenar a 4°C, no escuro.

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seus sinceros agradecimentos:

- À Professora Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira, pela orientação, apoio e estímulo para a realização do presente trabalho.
- À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), particularmente ao Departamento de Genética, pela possibilidade de realizar o Mestrado.
- À Dra. Maria José Valarini, do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, SP, pelo apoio ao trabalho e colaboração na obtenção das sementes de alfafa.
- À Professora Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória, do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ, pela orientação nas análises histológicas dos materiais de alfafa e auxílio na documentação fotográfica.
- Aos professores que permitiram a utilização de equipamentos de seus laboratórios: Dr. Márcio de Castro Silva Filho (Genética–ESALQ), Dr. Luiz L. Coutinho (Produção Animal – ESALQ), Dra. Beatriz J. Mendes (Radiogenética – CENA).
- Ao Carlos Alberto de Oliveira e Marli Soares, pelo excelente e valioso auxílio durante a execução da parte experimental.
- À Maria, Adriana, Vera, Ilene, Luciana, Lissandra, Lucianinha, Juliana, Ricardo, Adriano, Michel, Monalisa, Bete e Heiko, por todos estes anos de convívio, apoio e amizade inestimáveis.
- Aos meus pais, Waldomiro e Miriam, à toda a minha família e ao Marcus, pela compreensão e apoio constantes.
- À Fundação e Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.
- Aos funcionários do Departamento de Genética (ESALQ).
- Aos meus colegas do Programa de Pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	x
SUMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Germinação e cultivo de sementes de <i>Medicago sativa</i>	19
3.2. Isolamento e cultura de protoplastos de <i>M. sativa</i>	19
3.3. Análises histológicas das estruturas diferenciadas derivadas de protoplastos de <i>M. sativa</i> var. Rangelander e var. Semit 921.....	23
3.4. Cultura de calos derivados de protoplastos de <i>M. sativa</i> : Indução de embriogênese somática e organogênese.....	23
3.4.1. Indução de embriogênese somática.....	23
3.4.2. Indução de organogênese.....	25
3.5. Germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>M. arborea</i>	25
3.6. Otimização de isolamento de protoplastos de <i>M. arborea</i>	25
3.7. Indução de calos a partir de explantes foliares de <i>M. sativa</i> var. Rangelander.....	26
3.8. Isolamento de protoplastos derivados de calos de <i>M. sativa</i> var. Rangelander.....	26

	Página
3.9. Otimização da fusão química entre protoplastos de <i>M. sativa</i> e <i>M. arborea</i>	27
3.9.1. Fusão entre protoplastos oriundos de pétalas de <i>M. sativa</i> var. Valley Plus e de explantes foliares de <i>M. arborea</i>	27
3.9.2. Fusão entre protoplastos oriundos de calos de <i>M. sativa</i> var. Rangelander e de explantes foliares de <i>M. arborea</i>	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1. Germinação e cultivo de sementes de <i>M. sativa</i>	30
4.2. Isolamento e cultura de protoplastos de <i>M. sativa</i>	30
4.3. Cultura de calos derivados de protoplastos de <i>M. sativa</i> : indução de embriogênese somática e organogênese.....	47
4.3.1. Indução de embriogênese somática.....	47
4.3.2. Indução de organogênese.....	49
4.4. Germinação de sementes <i>in vitro</i> de <i>M. arborea</i>	53
4.5. Otimização do isolamento de protoplastos de <i>M. arborea</i>	54
4.6. Indução de calos a partir de explantes foliares de <i>M. sativa</i> var. Rangelander.....	55
4.7. Isolamento de protoplastos derivados de calos de <i>M. sativa</i> var. Rangelander.....	56
4.8. Otimização da fusão química entre protoplastos de <i>M. sativa</i> e <i>M. arborea</i>	57
4.8.1. Fusão entre protoplastos oriundos de pétalas de <i>M. sativa</i> var. Valley Plus e de explantes foliares de <i>M. arborea</i>	57
4.8.2. Fusão entre protoplastos oriundos de calos de <i>M. sativa</i> var. Rangelander e de explantes foliares de <i>M. arborea</i>	61
5. CONCLUSÕES.....	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
7. APÊNDICES.....	82

LISTA DE FIGURAS

Página

1. Processo de desenvolvimento de microcolônias a partir de protoplastos derivados de explantes cotiledonares de <i>M. sativa</i> var. Semit 921.....	33
2. Protoplastos de <i>M. sativa</i> var. Crioula, visualizados ao microscópio de fluorescência.....	36
3. Eficiência de plaqueamento (EP) avaliada pela percentagem de microcolônias derivadas de protoplastos de explantes cotiledonares e foliares de <i>M. sativa</i> , em função da densidade e tempo de cultivo.....	38
4. Culturas de protoplastos derivados de explantes foliares de <i>M. sativa</i> var. Rangelander aos 28 dias de cultivo em meio líquido K8 em três densidades.....	39
5. Eficiência de plaqueamento (EP) avaliada pela percentagem de microcolônias, derivadas de protoplastos de explantes foliares de cinco plantas de <i>M. sativa</i> var. Rangelander, cultivadas a densidade de 1×10^5 em função do tempo de cultivo.....	44
6. Estruturas diferenciadas derivadas da cultura de protoplastos de <i>M. sativa</i> var. Rangelander e var. Semit 921, aos 60 dias em meio líquido K8.....	45

Página

7. Eficiência de plaqueamento (EP) avaliada pela percentagem de microcolônias derivadas de protoplastos de <i>M. sativa</i> var. Semit 921, cultivadas à densidade de $0,5 \times 10^5$, em função do tempo de cultivo e concentração de fitorreguladores no meio de cultura.....	46
8. Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos provenientes de protoplastos derivados de explantes foliares de <i>M. sativa</i> var. Rangelander.....	48
9. Calo originado da cultura de protoplastos de <i>M. sativa</i> var. Crioula, em meio UM.....	51
10. Estruturas rizogênicas, derivadas da cultura de protoplastos de <i>M. sativa</i> var. Semit 921.....	51
11. Calo derivado de protoplastos oriundos de explantes cotiledonares de <i>M. sativa</i> var. Semit 921, cultivado em meio para indução de organogênese.....	52
12. Plântula de <i>M. arborea</i> germinada <i>in vitro</i>	53
13. Protoplastos recém-isolados, derivados de explantes foliares de <i>M. arborea</i> , em CPW-13.....	55
14. Calos formados a partir de segmentos foliares derivados das cinco plantas de <i>M. sativa</i> var. Rangelander.....	56
15. Florescimento de <i>M. sativa</i> var. Valley Plus aos 32 dias após a germinação em casa de vegetação.....	58
16. Processo de fusão entre protoplastos isolados de pétalas de <i>M. sativa</i> var. Valley Plus e tecido foliar de <i>M. arborea</i>	60
17. Seqüência dos eventos de fusão entre protoplastos isolados de calos de <i>M. sativa</i> var. Rangelander e tecido foliar de <i>M. arborea</i>	62

LISTA DE TABELAS

Página

1. Meios de cultura utilizados para o cultivo de protoplastos derivados de explantes cotiledonares de <i>M. sativa</i> var. Semit 921.....	22
2. Germinação de sementes de <i>M. sativa</i> , segundo a variedade.....	31
3. Cotiledonares expandidos (em %), após um dia de cultura segundo a variedade de <i>M. sativa</i>	32
4. Rendimento de protoplastos derivados de explantes cotiledonares e foliares de <i>M. sativa</i> , segundo a variedade.....	34
5. Viabilidade de protoplastos derivados de explantes cotiledonares de <i>M. sativa</i> , em solução de FDA, segundo a variedade e o explante.....	37
6. Quadro de análise de variância de dados de Eficiência de Plaqueamento em culturas de protoplastos derivados de explantes cotiledonares e foliares de cinco variedades (genótipos) de <i>M. sativa</i> aos 21 dias de cultivo, em três densidades; comparações pelo teste de Tukey.....	40
7. Germinação de sementes de <i>M. arborea</i>	53
8. Comportamento de protoplastos derivados de explantes foliares de <i>M. arborea</i> em presença de CPW, contendo diferentes concentrações de manitol.....	54
9. Rendimento de protoplastos derivados de calos de <i>M. sativa</i> var. Rangelander.....	57

Página

10. Frequência de heterocários formados após 15, 30 e 45 min. em presença de PEG oriundos da fusão entre protoplastos de <i>M. sativa</i> e <i>M. arborea</i>	59
11. Frequência de heterocários formados, com as respectivas viabilidades, após 15, 30 e 45 min. em presença de 20, 30 e 35% de PEG, oriundos da fusão entre protoplastos de <i>M. sativa</i> e <i>M. arborea</i>	63
12. Quadro de análise de variância para os dados da frequência de heterocários, em diferentes concentração de PEG, e tempos de exposição; comparação pelo teste de Tukey.....	64
13. Quadro de análise de variância para os dados da viabilidade de protoplastos após a adição de três concentrações de PEG, e exposição a três tempos; comparação pelo teste Tukey.....	64

REGENERAÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DE PROTOPLASTOS DE ALFAFA (*Medicago sativa* L.) E OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE FUSÃO QUÍMICA ENTRE *M. sativa* L. e *M. arborea* L.

Autora: MARIZA MONTEIRO

Orientadora: Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

RESUMO

Foram utilizados protocolos de cultura e regeneração de plantas a partir de protoplastos derivados de explantes foliares e cotiledonares das variedades de alfafa: Crioula, Alfa 200, Valley Plus, Semit 921 e Rangelander. Após 28 dias de cultivo, obteve-se microcalos que foram submetidos a dois tratamentos: (a) meio líquido K8 (60 dias) onde houve formação de estruturas diferenciadas nas variedades Rangelander e Semit 921, identificadas por análises anatômicas como sendo embriões somáticos e raízes, respectivamente; (b) meio sólido B5h (28 dias), subcultivo em meio SHb (21 dias) para a indução de embriogênese, e subcultivo em meio Boi2Y (28 dias) no qual observou-se diferenciação de embriões na superfície dos calos de *M. sativa* var. Rangelander. Este meio também favoreceu a maturação dos embriões somáticos que desenvolveram parte aérea e radicular. As plântulas foram aclimatadas em casa de vegetação onde se desenvolveram. Para o estabelecimento dos protocolos de fusão, foram isolados protoplastos de calos de *M. sativa* var. Rangelander e de folhas

de *M. arborea*. O tratamento em solução de PEG (20 a 30%) por 15 min. favoreceu a formação de heterocários (4 a 8%) sem haver redução drástica da viabilidade celular.

**PLANT REGENERATION FROM PROTOPLASTS OF ALFALFA
(*Medicago sativa* L.) AND OPTIMIZATION OF THE CHEMICAL OF
FUSION TECHNIQUE BETWEEN *M. sativa* L. AND *M. arborea* L.**

Author: MARIZA MONTEIRO

Adviser: Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

SUMARY

Protocols of culture and plant regeneration from leaf and cotyledonary protoplasts were used for the following alfalfa genotypes: Crioula, Alfa 200, Valley Plus, Semit 921 and Rangeland. Microcalli were obtained after 28 days of culture which were submitted to two treatments: (a) liquid medium K8 (60 days) where differentiated structures were produced and identified by anatomical analysis as somatic embryos and roots for the genotypes Rangeland and Semit 921, respectively; (b) solidified medium B5h (28 days), subculture in SHb (21 days) for embryogenesis induction, and subculture in Boi2Y (28 days) where embryo differentiation was observed on the surface of the *M. sativa* cv. Rangeland calli. In this medium somatic embryo development with shoot and root formation occurred. Plantlet acclimatization was carried out in the greenhouse conditions where plant development occurred. For establishing the fusion procedures, protoplasts were isolated from *M. sativa* cv. Rangeland calli and from *M. arborea* mesophylls. The treatment using 20-30%

PEG solution for 15 min. favoured the heterokarion formation (4-8%) without reducing the cellular viability.

1. INTRODUÇÃO

Medicago sativa L. é uma forrageira perene de alto valor protéico que cresce em diferentes ambientes, fazendo com que sua produção seja afetada por estresses abióticos e bióticos. Entre anuais e perenes (QUIROS & BAUCHAN, 1988), o gênero *Medicago* compreende cerca de 60 espécies (ARCIONI *et al.*, 1990), as quais contêm os recursos genéticos necessários para superar o estresse enfrentado pelos cultivares de alfafa (ISSAC, 1957; McEVANS, 1966; MARIANI *et al.*, 1978). Entretanto, a possibilidade de transferência de genes para *M. sativa*, através de cruzamentos convencionais, é restrita para espécies sexualmente compatíveis (MARIANI, 1968).

Medicago arborea L. é, filogeneticamente, a mais primitiva espécie do gênero *Medicago* e é caracterizada por possuir um hábito de crescimento arbustivo. A principal característica agrônômica de interesse é a resistência à seca e a sua habilidade de garantir uma produção satisfatória em épocas de inverno, quando os cultivares de *M. sativa* apresentam dormência (MARIOTTI *et al.*, 1984). Em adição, *M. arborea* é resistente à murcha bacteriana (*Corynebacterium insidiosum*) (RENFRO & SPRANGUE, 1959) e às raças de antracnose (ELGIN & OSTAZEKY, 1982).

A hibridação somática, via fusão de protoplastos, tem sido sugerida como uma técnica útil para a transferência de genes de interesse entre espécies sexualmente incompatíveis (Harms, 1983; citado por GILMOUR *et al.*,

1987). Este procedimento tem sido amplamente usado envolvendo as espécies *M. sativa* e *Medicago borealis* L. (GILMOUR *et al.*, 1989) *M. sativa* e *Medicago falcata* L. (TÉOULÉ 1983; MENDIS *et al.*, 1991), *M. sativa* e *Medicago coerulea* L. (PUPILLI *et al.*, 1992) e *M. sativa* e *M. arborea* (NENZ *et al.*, 1996). Uma das maiores limitações da técnica de hibridação de células somáticas é a insuficiência de sistemas de regeneração a partir de protoplastos os quais devem sofrer divisões, originar microcolônias e regenerar plantas. Os grupos cultivados de alfafa têm sido regenerados a partir de protoplastos derivados de folhas (KAO & MICHAYLUK, 1980; ATANASSOV & BROWN, 1984), cotilédones (LU *et al.*, 1982), raízes (XU *et al.*, 1982) e cultura de suspensões celulares (ATANASSOV & BROWN, 1984).

O objetivo desta pesquisa consistiu basicamente em otimizar protocolos para o isolamento, cultura e regeneração de plantas a partir de protoplastos de *M. sativa* L. e *M. arborea* L., assim como a otimização da fusão química interespecífica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura da alfafa no Brasil

A alfafa é originária da Ásia Menor (Irã, Iraque, Síria, Turquia e Afeganistão) e inicialmente difundida para o Ocidente pelos romanos. Com a queda do Império, o cultivo da alfafa praticamente desapareceu da Europa, sendo reintroduzido pelos árabes (século VI) e daí disseminado para todos os continentes (BOTTON & GLOPEN, 1972).

No Brasil, o berço da alfafa parece ser o vale do Rio Caí (Rio Grande do Sul). A cultura foi trazida pelos colonizadores alemães na segunda metade do século XIX e espalhada para alguns bolsões do sul do país (RS e PR) onde se cultiva a alfafa até hoje (COELHO Jr., 1994).

Atualmente, as áreas produtoras de alfafa localizam-se no Rio Grande do Sul (Vale do Caí) e Paraná (Bandeirantes e Santo Antônio da Platina), havendo cultivos em São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Distrito Federal, Bahia e Alagoas (HADDAD & DOMINGUES, 1993). Dados mais atualizados e precisos sobre a área utilizada e a produção de alfafa no Brasil e nos Estados são limitados. Segundo dados do IBGE - Censo Agropecuário, 1996, a área de cultivo abrange 7.547,190 ha, com uma produção de 53.160 t/ano. A variedade mais utilizada é a Crioula, pela alta adaptabilidade a diferentes regiões e

produtividade acima de 28 t MS/ha/ano (HADDAD & CASTRO, 1999). Sua principal utilização concentra-se na alimentação de equinos, gado leiteiro, gado de elite, demais espécies (coelhos, chinchilas, avestruzes, aves ornamentais, etc), fabricação de rações (HADDAD & CASTRO, 1999) e, mais recentemente, na alimentação humana, como preventivo e/ou em tratamento de diversas doenças (<http://www.esmtc.pt/alfafa/index.htm>).

Segundo HADDAD & CASTRO, (1999), o sistema de produção de alfafa pode ser classificado em dois grandes grupos:

Sistema familiar – caracterizado por ser executado em pequenas áreas (módulos de até 10 ha), com baixa aplicação de tecnologia e pequeno nível de investimento. Este sistema engloba os pequenos produtores do sul do país e destina-se ao consumo próprio dentro do haras, apresenta produtividade baixa (6 a 8 t/MS/ha/ano) e longevidade muito pequena (2 a 3 anos). Estes índices são devido à dependência exclusiva de precipitação pluvial; controle inadequado de ervas daninhas; manejo inadequado de cortes; utilização errônea de fertilizantes e secagem inadequada a campo.

Sistema empresarial – executado em áreas maiores (acima de 40 a 50 ha), com crescente aplicação de tecnologia e alto nível de investimento. Este sistema tem sido utilizado nos Estados de SP, MS, GO, e DF. Ao migrar para áreas distantes do sul do Brasil, a alfafa encontrou um clima mais quente, com estação seca bem definida, exigindo o uso da irrigação e técnicas mais avançadas de produção e cultura. Esta tecnologia apresenta uma produtividade acima de 20 t MS/ha/ano e longevidade acima de 7 anos.

Em alfafa, assim como outras espécies forrageiras, normalmente busca-se características morfológicas, fisiológicas e agronômicas que promovam o rendimento e a qualidade da forragem e a persistência das plantas, em sistemas de produção (PAIM, 1994). Segundo este autor, os métodos clássicos

de melhoramento são divididos em dois grandes grupos: melhoramento interpopulacional e melhoramento intrapopulacional.

O melhoramento interpopulacional baseia-se no fluxo de genes que ocorre entre populações, proporcionado pela polinização livre ou dirigida entre elas. Dentro deste grupo, incluem-se o desenvolvimento de linhagens, retrocruzamentos, cruzamento de linhagens e produção de híbridos.

O melhoramento intrapopulacional utiliza formas diferentes de seleção para melhorar uma gama de características dentro da população. A unidade de seleção pode ser plantas individuais ou famílias de plantas. O procedimento intrapopulacional tem sido eficiente para caracteres com alta herdabilidade como o aumento da resistência a pragas e doenças. Vários procedimentos são usados: seleção massal, seleção materna, seleção de linhas clonais e testes de progênie. Na seleção de famílias, a diferença para os procedimentos massais é o uso de testes de progênie, praticando-se seleção de famílias de meio-irmãos, irmãos-inteiros, seleção dentro da família e combinações de seleção dentro e entre famílias como a seleção de linhas maternas.

Atualmente, muitos híbridos entre espécies de *Medicago* têm sido obtidos por meio de cruzamentos sexuais associados a resgate de embriões ou por hibridação somática via fusão de protoplastos. Estes híbridos são importantes para transferência de caracteres oriundos do germoplasma de *Medicago* para a alfafa cultivada, ampliando as possibilidades de melhoramento da cultura (McCOY & BINGHAM, 1988).

2.2 Uso da biotecnologia no melhoramento de alfafa

2.2.1. Isolamento, cultura e regeneração de protoplastos derivados de *M. sativa* L.

Entende-se por protoplastos células que tiveram sua parede celular removida através de ação mecânica ou por digestão enzimática. Como resultado da remoção da parede celular, a única barreira existente entre o protoplasto e o meio ambiente é a membrana plasmática (BENGOCHEA & DODDS, 1986).

Para que a tecnologia protoplasto-planta seja utilizada, há necessidade de se conseguir isolar grandes quantidades de protoplastos, que estes possam regenerar a parede celular, se dividir e regenerar plantas inteiras quando cultivados em meio de cultura apropriado. A primeira tentativa de se isolar protoplastos foi feita por KLERCKER, em 1982, utilizando *Stratiotes aloides*, e métodos mecânicos (FUNGARO & VIEIRA, 1989). Tecidos de folhas tiveram suas células plasmolisadas e foram seccionados de modo a alcançar a parede celular sem causar danos às células.

Em 1960, foram empregadas enzimas pectocelulolíticas para obtenção de protoplastos, aumentando o rendimento do processo e abrindo novas perspectivas do uso desta técnica em pesquisas na biologia vegetal (ALVES, 1996). Pelo método enzimático, tornou-se possível obter populações de protoplastos comparativamente maiores do que aquelas obtidas pelo método mecânico. Além disso, o uso deste método evita a exposição das células a efeitos deletérios de excessiva e prolongada plasmólise e permite obter protoplastos de células meristemáticas relativamente não vacuoladas, as quais não sofrem plasmólise facilmente (FUNGARO & VIEIRA, 1989).

Teoricamente, é possível o isolamento de protoplastos de qualquer parte da planta (SMITH & BHASKARAM, 1986). Protoplastos podem ser isolados do mesofilo, coleoptiles, cotilédones, ápices caulinares, nódulos de raízes de leguminosas, microsporócito, tubos polínicos, sacos embrionários e hipocótilos (FUNGARO & VIEIRA, 1989), pétalas de flores, camadas do aleurona e células de tumores e galhas de plantas (BENGOCHEA & DODDS, 1986). Calos ou cultura em suspensão são fontes ideais para se obter grande quantidade de protoplastos (SMITH & BHASKARAM, 1986) pois apresentam a vantagem de que as células e tecidos utilizadas são cultivados sob condições ambientais e fisiológicas controladas (FUNGARO & VIEIRA, 1989).

Cotilédones de plântulas são um excelente material para o isolamento de protoplastos de *Brassica oleracea*, *Datura innoxia* e *M. sativa* (LU *et al.*, 1982); raízes de plântulas jovens também têm sido consideradas excelente fonte de protoplastos em *Brassica ssp* (XU *et al.*, 1982) assim como pétalas de flores de espécies ornamentais de *Nicotiana* (FLICK & EVANS, 1983).

A digestão da parede celular, utilizando enzimas que degradam a celulose, hemicelulose e pectina, é o método mais utilizado e eficiente, proporcionando um alto rendimento (EVANS, 1991). As preparações comerciais das enzimas constituem-se de frações, parcialmente purificadas, de extratos de microrganismos simbióticos, parasitas ou saprofíticos, possuindo atividades celulolíticas e hemicelulolíticas (CARNEIRO & CONROI, 1990). As misturas enzimáticas empregadas, assim como o período de digestão, variam com as espécies e tecidos utilizados como fontes de protoplastos (MANTELL *et al.*, 1994).

As soluções enzimáticas para o isolamento de protoplastos de espécies de *Medicago* diferem na concentração de enzimas, componentes osmóticos e

condições de incubação. A mistura enzimática composta por Cellulase Onozuka R-10, Macerozyme Onozuka R-10 e/ou Rhozyme é fundamental para o isolamento de protoplastos viáveis derivados de folhas jovens de espécies de *Medicago* (JOHNSON *et al.*, 1982).

A célula vegetal possui uma pressão interna a qual é mantida pela parede celular. A digestão dessa parede em meio hipotônico arrebentaria os protoplastos. Por essa razão é necessário manter os tecidos vegetais, no momento do isolamento, em condições hipertônicas (POTRYKUS & SHILLITO, 1988). Em protoplastos isolados de espécies de *Medicago* é utilizada frequentemente solução salina contendo 13% (p/v) de manitol (FREARSON *et al.*, 1973).

O estado fisiológico do explante, a composição da mistura enzimática, o meio e as condições de cultivo usados para estabelecer a cultura de protoplastos (ARCIONI *et al.*, 1990), além da idade dos explantes, têm influência na regeneração de plantas (DAVEY & POWER, 1988). Os explantes foliares e cotiledonares de alfafa utilizados como fontes de protoplastos com idade de 1 a 3 dias, após sua expansão, rendem maiores quantidades de protoplastos viáveis. KAO & MICHAYLUK (1980) regeneraram plantas inteiras a partir de protoplastos isolados de folhas de alfafa através de uma mistura enzimática constituída de 0,5% Cellulase Onozuka R-10, 0,5% de Rhozyme e 0,25% de Pectinase. Os autores observaram que os protoplastos isolados a partir de folhas jovens apresentaram uma “eficiência de plaqueamento” maior que aqueles isolados de folhas mais velhas.

O fator “eficiência de plaqueamento” (PE) vem a ser a percentagem de protoplastos ou de células derivadas de protoplastos que originam colônias no meio nutriente. Esse fator está na dependência das condições de inoculação e

incubação, da fonte utilizada para obtenção dos protoplastos bem como da densidade celular e concentração hormonal do meio (FUNGARO & VIEIRA, 1989).

A capacidade de divisão das células derivadas de protoplastos também é influenciada pela densidade dos protoplastos e pelo sistema de cultura. As densidades mais comumente usadas variam de 2×10^4 a 2×10^5 protoplastos/mL de meio de cultura (Potrykus & Shillito, 1988, citados por DORNELAS, 1995). Protoplastos derivados de cotilédones de *M. sativa* têm sido cultivados em meio líquido à uma densidade de 5×10^4 (LU *et al.*, 1982, GILMOUR *et al.*, 1987).

Existem vários métodos pelos quais os protoplastos podem ser cultivados, entretanto dois principais podem ser distinguidos: sistemas de culturas em meio líquido e cultura de protoplastos imobilizados em meio semi-sólido. Entre os métodos de cultura em meio líquido, encontram-se cultura em suspensão, cultura em gota pendente e em câmaras de microculturas. Entre os sistemas que imobilizam os protoplastos estão a cultura em "droplets" e fatias de agarose, em camadas delgadas de agarose e em camadas de alginato de sódio e de cálcio (revisões de Fungaro & Vieira, 1989; Evans, 1991, citadas por DORNELAS, 1995).

O cultivo de protoplastos imobilizados é mais eficiente que aquele em meio líquido para várias espécies de plantas, pois evita a aglutinação dos mesmos e portanto, nessa condição, estão menos propensos a sofrerem precipitação e alterações na sua densidade em cultura. Essa técnica apresenta a vantagem de que os protoplastos permanecem em uma posição fixa e, dessa forma, é possível acompanhar o seu desenvolvimento e comportamento individual.

A estabilidade e a viabilidade dos protoplastos em cultura estão relacionados à manutenção das propriedades osmóticas do meio. A concentração de substâncias como glicose, manitol ou sorbitol é de extrema importância para a manutenção da osmolaridade ideal do meio e varia conforme a espécie vegetal e o tipo de tecido do qual os protoplastos foram obtidos (POTRIKUS & SHILLITO, 1988).

GILMOUR *et al.* (1987) regeneraram plantas através do isolamento de protoplastos derivados de cotilédones de *M. sativa* L. Estes foram plasmolisados com solução salina contendo 13% de manitol (CPW 13), sendo que a mistura enzimática utilizada foi composta de 2% (p/v) de Rhozyme, 2% (p/v) de Meicelase e 0,03% (p/v) de Macerozyme R-10. A digestão se deu no escuro, a 25° C, por 16 horas, com agitação de 30 r.p.m. Os protoplastos foram cultivados em meio semi-solidificado em "droplets" de agarose e em meio líquido em densidades de 5×10^4 a 2×10^5 . Estes autores relataram que a cultura em agarose foi benéfica para as divisões de protoplastos comparada com a cultura líquida. Para a manutenção da osmolaridade foi substituída uma alíquota do meio de cultura por uma mistura de meio para protoplastos (K8P) e meio de cultura para célula (K8) (KAO, 1977), na proporção de 2:1, 1:1 e 0:1 após 7, 14 e 21 dias, respectivamente. Esta redução mostrou-se importante pois favorecem a divisão celular e, subseqüentemente, a formação de microcolônias. Isto também foi observado por KAO & MICHAYLUK (1980).

Os protoplastos derivados de *M. arborea* requerem as mesmas condições de cultura reportadas para *M. sativa*, com exceção do meio de cultura inicial, sendo utilizado o meio KM8P (KAO & MICHAYLUK, 1975).

A regeneração de plantas de *M. sativa* derivadas de protoplastos tem sido interpretada, comumente, como sendo via embriogênese, baseando-se na

morfologia das estruturas regeneradas (ARCIONI *et al.*, 1990). Entretanto, SANTOS *et al.* (1980) obtiveram regeneração de plantas derivadas de protoplastos de *M. sativa* pela via embriogênica e organogênica. A regeneração de plantas de *M. arborea* tem sido relatada como sendo organogênese (MARIOTTI *et al.*, 1984; ARCIONI *et al.*, 1990).

Resultados importantes foram relatados sobre a regeneração de plantas derivadas de protoplastos de espécies de *M. sativa*, *Medicago media*, *Medicago varia* e *M. falcata*, com ênfase na influência do genótipo da planta doadora. CHEN *et al.* (1987) observaram interação entre o genótipo da planta doadora de protoplastos x meio de cultura. Evidências de interações entre genótipo x meio, genótipo x explante e genótipo x explante x meio foram também relatadas nos casos de regeneração de plantas derivadas de protoplastos de *M. sativa* e *M. media* (NAGARAJAN *et al.*, 1986).

HINDSON *et al.* (1998) estudando a conversão de embriões somáticos oriundos de culturas embriogênicas induzidas em meio líquido, compararam quatro genótipos de *M. sativa*, e observaram que estes genótipos respondem diferentemente quando expostos a vários tratamentos, confirmando que o efeito do genótipo é significativo, sugerindo que os protocolos embriogênicos são genótipo-específicos.

A suplementação de substâncias orgânicas, tais como extrato de levedura e mio-inositol ao meio de cultura é relatada como estimulante à morfogênese (SAUNDERS & BINGHAM, 1975) e à embriogênese (LUPOTTO, 1983). A maioria das pesquisas realizadas envolvendo redução do nitrogênio, aminoácidos e carboidratos no meio de cultura de calos de *M. sativa* var. Regen S, relatam a formação de embriões somáticos. Nesta variedade, a regeneração via embriogênese ocorreu quando calos derivados de

protoplastos foram expostos, por um período de tempo de 3 a 4 dias, ao 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). Após transferência para meio de regeneração sem hormônio, suplementado com NH_4^+ (entre 25 e 100 mM), houve formação de embriões somáticos, que ao serem transferidos para meio contendo NH_4^+ (10 a 20 mM) se diferenciaram e formaram raízes (WALKER & SATO, 1981). MEIJER & BROWN (1987), quando investigaram os efeitos da redução de nitrogênio em embriões somáticos a partir de calos derivados de pecíolo de espécies de *Medicago*, diplóide e tetraplóide, obtiveram resultados semelhantes aqueles de WALKER & SATO (1981).

As condições para regeneração de plantas via embriogênese variam de genótipo para genótipo assim como os reguladores de crescimento utilizados no meio de indução (McKERSIE, 1995). As auxinas variam em sua eficácia para induzir respostas. IAA (ácido indol-acético) é ineficiente; CPA (ácido 4-clorofenoxiacético) e NAA (ácido α -naftalenoacético) podem promover a formação de calos; 2,4-D e 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético) podem promover a iniciação de calos e indução de embriões somáticos (BINGHAM *et al.*, 1988; STUART & McCALL, 1992). Em *M. sativa* var. Robot a embriogênese somática foi induzida pela transferência de calos para meio de cultura contendo 2,4-D (LUPOTTO, 1986).

2.2.1.1 Hibridação somática

Após a obtenção da primeira regeneração de um híbrido somático, a fusão de protoplastos foi considerada como solução para os problemas de cruzamento entre espécies sexualmente incompatíveis. Na prática, os progressos na aplicação da fusão de protoplastos têm sido menores que o esperado (EVANS, 1991). O mesmo autor aponta que uma limitação no uso

desta tecnologia tem sido a incapacidade de regeneração de plantas inteiras a partir da fusão de protoplastos para a maioria das espécies cultivadas.

Por outro lado, o sucesso na regeneração de plantas a partir do isolamento de protoplastos de *M. sativa* e de outras leguminosas forrageiras, tem levado os pesquisadores a se interessar pela obtenção de híbridos somáticos como um recurso adicional ao melhoramento de cultivares de alfafa. Entretanto, poucos trabalhos envolvendo fusão de protoplastos de *M. sativa* têm sido publicados (ARCIONI *et al.*, 1990). O primeiro híbrido somático do gênero *Medicago*, relatado há quase uma década, foi obtido pela fusão de protoplastos de *M. sativa* e *M. falcata*, a qual foi induzida quimicamente por PEG (polietileno glicol) (Téoulé, 1983; citado por VASIL & THORPE, 1994).

Muitos autores relataram progresso quando utilizaram a técnica de eletrofusão em relação ao método químico para obtenção de híbridos somáticos de leguminosas (GILMOUR *et al.*, 1987). DAMIANI *et al.* (1988) obtiveram plantas híbridas através da eletrofusão entre protoplastos derivados de mesofilo de *M. arborea* e protoplastos oriundos de suspensões celulares e de células de raízes de *M. sativa*. Híbridos somáticos produzidos por eletrofusão entre protoplastos de *M. sativa* e *M. arborea* também foram obtidos por NENZ *et al.* (1996). De qualquer modo, os tecidos derivados da fusão de protoplastos não se mostraram competentes na produção de plantas. Apenas MENDIS *et al.* (1991) produziram híbridos somáticos através da técnica de fusão de protoplastos de *M. sativa* e *M. falcata*.

Subseqüentemente, tecidos derivados do processo de hibridação somática foram obtidos envolvendo protoplastos isolados de *M. sativa* e *M. borealis* L. (GILMOUR, *et al.*, 1989) e *M. sativa* e *M. coerulea* L. (PUPILLI *et al.*, 1992). A fusão foi induzida quimicamente ou por choque elétrico (eletrofusão).

A obtenção de híbridos somáticos através de fusão assimétrica de protoplastos é uma alternativa para transferência de DNAs nucleares e citoplasmáticos entre espécies ou gêneros sexualmente incompatíveis. LI *et al.* (1993) obtiveram híbridos assimétricos entre as espécies de leguminosas *Medicago sativa* (alfafa) e *Onobrychis viciifolia* (sainfoin), tendo como objetivo a introdução de proantocianidinas, presentes em sainfoin, na alfafa. Os protoplastos derivados de células de suspensão de *O. viciifolia* foram irradiados com 200 a 1000 Gy de irradiação gama e fusionados através de eletrofusão com protoplastos derivados de folhas de *M. sativa*, os quais atuaram como receptores. As plantas regeneradas foram avaliadas quanto à presença de proantocianidinas e nenhuma foi detectada como tanino-positiva. No entanto, a análise utilizando-se o método de Southern blot mostrou que 43 dos 158 regenerantes apresentaram DNAs específicos de sainfoin. Análises citológicas confirmaram a existência de 17% de euplóides e 83% de aneuplóides e os testes de germinação de pólen indicaram que a maioria dos híbridos eram férteis, enquanto 35% parcialmente férteis ou completamente estéreis.

A produção de híbridos assimétricos intergenéricos ou plantas cíbridas tem sido relatada nas famílias *Umbelliferae* (DUDITS *et al.*, 1980), *Solanaceae* (GUPTA *et al.*, 1984), *Cruciferae* (CHATTERJEE *et al.*, 1988), *Rutaceae* (VARDI *et al.*, 1989) e *Graminaceae* (SCHWARZACHER *et al.*, 1989).

2.2.1.2. Transformação genética

O emprego de técnicas de engenharia genética nos programas de melhoramento de alfafa tem proporcionado um avanço significativo nos últimos anos (SOMASEGARAN & WACEK, 1999). A transformação de alfafa mediada por *Agrobacterium* tem sido rotineira, com desenvolvimento de novos genótipos

que combinam performance agronômica e o potencial embriogênico somático (DU *et al.*, 1994). As primeiras transformações em alfafa foram reportadas na década de 80, por DEAK *et al.* (1986) e SHAHIN *et al.* (1986). Desde então, vários outros relatos de transformação têm sido feitos com *Agrobacterium tumefaciens* (D'HALLUIN *et al.*, 1990; NARVAEZ-VAZ *et al.*, 1992; McKERSIE *et al.*, 1993; DU *et al.*, 1994) e *Agrobacterium rhizogenes* (SPANIO *et al.*, 1987; DAMIANI & ARCIONI, 1991; GOLDS *et al.*, 1991) usados para introduzir o T-DNA em genótipos embriogênicos.

Microinjeção (REICH *et al.*, 1986), eletroporação de protoplastos (KUCHUCK *et al.*, 1990) e bombardeamento de partículas (BROWN *et al.*, 1994; PEREIRA & ERICKSON, 1995) de espécies de *Medicago* tem sido exploradas como técnicas alternativas de introdução direta de DNA. Três diferentes marcas seletivas, canamicina, fosfinotricina e higromicina, têm sido expressas e usadas para selecionar plantas transgênicas (McKERSIE & BROWN, 1997).

Os objetivos dos experimentos de transformação têm sido diversos. DAMIANI & ARCIONI (1991) infectaram *M. arborea* com *A. tumefaciens* que expressou o gene higromicina fosfotransferase. Assim, calos e protoplastos das plantas transformadas cresceram em meios contendo o antibiótico. O propósito deste experimento foi usar esta característica como marcador em fusão de protoplastos entre *M. arborea* e *M. sativa*. Com objetivo similar, para fusão de protoplastos entre *M. sativa* e *M. varia*, DEAK *et al.* (1986) geraram plantas transgênicas resistentes a fosfinotricina, enquanto que D'HALLUIN *et al.* (1990) desenvolveram resistência à fosfinotricina para tolerância à herbicida em plantas de alfafa, cultivadas a campo. SCHROEDER *et al.* (1991) usaram *A. tumefaciens* para introduzir resistência à canamicina e o gene da ovalbumina

de frango em três cultivares de alfafa para incrementar o valor nutricional desta forrageira.

Alfagas transgênicas foram obtidas por McKERSIE *et al.* (1997) visando aumentar a resistência ao frio pela superexpressão das enzimas constitutivas Mn-SOD ou Fe-SOD via introdução de cDNA. No primeiro experimento a campo, quatro transformantes primários mostraram sobrevivência superior por dois ciclos. Resultados similares foram obtidos no segundo ensaio a campo, comparando-se 18 transformantes com Mn-SOD, dirigida à mitocôndria, 11 transformantes com MN-SOD dirigido ao cloroplasto e 39 transformantes com Fe-SOD dirigido ao cloroplastos. Os transgênicos apresentaram 25% de sobrevivência, após um inverno, comparativamente ao controle.

Estas técnicas tornaram-se importantes no auxílio ao desenvolvimento de novos cultivares de alfafa com reduzido tempo e possibilidade de introdução de novas características, até então impossível pelos métodos convencionais (SOMASEGARAN & WACEK, 1999).

2.3. Análises histológicas da via embriogênica

A regeneração de plantas a partir do cultivo *in vitro* de células e tecidos pode ocorrer pela formação de gemas caulinares (organogênese) ou de embriões somáticos (embriogênese somática) (VIEIRA & APPEZZATO-DAGLÓRIA, 2000).

Embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas haplóides ou diplóides se desenvolvem em plantas diferenciadas passando por estágios embriológicos distintos sem que ocorra fusão de gametas. O embrião formado denomina-se embrião somático. A embriogênese somática *in vitro*

tornou-se um modelo potencial para o estudo de eventos regulatórios e morfogenéticos em embriogênese em plantas (ZIMMERMANN, 1993).

Ambas as vias de regeneração *in vitro* podem ter origem unicelular ou multicelular, ocorrendo diretamente a partir de células do explante original ou, indiretamente, via formação de calos (VIEIRA & APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2000). Portanto, as duas vias podem ser distinguidas apenas pelas diferenças anatômicas existentes entre as gemas caulinares e os embriões somáticos. Enquanto a gema é uma estrutura monopolar que desenvolve ampla conexão vascular com o tecido do explante, os embriões somáticos são estruturas bipolares, não conectadas ao explante pela vascularização (HACCIUS, 1978).

O padrão de desenvolvimento de um embrião somático em dicotiledoneas apresenta muitas características morfológicas semelhantes a do embrião zigótico. Inicialmente, ambos são caracterizados pela diferenciação de uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular. Ambos passam pelos estágios de desenvolvimento embrionários propriamente ditos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. As estruturas internas do embrião somático globular e cordiforme são semelhantes aos zigóticos; nos estágios cordiforme a protoderme é evidente, assim como a polaridade e a simetria bilateral (Smith, 1985 citado por GUERRA *et al.*, 1999). Entre as diferenças dos embriões somáticos e zigóticos citam-se: os embriões somáticos desenvolvem-se livres de correlações físicas, fisiológicas e genéticas, as quais ocorrem durante o desenvolvimento de um embrião zigótico (ZIMMERMANN, 1993). Em adição, os embriões somáticos não possuem endosperma, podendo apresentar desenvolvimento anormal. Uma particularidade dos embriões somáticos é a presença de um sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial. Esta característica, aliada à sua bipolaridade

diferenciam os embriões somáticos dos propágulos resultantes dos processos de micropropagação e de organogênese (GUERRA *et al.*, 1999).

Os estudos histológicos são importantes não apenas para confirmação da via de regeneração *in vitro*, mas também para determinação dos tipos celulares a partir dos quais surgem os embriões somáticos ou as gemas caulinares. Estas informações são de grande interesse, especialmente em sistemas de transferência de genes (MATSUMOTO *et al.*, 1996). A baixa eficiência do processo de transformação tem sido atribuída ao fato da regeneração de plantas ocorrer a partir de células meristemáticas que, por estarem localizadas muito além da superfície do explante, não são acessíveis ao *Agrobacterium* ou então não são filogeneticamente competentes para a transformação (ALVES, 1999). Células competentes para a transformação genética via *Agrobacterium* conforme descrito por SANGWAN *et al.* (1992) são: células pequenas, isodiamétricas com parede delgada, citoplasma denso e núcleo proeminente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Germinação e cultivo de sementes de *Medicago sativa*

Foram realizadas inoculações *in vitro* de sementes de *M. sativa* var. Rangeland, oriundas da Austrália (CSIRO, Division of Plant Industry) e de *M. sativa* variedades Crioula, Alfa 200, Valley Plus e Semit 921, oriundas da Estação Experimental de Zootecnia de Sertãozinho, SP. As sementes foram esterilizadas com NaOCl (hipoclorito de sódio) 1,5% (v/v) por 6 min. e submetidas a lavagens sucessivas com água destilada, deionizada e esterilizada, sendo escarificadas com pinça e germinadas em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) contendo metade da concentração original de sais e componentes orgânicos (MS/2), solidificado com Phytigel (Sigma, 1,8 g/L).

3.2. Isolamento e cultura de protoplastos de *M. sativa*

Para o isolamento de protoplastos, foram utilizados, em média 0,25 g de explantes cotiledonares, com a idade de 1 dia, derivados de *M. sativa* var. Crioula, Alfa 200, Valley Plus e Semit 921 e 0,25 g de explantes foliares, com 15 dias de idade, derivados dessas mesmas variedades e de *M. sativa* var. Rangeland. Os explantes foram cortados com o auxílio de um bisturi, e

submetidos à plasmólise por 1 hora em solução salina CPW-13 (FREARSON *et al.*, 1973), em placas de Petri com 5 cm de diâmetro.

A solução salina foi substituída por 5 mL de uma mistura enzimática contendo 2,0% de Cellulase R10 e 0,5% de Macerozyme R10. As placas de Petri, contendo os explantes e a mistura enzimática, foram seladas com parafilme e mantidas no escuro por 17 horas, sob agitação de 35 rpm. Essa mistura enzimática, contendo os protoplastos e restos de tecidos não digeridos, foi filtrada em malha de nylon de 64 μ m e submetida a duas centrifugações por 10 min. (1000 r.p.m.), utilizando solução salina CPW-13 para substituir o sobrenadante.

O “pellet” foi ressuspeso em 1 mL de meio de cultura líquido K8P (KAO 1977, modificado por GILMOUR *et al.*, 1989) e procedeu-se a contagem dos protoplastos em hematocítômetro. A viabilidade dos protoplastos de ambos os explantes de todas as variedades de *M. sativa* foi verificada mediante a observação ao microscópio de fluorescência. Para tal, foi utilizada uma mistura de uma suspensão de protoplastos e solução de FDA (diacetato de fluoresceína) 0,1% (p/v) na proporção de 1:1. A viabilidade média, em porcentagem, foi calculada pela relação entre o número de protoplastos com fluorescência verde e o número total de protoplastos visualizados em 10 campos do microscópio em aumento de 20x.

Foram utilizadas três densidades de cultura: $0,5 \times 10^5$, 1×10^5 e $1,5 \times 10^5$ protoplastos/mL de meio. Para o cultivo dos protoplastos, estes foram imobilizados em gotas de agarose (0,6%, Sigma Tipo VII). Após a mistura dos protoplastos com a agarose, as gotas foram banhadas com 3 mL de meio líquido K8P. Estas placas foram seladas com parafilme e mantidas no escuro.

Após cinco dias de incubação, os protoplastos foram cultivados sob $25 \mu\text{M. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa a 25°C .

Para a manutenção da osmolaridade da cultura, foi substituído 1 mL de meio líquido por uma mistura de meio para protoplastos (K8P) e meio de cultura para células (K8), após 7, 14 e 21 dias, numa proporção de 2:1, 1:1 e 0:1, respectivamente, como descrito por GILMOUR *et al.* (1987). Foi avaliada a eficiência de formação de colônias, ou "plating efficiency" (PE) que é definida pela porcentagem de colônias formadas, após 7, 14 e 21 dias, em relação ao número inicial de protoplastos. Para isto, foram observados ao microscópio, cinco campos da placa, com três repetições por tratamento, em aumento de 40x

Após a avaliação das culturas, foram isolados protoplastos derivados de explantes foliares de cada uma das cinco plantas de *M. sativa* var. Rangelander, os quais foram cultivados a uma densidade de 1×10^5 em meio K8P e K8, e protoplastos derivados de explantes cotiledonares de *M. sativa* var. Semit 921, cultivados a uma densidade de $0,5 \times 10^5$, em meio K8P, contendo diferentes concentrações de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), Zeatina e NAA (ácido α -naftalenoacético) (Tabela 1). Após 28 dias de cultura, foi avaliada a formação de microcalos e, aos 60 dias, a formação de estruturas diferenciadas.

Tabela 1: Meios de cultura utilizados para cultivo de protoplastos derivados de explantes cotiledonares de *M. sativa* var. Semit 921.

Tratamentos	Meio de cultura para protoplastos	Meio de cultura para células
Controle	K8P	K8
1	K8P contendo 0,2mL de 2,4-D; 0,5 mL de Zeatina e 1,0 mL de NAA	K8 contendo 0,2mL de 2,4-D; 0,5 mL de Zeatina e 1,0 mL de NAA
2	K8P contendo 0,4mL de 2,4-D; 1,0 mL de Zeatina e 2,0 mL de NAA	K8 contendo 0,2mL de 2,4-D; 0,5 mL de Zeatina e 2,0 mL de NAA
3	K8P contendo 0,6mL de 2,4-D; 1,5 mL de Zeatina e 3,0 mL de NAA	K8 contendo 0,3mL de 2,4-D; 0,75 mL de Zeatina e 3,0 mL de NAA
4	K8P contendo 0,8mL de 2,4-D; 2,0 mL de Zeatina e 4,0 mL de NAA	K8 contendo 0,4mL de 2,4-D; 1,0 mL de Zeatina e 4,0 mL de NAA
5	K8P	K8 sem 2,4-D
6	K8P	K8 sem 2,4-D e NAA
7	K8P	K8P e K8 sem 2,4-D
8	K8P	K8P e K8 sem 2,4-D e NAA
9	K8P sem 2,4-D	K8 sem 2,4-D
10	K8P sem 2,4-D e NAA	K8 sem 2,4-D e NAA

3.3. Análises histológicas das estruturas diferenciadas derivadas de protoplastos de *M. sativa* var. Rangelander e var. Semit 921

Foram realizadas análises anatômicas de estruturas diferenciadas derivadas de protoplastos, obtidas após 60 dias de cultivo. As amostras foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). Para melhor fixação, foram levadas à uma bomba de vácuo para a retirada do ar dos espaços intercelulares, desidratadas em série etílica e infiltradas em resina glicol metacrilato (Reichert-Jung). As secções foram feitas em micrótomo rotatório (5 μ m), longitudinalmente, e coradas com azul de toluidina 0,05% (p/v), em tampão fosfato e ácido cítrico (SAKAI, 1973).

3.4. Cultura de calos derivados de protoplastos de *M. sativa*: indução de embriogênese somática e organogênese

3.4.1. Indução de embriogênese somática

Após 28 dias, calos formados a partir de protoplastos derivados de explantes foliares e cotiledonares de todas as variedades, foram submetidos a duas formas de cultivo, para o desenvolvimento dos embriões somáticos:

- 1) Meio líquido K8P, por 60 dias, subcultivando-os a cada 7 dias;
- 2) Meio sólido B5h (GAMBORG *et al.*, 1968 modificado por ATANASSOV & BROWN, 1984) por 28 dias, e subcultivados em meio SHb (WALKER, *et al.*, 1979) por 21 dias, para indução de embriões somáticos e em seguida subcultivados em meio Boi2y (BINGHAM, *et al.*, 1975) para o desenvolvimento destes embriões, como descrito por ATANASSOV & BROWN (1984). Após 28 dias, embriões em fase cotiledonar foram transferidos para meio MS/2, para germinação e após estarem com 10 cm de tamanho e enraizados foram transferidos para copos de plástico contendo substrato

(Plantmax) autoclavado e submetidos à aclimação, sendo transferidos para casa de vegetação.

Calos derivados de protoplastos de ambos os explantes, das variedades Crioula, Alfa 200, Valley Plus e Semit 921, foram submetidos aos seguintes tratamentos:

3) Meio sólido UM (UCHIMIYA & MURASHIGE, 1974) contendo 2, 4, 6, 8 e 10 mg/L de 2,4-D, no qual permaneceram por até 30 dias. Após este período, foram cultivados em meio UM sem 2,4-D;

4) Meio sólido B1INK, contendo sais e vitaminas de Blaydes (BLAYDES, 1966), suplementado com 3% de sacarose, 2,0 mg/L de IAA, 2,0 mg/L de NAA e 2mg/L de Cinetina, solidificado com 3,0 g/L de Phytigel e ajustado o pH para 5,8 como recomendado por PARROT *et al.* (1995) a partir de um protocolo modificado de LUPOTTO (1986).

Em vista de os protoplastos derivados de explantes cotiledonares de *M. sativa* var. Semit 921 terem formado microcolônias e estruturas rizogênicas, foram realizados os seguintes tratamentos:

a) Foi acrescentado 1 mL de meio A (TÉOULÉ & DATTÉE, 1987) líquido, contendo 10 g/L de amido solúvel na placa, a cada 7 dias, durante 28 dias, sendo as culturas, posteriormente, subcultivadas em meio sólido UM;

b) As estruturas diferenciadas permaneceram em meio líquido K8 e, após 28 dias, foram subcultivadas em meio sólido UM;

c) Foram subcultivadas em meio A, líquido, sem a presença de amido solúvel;

d) Utilizou-se meio sólido MS para o subcultivo;

e) Idem d porém acrescentou-se 0,2643 mg/L de ABA;

f) Idem d porém acrescentou-se 0,5 mg/L de BAP e 5 mg/L de NAA durante 28 dias e, posteriormente, usou-se sólido MS livre de fitorreguladores;

Para solidificação dos meios usou-se ágar (Sigma 0,6%, p/v).

3.4.2. Indução de organogênese

Os calos derivados de protoplastos de explantes cotiledonares e foliares foram subcultivados nos meios MS contendo 0,5 mg/L de BAP e 5,0 mg/L de NAA e B5 (GAMBORG *et al.*, 1968) sem fitorreguladores, ambos solidificados com Phytigel (Sigma, 1,5 g/L) e no escuro. Após 28 dias, os calos foram subcultivados em meio MS sólido (Phytigel, Sigma, 1,5 g/L) contendo 2mg/L de BAP e 10% de água de coco, sob $25 \mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa, para indução de brotos.

3.5. Germinação *in vitro* de sementes de *M. arborea*

Foram realizadas quatro inoculações *in vitro* de sementes de *M. arborea*, cedidas pelo Dr. Nuno Maria Sousa Costa da Estação Florestal Nacional, Lisboa, Portugal. As sementes foram esterilizadas com NaOCl 1,5% (v/v) por 6 min. e submetidas a lavagens sucessivas com água destilada, deionizada e esterilizada, em seguida foram escarificadas com pinça e germinadas em meio MS/2 solidificado com Phytigel (Sigma, 1,8 g/L).

3.6. Otimização do isolamento de protoplastos de *M. arborea*

Para o isolamento de protoplastos, foram utilizados, em média, 0,25 g de explantes foliares com a idade de 15 dias. Os explantes foram cortados, com o auxílio de um bisturi, e submetidos à plasmólise por 1 hora em soluções salinas CPW contendo as seguintes concentrações de manitol: 7 (CPW-7), 9 (CPW-9), 13 (CPW-13) e 21% (CPW-21).

As soluções salinas foram substituídas por 5 mL de uma mistura enzimática contendo 2,0% de Cellulase R10 e 0,5% de Macerozyme R10. As

placas de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo os explantes e a mistura enzimática, foram seladas com parafilme e mantidas no escuro por 17 horas, sob agitação de 35 r.p.m. Essa mistura enzimática, contendo os protoplastos e restos de tecidos não digeridos foi filtrada em malha de nylon de 64 μm e submetida a duas centrifugações por 10 min. (1000 r.p.m.) utilizando CPW contendo as concentrações de manitol correspondentes. Foi retirada uma alíquota de cada tratamento e analisada ao microscópio óptico para avaliar a otimização do isolamento.

3.7. Indução de calos a partir de explantes foliares de *M. sativa* var.

Rangelander

Para a obtenção de calos foram utilizados explantes foliares de cada uma das cinco plantas de *M. sativa* var. Rangelander, subcultivadas *in vitro* a cada 28 dias. As extremidades das folhas foram excisadas, com o auxílio de um bisturi e os segmentos foram inoculados com a face abaxial em contato com o meio. Os meios de cultura utilizados para indução de calogênese foram B5h e UM, ambos solidificados com ágar (Sigma, 0,6%, p/v), autoclavados e vertidos em placa de Petri (9 cm). Foram inoculados nove segmentos foliares por placa, com três repetições por tratamento em delineamento inteiramente casualizado. As placas foram incubadas no escuro, à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.8. Isolamento de protoplastos derivados de calos de *M. sativa* var.

Rangelander

A identificação dos heterocários durante o processo de fusão é facilitada quando se dispõe de um marcador morfológico que permita a rápida distinção entre os protoplastos de uma espécie dos da outra. Para isto, foram isolados protoplastos derivados de calos de *M. sativa* var. Rangelander, os quais não

possuem plastos verdes. Cerca de 0,25 g de tecido calogênico com a idade de 10 a 20 dias foram inoculados em 5 mL de solução enzimática contendo 4,0% de Celulase RS, 2% de Macerozyme e 0,5% de Pectoliase Y23. As placas foram seladas com parafilme e incubadas no escuro por 16 hs, à temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob agitação de 35 rpm. Essa mistura enzimática, contendo os protoplastos e restos de tecidos não digeridos foi filtrada em malha de nylon de 45 μm e submetida a duas centrifugações por 10 min. (1000 r.p.m.), utilizando solução salina CPW-13 para substituir o sobrenatante. O “pellet” foi ressuspenso em 1 mL de CPW-13 e procedeu-se a contagem dos protoplastos em hematocítômetro para avaliar o rendimento.

3.9. Otimização da fusão química entre protoplastos de *M. sativa* e *M. arborea*.

3.9.1. Fusão entre protoplastos oriundos de pétalas de *M. sativa* var. Valley Plus e de explantes foliares de *M. arborea*.

Com o objetivo em obter protoplastos derivados de pétalas, os quais são morfologicamente diferentes dos oriundos de explantes verdes, foram plantadas, em copos contendo substrato (Plantmax) autoclavado, 20 sementes de cada variedade de *M. sativa*, previamente escarificadas com pinça. Após permanecerem 30 dias em casa de vegetação, sob temperatura de 28°C , as plantas germinadas foram submetidas a um fotoperíodo de 16 hs, para promover seu florescimento.

Para o isolamento dos protoplastos, foram coletadas, em média, 0,125 g de pétalas de *M. sativa* var. Valley plus, oriundas das plantas cultivadas em casa de vegetação, e explantes foliares de *M. arborea* cultivados *in vitro*. A metodologia de isolamento está descrita no item 3.2. Os protoplastos recém

isolados foram ressuspensos em 1 mL de CPW-13 e submetidos à contagem. Com o auxílio de uma ocular micrométrica, mediu-se o diâmetro dos protoplastos de ambas as espécies. Tal informação é importante, uma vez que o diâmetro dos protoplastos é inversamente proporcional à capacidade de fusão dos mesmos (POWER *et al.*, 1970, 1976; POWER & CHAPMAN, 1985).

Os protoplastos foram ressuspensos a uma densidade de 2×10^5 protoplastos de pétalas de *M. sativa*/mL de CPW-13 e $1,5 \times 10^5$ protoplastos de folhas de *M. arborea*/mL de CPW-13. Foram misturados 2 mL da suspensão de protoplastos de ambas as espécies em tubos de centrifuga, procedendo-se à centrifugação por 8 min. (1000 r.p.m.). O sobrenadante foi retirado e a ele adicionado 1 mL de uma solução contendo 30% de polietileno glicol (PEG, Reagen, p/v); o tubo foi deixado em repouso durante 15, 30 e 45 min., após este período foram adicionados, a cada 5 min. os seguintes volumes de CPW-13 (em mL): 0,25; 0,5; 1,0; 1,0; e 1,5. Em seguida, o volume foi completado com CPW-13 e os tubos submetidos à centrifugação por 7 min. a 1000 r.p.m. O sobrenadante foi substituído por 1 mL de CPW-13. As avaliações foram feitas com respeito à eficiência na formação de heterocários.

3.9.2. Fusão entre protoplastos oriundos de calos de *M. sativa* var. Rangelander e de explantes foliares de *M. arborea*.

Protoplastos de tecidos calogênicos de *M. sativa* var. Rangelander, foram isolados como descrito no item 3.8 e fusionados com protoplastos de *M. arborea*, isolados a partir de explantes foliares utilizando-se a metodologia semelhante à descrita no item 3.6, com as seguintes modificações: os explantes foliares de *M. arborea* foram coletados a partir de plantas cultivadas em casa de vegetação e submetidos à uma lavagem prévia em água destilada deionizada sendo em seguida esterilizados com NaOCl 1,5% (v/v) por 6 min. e

lavados novamente com água. Foi utilizada uma mistura enzimática contendo 3,0% de Cellulase R10 e 1,0% de Macerozyme R10.

Os protoplastos recém isolados de ambas as espécies foram submetidos à contagem e foi determinado seu diâmetro. Em seguida, foram ressuspensos a uma densidade de 2×10^5 protoplastos de calo de *M. sativa*/mL de CPW-13 e de 2×10^5 protoplastos de folhas de *M. arborea*/mL de CPW-13. O procedimento de fusão foi aquele descrito no item 3.9.1.

Visando a otimização da metodologia de fusão, foram utilizadas soluções contendo 20, 30 e 35% de polietileno glicol (PEG, Reagen, p/v). As avaliações foram feitas após 15, 30 e 45 min., com respeito à eficiência na aglutinação de protoplastos de *Medicago* e viabilidade dos mesmos utilizando-se uma solução de FDA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Germinação e cultivo de sementes de *M. sativa*

Após 4 a 5 dias de inoculação germinaram, em média, 94,2% do total de sementes de *M. sativa* var. Crioula, 97,6% da var. Alfa 200, 96,9% da var. Valley Plus e 97,4% da var. Semit 921 (Tabela 2). Após 24 horas, foram observados, 86,9, 85,9, 85,1 e 82,9% dos cotilédones com aspecto saudável e expandidos nas culturas dessas variedades, respectivamente (Tabela 3).

As plantas de *M. sativa* var. Rangelander foram micropropagadas, excisando seu ápice e subcultivando-os em meio MS/2 a cada 28 dias, no qual enraizaram após 10 dias de cultivo, para servirem como fonte de explante para o isolamento. Das oito sementes inoculadas, cinco (62%) germinaram. As plântulas apresentaram cotilédones expandidos após um dia.

4.2. Isolamento e cultura de protoplastos de *M. sativa*

A utilização de explantes cotiledonares e foliares para o isolamento e regeneração de plantas a partir protoplastos de *M. sativa*, foi descrito por ARCIONI *et al.* (1990), como sendo um material excelente. Neste trabalho, foi observado que a mistura enzimática digeriu por completo a parede celular (Figura 1a) obtendo-se um rendimento médio da ordem de um milhão de protoplastos/mL, independente do explante ou genótipo utilizado (Tabela 4).

Tabela 2: Germinação de sementes de *M. sativa*, segundo a variedade.

Variedades		Crioula		Alfa 200		Valley Plus		Semit 921	
Ensaio	Nº de	% de		Nº de		% de		Nº de	
		Sementes	Inoculadas	Sementes	Inoculadas	Sementes	Inoculadas	Sementes	Inoculadas
1	50	92,0	92,0	49	49	91,8	93,8	50	92,0
2	50	96,0	96,0	50	48	100,0	95,8	49	100,0
3	50	94,0	94,0	50	50	99,0	98,0	50	96,0
4	49	91,8	91,8	50	49	96,0	91,8	48	100,0
5	39	92,3	92,3	30	29	100,0	100,0	30	96,6
6	30	96,6	96,6	30	30	96,6	100,0	29	96,5
7	30	100,0	100,0	30	30	100,0	96,6	30	100,0
8	30	93,3	93,3	30	30	93,3	93,3	30	93,3
9	30	86,6	86,6	30	30	96,6	100,0	30	100,0
10	30	100,0	100,0	30	30	100,0	100,0	30	100,0
Média		94,26		97,23		96,93		97,44	
± Desvio		± 4,06		± 2,95		± 3,15		± 3,03	

Tabela 3: Cotilédones expandidos (em %), após um dia de cultura, segundo a variedade de *M. sativa*.

Variedades		Crioula				Alfa 200				Valley Plus				Semit 921			
Ensaio	Nº de	% de		Nº de		% de		Nº de		% de		Nº de		% de		Nº de	
		Sementes	Cotilédones	Sementes	Cotilédones	Sementes	Cotilédones	Sementes	Cotilédones	Sementes	Cotilédones	Sementes	Cotilédones	Sementes	Cotilédones	Sementes	Cotilédones
		Germinadas	Expandidos	Germinadas	Expandidos	Germinadas	Expandidos	Germinadas	Expandidos	Germinadas	Expandidos	Germinadas	Expandidos	Germinadas	Expandidos	Germinadas	Expandidos
1	46		91,3	45	91,1	46	91,3	46	91,3	46	91,3	46	91,3	46	89,1	46	89,1
2	48		93,7	50	86,0	46	93,5	46	93,5	46	93,5	49	87,7	49	87,7	49	87,7
3	47		91,5	49	83,7	49	83,7	49	83,7	49	83,7	48	85,4	48	85,4	48	85,4
4	45		86,6	48	87,5	45	88,8	45	88,8	45	88,8	48	87,5	48	87,5	48	87,5
5	36		86,1	30	86,6	29	86,2	29	86,2	29	86,2	29	89,6	29	89,6	29	89,6
6	29		86,2	29	86,2	30	80,0	30	80,0	30	80,0	28	82,1	28	82,1	28	82,1
7	30		86,6	30	83,3	29	89,6	29	89,6	29	89,6	30	73,3	30	73,3	30	73,3
8	28		82,1	28	78,6	28	78,6	28	78,6	28	78,6	28	78,5	28	78,5	28	78,5
9	26		92,3	29	89,6	30	83,3	30	83,3	30	83,3	30	83,3	30	83,3	30	83,3
10	30		73,3	30	86,6	30	76,6	30	76,6	30	76,6	30	73,3	30	73,3	30	73,3
Média			86,97		85,92		85,16		85,16		85,16		82,98		82,98		82,98
± Desvio			± 6,01		± 3,48		± 5,67		± 5,67		± 5,67		± 6,13		± 6,13		± 6,13

Figura 1- Processo de desenvolvimento de microcolônias a partir de protoplastos derivados de explantes cotiledonares de *M. sativa* var. Semit 921: **a)** protoplastos recém isolados, sem a parede vegetal (400x); **b)** primeira divisão celular, após 72 horas de cultivo (400x; seta indica a lamela média); **c)** segunda divisão celular (400x); **d)** microcolônias formadas aos 7 dias de cultivo (160x).

Tabela 4: Rendimento de protoplastos derivados de explantes cotiledonares e foliares de *M. sativa*, segundo a variedade.

Variedades		Crioula			Alfa 200			Valley Plus			Semit 921			Rangelander		
		Explante			Explante			Explante			Explante			Explante		
Ensaio		Cotiledonar	Foliar		Cotiledonar	Foliar		Cotiledonar	Foliar		Cotiledonar	Foliar		Cotiledonar	Foliar	
1		$1,30 \times 10^6$	$0,97 \times 10^6$		$1,20 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$		$0,98 \times 10^6$	$1,23 \times 10^6$		$1,20 \times 10^6$	$0,92 \times 10^6$		$1,20 \times 10^6$	$0,89 \times 10^6$	
2		$0,96 \times 10^6$	$1,30 \times 10^6$		$0,87 \times 10^6$	$1,43 \times 10^6$		$0,96 \times 10^6$	$0,99 \times 10^6$		$1,40 \times 10^6$	$0,96 \times 10^6$		$1,40 \times 10^6$	$1,58 \times 10^6$	
3		$1,10 \times 10^6$	$1,23 \times 10^6$		$1,02 \times 10^6$	$1,46 \times 10^6$		$1,03 \times 10^6$	$1,10 \times 10^6$		$1,30 \times 10^6$	$1,13 \times 10^6$		$1,30 \times 10^6$	$1,32 \times 10^6$	
4		$0,93 \times 10^6$	$0,98 \times 10^6$		$1,30 \times 10^6$	$0,97 \times 10^6$		$1,20 \times 10^6$	$1,34 \times 10^6$		$1,20 \times 10^6$	$1,44 \times 10^6$		$1,20 \times 10^6$	$1,90 \times 10^6$	
5		$1,20 \times 10^6$	$1,25 \times 10^6$		$0,80 \times 10^6$	$1,30 \times 10^6$		$0,96 \times 10^6$	$0,89 \times 10^6$		$0,90 \times 10^6$	$0,87 \times 10^6$		$0,90 \times 10^6$	$1,10 \times 10^6$	
6		$1,50 \times 10^6$			$1,20 \times 10^6$			$1,10 \times 10^6$			$1,30 \times 10^6$			$1,30 \times 10^6$	$1,60 \times 10^6$	
7		$0,95 \times 10^6$			$0,96 \times 10^6$			$0,86 \times 10^6$			$0,98 \times 10^6$			$0,98 \times 10^6$	$1,26 \times 10^6$	
8		$1,20 \times 10^6$			$1,15 \times 10^6$			$0,95 \times 10^6$			$1,20 \times 10^6$			$1,20 \times 10^6$	$1,96 \times 10^6$	
9		$1,30 \times 10^6$			$1,10 \times 10^6$			$1,20 \times 10^6$			$0,99 \times 10^6$			$0,99 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$	
10		$0,90 \times 10^6$			$0,98 \times 10^6$			$1,10 \times 10^6$			$1,30 \times 10^6$			$1,30 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	
Média		$1,13 \times 10^6$	$1,14 \times 10^6$		$1,06 \times 10^6$	$1,27 \times 10^6$		$1,03 \times 10^6$	$1,11 \times 10^6$		$1,18 \times 10^6$	$1,06 \times 10^6$		$1,18 \times 10^6$	$1,43 \times 10^6$	
± Desvio		± 0,2	± 0,16		± 0,16	± 0,19		± 0,11	± 0,18		± 0,16	± 0,23		± 0,16	± 0,34	

Resultados semelhantes foram obtidos por NENZ *et al.* (1996) para isolamento de protoplastos de mesofilo de *M. sativa* var. Rangelander. Os dados relativos à viabilidade dos protoplastos derivados de explantes cotiledonares e foliares de *M. sativa* (Figura 2) estão apresentados na Tabela 5.

Após 24 h em cultura, observou-se que os protoplastos haviam regenerado sua parede celular. As primeiras divisões puderam ser observadas após 72 h e, em uma semana de cultura, células derivadas de protoplastos já apresentavam terceira divisão e formação de microcolônias (Figura 1b, c e d).

Neste trabalho, a redução da osmolaridade do meio de cultura foi feita por substituição gradual do meio por uma mistura de meio K8P e meio de cultura para células, K8. Estas diluições foram importantes para manter a frequência de divisões celulares.

As frequências de divisões celulares em culturas de protoplastos derivados de explantes cotiledonares e foliares de todas as variedades podem ser vistas na Figura 3 e APÊNDICE 1. Aos 21 dias de cultivo, foi observada maior porcentagem de microcolônias formadas a partir de protoplastos derivados de ambos os explantes das cinco variedades. As análises estatísticas indicaram que existe diferença significativa entre genótipos, entre explantes e entre densidades utilizadas para o cultivo, assim como a interação explantes x densidades foi significativa. No entanto, não foi detectado efeito da interação genótipos x densidades. O teste de Tukey mostrou que protoplastos derivados de explantes cotiledonares cultivados a uma densidade de $0,5 \times 10^5$ respondem melhor à formação de calos em comparação com os derivados de explantes foliares, sendo que estes apresentam melhor resposta quando cultivados a uma densidade de $1,0 \times 10^5$. A variedade Crioula apresentou maior frequência na formação de calos a partir de protoplastos de explantes

cotiledonares enquanto a variedade Rangelander mostrou-se melhor quando foram utilizados explantes foliares. (Figura 4; Tabela 6).

Figura 2- Protoplastos de *M. sativa* var. Crioula visualizados ao microscópio de fluorescência (550x).

Tabela 5: Viabilidade de protoplastos derivados de explantes cotiledonares e foliares de *M. sativa*, em solução de FDA, segundo a variedade e o explante*.

Variedades	Explantes	Total de Protoplastos	Número de Protoplastos Viáveis	Viabilidade (em %)
Crioula	Cotiledonares	21,3 ± 3,93	18,8 ± 3,76	88,20
	Foliares	20,4 ± 3,32	16,8 ± 2,92	82,30
Alfa 200	Cotiledonares	24,3 ± 4,55	19,7 ± 3,68	80,08
	Foliares	23,0 ± 3,55	17,9 ± 2,16	77,80
Valley Plus	Cotiledonares	25,9 ± 5,13	22,1 ± 4,53	85,32
	Foliares	21,8 ± 2,78	17,6 ± 2,65	80,70
Semit 921	Cotiledonares	36,7 ± 6,12	31,2 ± 6,77	85,01
	Foliares	35,9 ± 5,43	30,8 ± 5,19	85,80
Rangelander	Foliares	28,8 ± 3,37	24,6 ± 2,80	85,40

* Os dados são a média de 20 campos do microscópio, seguida do respectivo desvio padrão.

Figura 3- Eficiência de plaqueamento (EP) avaliada pela percentagem de microcolônias oriundas de protoplastos derivados de explantes cotiledonares e foliares de *M. sativa*, em função da densidade e tempo de cultivo.

Figura 4- Culturas de protoplastos derivados de explantes foliares de *M. sativa* var. Rangelander aos 28 dias de cultivo em meio líquido K8 em três densidades.

Tabela 6- Quadro de análise de variância de dados de Eficiência de Plaqueamento em culturas de protoplastos derivados de explantes cotiledonares e foliares de cinco variedades (genótipos) de *M. sativa* aos 21 dias de cultivo, em três densidades; comparações pelo teste de Tukey; **a)** entre genótipo e explante; **b)** entre explante e genótipo; **c)** entre explante e densidade.

FV	G.L.	SQ	QM	F	SIGNIF.
Densidade	2	191,45620	95,728100	13,537	,00001
Explante	1	466,70180	466,701800	65,997	,00000
Genótipo	4	233,19680	58,299190	8,244	,00001
Gen. X Dens.	8	52,30035	6,537543	0,924	*****
Expl. X Dens.	2	210,70310	105,351500	14,898	,00000
Resíduo	63	445,50960	7,071582		

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 0,54

a)

Explante	Genótipo				
	Crioula	Alfa 200	Valley Plus	Semit 921	Rangelander
Cotilédone	13,2756 A	6,3222 A	5,7311 A	4,9356 A	-
Folha	2,7078 B	2,1011 A	2,1367 B	2,9511 B	-

b)

Explante		
Genótipo	Cotilédone	Folha
Crioula	13,2756 A	2,7078 A B
Alfa 200	6,3222 B	2,1011 B
Valley Plus	5,7311 B	2,1367 B
Semit 921	4,9356 B	2,9511 A B
Rangelander	-	4,1567 A

c)

Densidade (x 10 ⁵)	Explante	
	Cotilédone	Folha
0,5	12,1458 A	2,3858 B
1,0	6,3350 B	3,8747 A
1,5	4,2175 B	2,1720 B

Foram realizados isolamentos de protoplastos a partir de cada uma das cinco plantas de *M. sativa* var. Rangeland, cultivados a uma densidade de 1×10^5 e avaliada sua eficiência de plaqueamento após 7, 14 e 21 dias de cultivo (Figura 5). Foi observado que apenas a planta nº 4 deu origem a microcolônias. Resultados semelhantes foram observados por KAO & MICHAYLUK (1980) a partir de protoplastos isolados de explantes foliares oriundos de diferentes plantas de *M. sativa* var. Canadian. Estes autores observaram variação quanto à eficiência de plaqueamento e formação de embriões somáticos. Esta variação foi atribuída ao fato de a alfafa ser uma espécie alógama. Cada variedade representa uma população altamente heterogênea.

Após 60 dias de cultivo foram observadas estruturas diferenciadas formadas a partir de protoplastos derivados de explantes foliares de *M. sativa* var. Rangeland e explantes cotiledonares da var. Semit 921 (Figura 6a e b). Nos cortes longitudinais das estruturas formadas a partir de protoplastos de *M. sativa* var. Rangeland foi observada bipolaridade, presença de meristema radicular e apical, vascularização diferenciada e fechada e epiderme bem definida (Figura 6c). Estas características confirmam que estas estruturas são embriões somáticos. Foi observado que alguns embriões apresentaram, na região do hipocótilo, novos embriões somáticos a partir da epiderme. A presença destes embriões, denominados secundários, foi também relatada por PASSOS *et al.* (1999) em estudos de embriogênese somática em calos

oriundos de discos foliares de videira. Os autores afirmam que este fenômeno permite a obtenção direta de embriões somáticos de origem unicelular em larga escala, muitas vezes necessária em programas de melhoramento que utilizam de técnicas não convencionais como a transformação para a introdução de genes exógenos.

As análises histológicas das estruturas formadas a partir de protoplastos de *M. sativa* var. Semit 921, evidenciaram a presença de um meristema radicular e vascularização diferenciada em uma das extremidades, e células parenquimáticas com arranjo friável, típicas de calos, indicando se tratar de rizogênese. (Figura 6d). TÉOULÉ & DATTÉE, (1987) observaram a formação de estruturas semelhantes a essas, as quais identificaram como sendo embriões somáticos derivados de protoplastos de *M. sativa*. Por outro lado, SUGIMOTO *et al.* (1992) descrevendo um protocolo de indução de calos morfogênicos derivados de protoplastos de cana-de-açúcar observaram a sua diferenciação em raízes. SUGIYAMA (2000) afirma que a capacidade morfogenética do tecido vegetal *in vitro* é influenciada por interações entre o genótipo e fitorreguladores exógenos, levando a variações nas respostas das culturas entre variedades de uma mesma espécie vegetal. Van Der Linde (1990) citado por GUERRA *et al.* (1999) supôs que células responsivas (células sensitivas, ou seja, aquelas que possuem competência para responder a um determinado sinal) são caracterizadas pela presença de receptores, geralmente de origem protéica, localizados nas membranas, citoplasma e núcleos, que se ligam ao fitorregulador provocando resposta na célula. Estes fitorreguladores exercem sua ação por meio do reconhecimento de receptores específicos, presentes em células responsivas, traduzindo os sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos. Portanto, a resposta a um determinado fitorregulador pode ser alterada por mudanças na quantidade e na afinidade dos receptores, assim como no nível de outras substâncias endógenas

presentes no explante (FIRN, 1986). Estes aspectos analisados em conjunto explicam porque determinados explantes são competentes para a embriogênese somática e outros não, e explantes de mesma origem coletados em diferentes períodos apresentam respostas diferentes à indução embriogênica (GUERRA *et al.*, 1999). Entretanto, esta discussão perde valor se a interpretação da natureza das estruturas observadas em cultura de células e tecidos não for acompanhada de análises histológicas (APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 1998)

Visando induzir embriões somáticos a partir de protoplastos derivados de explantes cotiledonares de *M. sativa* var. Semit 921, foram realizados ensaios nos quais as concentrações de 2,4-D, Zeatina e NAA do meio líquido K8P e K8 foram alteradas. Em todos os tratamentos foi avaliada a eficiência de plaqueamento (Figura 7). Os resultados indicaram que com o aumento das concentrações de fitorreguladores, a frequência de formação de microcolônias também aumentou. No entanto, com sua diminuição ou ausência essa frequência diminuiu, e nos tratamentos nos quais o NAA foi ausente não observou-se divisão celular.

Figura 5- Eficiência de plaqueamento (EP) avaliada pela percentagem de microcolônias derivadas de protoplastos de explantes foliares de cinco plantas de *M. sativa* var. Rangelander, cultivados à densidade de 1×10^5 , em função do tempo de cultivo.

Figura 6- Estruturas diferenciadas derivadas da cultura de protoplastos de *M. sativa* var. Rangelandier e var. Semit 921, formadas aos 60 dias em meio líquido K8: **a)** embriões somáticos derivados de explantes foliares de *M. sativa* var. Rangelandier (Barra = 870 μm); **b)** estruturas rizogênicas derivadas de protoplastos de *M. sativa* var. Semit 921 (93x); **c** e **d)** Cortes histológicos dos embriões e estruturas rizogênicas; **c)** Barra = 165 μm e **d)** Barra = 199 μm .

Figura 7- Eficiência de plaqueamento (EP) avaliada pela percentagem de microcolônias derivadas de protoplastos de *M. sativa* var. Semit 921, cultivados à densidade de $0,5 \times 10^5$, em função do tempo de cultivo e concentração de fitorreguladores no meio de cultura (Tabela 1).

4.3. Cultura de calos derivados de protoplastos de *M. sativa*: indução de embriogênese somática e organogênese

4.3.1. Indução de embriogênese somática

Cerca de 90 calos derivados de protoplastos de ambos os explantes das cinco variedades foram cultivados em meio sólido B5h, por 28 dias. Estes calos atingiram 1 cm de diâmetro e foram cultivados em meio SHb por 21 dias para indução de embriões somáticos. Ao serem subcultivados em meio Boi2y, 32 calos derivados de folhas de *M. sativa* var. Rangelande formaram em média $20,34 \pm 12,74$ embriões/calor (Figura 8a). Nos demais genótipos, não foi observada diferenciação. Cerca de 200 embriões atingiram a fase cotiledonar em aproximadamente 20 dias de cultivo e puderam ser facilmente destacados do explante e subcultivados em meio MS/2 a cada 28 dias, durante 60 dias (Figura 8b). Após 90 dias, 4 embriões apresentaram sistema radicular e parte aérea bem desenvolvidos (Figura 8c e d). Estas plântulas foram transferidas para copos plásticos contendo substrato (Plantmax) autoclavado e cobertos com saco plástico para a aclimação. Após 30 dias, retirou-se o saco e todas as plantas foram cultivadas em casa de vegetação.

A regeneração de plantas a partir de calos ou protoplastos de alfafa tem sido apresentada como genótipo-dependente. ATANASSOV & BROWN (1984) em experimentos de regeneração de plantas a partir de protoplastos, cultura de calos e células em suspensão, oriundos de 13 variedades de alfafa observaram que apenas as variedades Rangelande, Regen S e Rambler responderam à formação de embriões somáticos a partir da cultura de calos. Plantas das variedades Answer e Regen S foram obtidas. Esta variação entre genótipos também foi observada por BINGHAM *et al.* (1975) em experimentos de

regeneração de plantas a partir de calos oriundos de hipocótilo, envolvendo nove variedades de alfafa.

Figura 8 – Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos provenientes de protoplastos derivados de explantes foliares de *M. sativa* var. Rangelander: **a)** embriões cultivados em meio Boi2y, por 28 dias (Barra = 870 μ m); **b)** brotos regenerados em meio MS/2; **c e d)** plântulas em meio MS/2, aos 60 e 90 dias, respectivamente.

Com o objetivo de induzir embriões somáticos nos demais genótipos, cerca de 60 colônias derivadas de explantes foliares e cotiledonares, foram submetidas a dois tratamentos, como descrito no item 3.4.1. Em 43% dos calos derivados de explantes cotiledonares da var. Crioula houve o desenvolvimento de estruturas diferenciadas quando cultivadas em meio UM contendo 10 mg/L de 2,4-D, no qual permaneceram por 15 dias (Figura 9). Estas estruturas não se diferenciaram e necrosaram após 30 dias. Não foi observada a formação de estruturas diferenciadas na condição de subcultivo em meio B1INK.

Após 60 dias de cultivo em meio líquido (K8), protoplastos derivados de explantes cotiledonares de *M. sativa* var. Semit 921 formaram estruturas rizogênicas. Essas estruturas foram subcultivadas em diferentes tratamentos para indução de parte aérea (Figura 10). No entanto, quando cultivadas em meio UM, por 20 dias, necrosaram. Nos demais tratamentos necrosaram após aproximadamente 15 dias de cultivo.

4.3.2. indução de organogênese

A embriogênese somática é a via de regeneração a partir de protoplastos de *M. sativa* mais comumente descrita (ARCIONI *et al.*, 1990). Contudo, sabe-se que existe um efeito do genótipo, sugerindo que os protocolos embriogênicos são genótipo-específicos (HINDSON *et al.*, 1998). SANTOS *et al.* (1980) descreveram a regeneração de protoplastos derivados de *M. sativa*, de diversos genótipos, como sendo pela via embriogênica ou organogênica.

Neste trabalho, após várias tentativas de se induzir embriogênese somática em culturas de calos derivados de protoplastos dos genótipos

Crioula, Alfa 200, Valley Plus e Semit 921, 40 calos derivados da cultura de protoplastos oriundos de explantes cotiledonares e foliares foram subcultivados em meios B5 e MS contendo 0,5 mg/L de BAP e 5,0 mg/L de NAA, no escuro, visando induzir organogênese. Os calos subcultivados em meio B5 não se desenvolveram, ocorrendo subsequente necrose, aos 10 dias de cultivo. Os calos, subcultivados em meio MS contendo BAP e NAA aumentaram seu tamanho (1 a 1,5 cm), após 15 dias de cultivo. Aos 28 dias, foram subcultivados em meio MS contendo 2 mg/L de BAP e 10% de água de coco sob $25\mu\text{M. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa, para indução de brotos. Após 15 dias, calos derivados do genótipo Semit 921 apresentaram coloração verde-clara com pontos verde-escuros em toda sua extensão (Figura 11a). As análises histológicas mostraram que estas regiões possuíam vascularização desordenada (Figura 11b e c) e após 30 dias de cultivo não observou-se morfogênese.

Figura 9- Calo originado da cultura de protoplastos de *M. sativa* var. Crioula, em meio UM, evidenciando a formação de estruturas diferenciadas (seta) (barra=13mm).

Figura 10- Estruturas rizogênicas, derivadas da cultura de protoplastos de *M. sativa* var. Semit 921, subcultivadas em meio MS contendo 0,5 mg/L de BAP e 5 mg/L de NAA (20x).

Figura 11- Calo derivado de protoplastos oriundos de explantes cotiledonares de *M. sativa* var. Semit 921, cultivados para indução de organogênese **a)** Calo em meio MS contendo 2 mg/L de BAP e 10% de água de coco (seta indica pontos verde-escuros). **b)** e **c)** análise histológica das regiões verde-escuras (Barra = 205 μ m).

4.4. Germinação de sementes *in vitro* de *M. arborea*

Após 8 dias de inoculação, cerca de 96,1% do total de sementes *M. arborea* germinaram em meio MS/2 (Tabela 7; Figura 12).

Tabela 7: Germinação de sementes de *M. arborea*.

Ensaio	Nº de Sementes Inoculadas	% de Germinação
1	20	100,0
2	19	94,7
3	20	90,0
4	20	100,0
Média ± Desvio		96,17 ± 4,8

Figura 12- Plântula de *M. arborea* germinada *in vitro*, aos 50 dias de cultivo em MS/2.

4.5. Otimização do isolamento de protoplastos de *M. arborea*

Para o isolamento dos protoplastos de *M. arborea*, foi utilizada solução CPW contendo 7, 9, 13 ou 21% de manitol. O comportamento dos protoplastos nestas soluções está representado na Tabela 8.

Tabela 8: Comportamento de protoplastos derivados de explantes foliares de *M. arborea* em presença de CPW, contendo diferentes concentrações de manitol.

Concentração de manitol na solução de CPW (em %, p/v)	Comportamento dos protoplastos
7	Rompimento da membrana
9	Rompimento da membrana
13	Túrgidos
21	Plasmolisados

Como relatado por MARIOTTI *et al.* (1984), os protoplastos de *M. arborea* (Figura 13) apresentaram-se túrgidos com boa performance quando isolados em presença de solução salina contendo 0,7M de manitol (CPW -13).

Figura 13- Protoplastos recém isolados, derivados de explantes foliares de *M. arborea*, em CPW-13 (230X).

4.6. Indução de calos a partir de explantes foliares de *M. sativa* var. Rangelander

Após 10 dias de cultivo, foi observada a formação de calos oriundos de segmentos de folha cultivados em meio B5h e UM. No entanto, após 28 dias, os calos provenientes das plantas 2 e 3, cultivados em ambos os meios, necrosaram, enquanto os calos das plantas 1, 4 e 5 permaneceram com coloração amarela e aumentaram de tamanho (Figura 14).

Figura 14- Calos formados a partir de segmentos foliares derivados das cinco plantas de *M. sativa* var. Rangeland, cultivados por 30 dias em meio B5h.

4.7. Isolamento de protoplastos derivados de calos de *M. sativa* var. Rangeland

Foram realizados três ensaios utilizando 0,25 g de calos oriundos das plantas nº 1, 4 e 5. Após 16 h em solução enzimática, pôde ser observado que esta digeriu por completo a parede celular, observando-se um rendimento médio de $9,5 \times 10^5$ protoplastos/mL de CPW -13 (Tabela 9).

Tabela 9- Rendimento de protoplastos derivados de calos de *M. sativa* var. Rangelander.

Ensaio	Rendimento ($\times 10^5$)
1	7,8
2	9,6
3	11,1
Média $\pm$ Desvio	9,5 $\pm$ 1,65

4.8. Otimização da fusão química entre protoplastos de *M. sativa* e *M. arborea*.

4.8.1. Fusão entre protoplastos oriundos de pétalas de *M. sativa* var. Valley Plus e de explantes foliares de *M. arborea*

Após cinco dias, foi observado que 85% das sementes de *M. sativa* var. Semit 921, 55% da var. Alfa 200, 75% da var. Crioula e 85% da var. Valley Plus germinaram e após 30 dias, uma planta de *M. sativa* var. Valley Plus desenvolveu os primeiros botões florais, vindo a florescer dois dias depois (Figura 15).

Foi obtido um rendimento de $7,3 \times 10^5$ protoplastos derivados de pétalas de *M. sativa*/mL e $9,6 \times 10^5$ protoplastos oriundos de explantes foliares de *M. arborea*/mL. Uma vez que existe uma associação entre o diâmetro dos protoplastos e a sua capacidade de fusão (POWER *et al.*, 1970, 1976; POWER & CHAPMAN, 1985), foi medido o seu diâmetro para ambas as espécies. Os protoplastos de *M. sativa* apresentaram em média $32,1 \pm 4,62 \mu\text{m}$ de diâmetro enquanto os de *M. arborea*, $44,5 \pm 4,37 \mu\text{m}$. Foram então ressuspensos à uma

população de 2×10^5 protoplastos de *M. sativa* e $1,5 \times 10^5$ protoplastos de *M. arborea*/mL de PEG. Foram avaliadas as porcentagens de protoplastos envolvidos em processos de fusão e heterocários formados (Figura 16) aos 15, 30 e 45 min., após a adição de PEG (Tabela 10).

Figura 15-Florescimento de *M. sativa* var. Valley Plus aos 32 dias após a germinação em casa de vegetação.

Tabela 10: Frequência de heterocários formados, após 15, 30 e 45 min. em presença de PEG, oriundos da fusão entre protoplastos de *M. sativa* e *M. arborea**

Tempo (min.)	Número de protoplastos	Número de heterocários	% de heterocários
15	32,2 ± 10,70	0,6 ± 0,54	1,86
30	44,8 ± 15,53	2,0 ± 0,70	4,46
45	35,8 ± 6,26	2,4 ± 1,14	6,70

* Os dados são médias de 10 campos do microscópio, seguidas do respectivo desvio padrão.

A frequência de heterocários obtidos, após 15 min. em PEG, foi semelhante ao descrito por GILMOUR *et al.* (1987) que obtiveram frequências de heterocários menores que 2%, utilizando 30% de PEG por 10 min. para fusão de protoplastos entre *M. sativa* e *M. falcata* e entre *M. sativa* e *Medicago quasifalcata*. Isto indica que o protocolo utilizado neste trabalho é promissor para indução da fusão entre protoplastos de *M. sativa* e *M. arborea*.

Figura 16- Processo de fusão entre protoplastos isolados de pétalas de *M. sativa* var. Valley Plus e tecido foliar de *M. arborea* (440x).

4.8.2. Fusão entre protoplastos oriundos de calos de *M. sativa* var. Rangelander e de explantes foliares de *M. arborea*.

Foi obtido um rendimento de $11,1 \times 10^5$ protoplastos de calos de *M. sativa*/mL e $14,1 \times 10^5$ protoplastos derivados de explantes foliares de *M. arborea*/mL. Os protoplastos de *M. sativa* apresentaram $26,75 \pm 5,14 \mu\text{m}$ de diâmetro enquanto os de *M. arborea* apresentaram em média $44,5 \pm 4,37 \mu\text{m}$. Foram então ressuspensos à uma população de 3×10^5 protoplastos de *M. sativa* e $1,5 \times 10^5$ protoplastos de *M. arborea*/mL de PEG. Foram avaliadas as porcentagens de heterocários formados (Figura 17) e viabilidade dos protoplastos (Tabela 11, APÊNDICE 2) uma vez que este possui toxicidade e em concentrações e tempo de exposição elevados podem afetar a sua viabilidade.

As análises estatísticas indicaram que não existe diferença significativa entre as concentrações utilizadas de PEG para a formação de heterocários, no entanto detectou-se significância para o tempo de exposição (Tabela 12a). O teste de Tukey indicou que o tempo de 15 min. favoreceu a formação de heterocários, obtendo-se de 4 a 12% de produtos de fusão envolvendo as duas espécies (Tabela 12b). Quanto à viabilidade dos protoplastos, a análise estatística indicou que as concentrações de PEG diferem entre si (Tabela 13a). O teste de Tukey indicou que os tratamentos com 20 e 30% não afetaram drasticamente a viabilidade, obtendo-se de 30 a 36% de protoplastos viáveis (Tabela 13b). Nos tratamentos com PEG a 35%, esta concentração afetou drasticamente a viabilidade celular, embora a frequência de heterocários formados tenha sido maior (12,9%). Portanto, recomenda-se os tratamentos com 20 e 30% de PEG por 15 min. que favoreceram a formação de heterocários sem afetar tão drasticamente sua viabilidade.

Figura 17- Seqüência dos eventos de fusão entre protoplastos isolados de calos de *M. sativa* var. Rangelander e tecido foliar de *M. arborea* (600x); aglutinação (a); início da fusão (b); heterocários (c e d).

Tabela 11: Frequência de heterocários formados, com as respectivas viabilidades, após 15, 30 e 45 min. em presença de 20, 30 e 35% de PEG, oriundos da fusão entre protoplastos de *M. sativa* e *M. arborea**

Tempo (min.)	% de PEG					
	20		30		35	
	Heterocários	Viabilidade	Heterocários	Viabilidade	Heterocários	Viabilidade
15	4,48 ± 4,58	36,54 ± 8,34	7,75 ± 3,10	32,36 ± 12,0	12,83 ± 9,08	25,08 ± 10,1
30	7,73 ± 4,86	32,00 ± 6,65	5,56 ± 1,90	29,42 ± 3,36	2,84 ± 2,48	32,00 ± 6,55
45	0	30,10 ± 4,46	6,07 ± 5,25	24,35 ± 10,4	0	13,39 ± 3,33

* Os dados são porcentagens médias, seguidas do respectivo desvio padrão

Tabela 12- Quadro de análise de variância para os dados da frequência de heterocáries, em diferentes concentração de PEG, e tempos de exposição (a); comparação pelo teste Tukey ao nível de 5% (b).

(a)

FV	G.L.	SQ	QM	F	SIGNF.
Tempo	2	188,14360	94,07178	4,854	,02061
PEG	2	23,00587	11,50294	0,594	*****
Tempo x PEG	4	183,93830	45,98457	2,373	,09084
Resíduo	18	348,84470	19,38026		

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 0,83

(b)

Tempo (min.)	Frequência de heterocáries
15	8,4878 A
30	5,3800 A B
45	2,0233 B

Tabela 13- Quadro de análise de variância para os dados da viabilidade de protoplastos após a adição de três concentrações de PEG, e exposição a três tempos (a); comparação pelo teste Tukey ao nível de 5% (b).

(a)

FV	G.L.	SQ	QM	F	SIGNF.
Tempo	2	341,66040	170,830200	2,884	,08196
PEG	2	899,10090	449,550000	7,589	,00407
Tempo x PEG	4	27,21697	6,804242	0,115	*****
Resíduo	18	1066,32200	59,240130		

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 0,29

(b)

PEG (%)	Viabilidade dos protoplastos
20	32,9056 A
30	28,7133 A
35	19,1189 B

Os protocolos estabelecidos no presente trabalho são promissores para obtenção de plantas transgênicas de alfafa, via eletroporação de protoplastos, e para a introgressão de genes, via hibridação somática. Neste caso, em particular, deve-se considerar as técnicas de hibridação simétrica (fusão de núcleos íntegros) e assimétrica (quando um dos núcleos, o doador, é fragmentado). Em alfafa, na última década, a literatura apresenta os trabalhos de LI *et al.* (1993) e ANDO *et al.* (1997) que indicam a hibridação assimétrica como metodologia promissora na tentativa de introgressão de genes para obtenção de plantas contendo tanino ou apresentando macho esterilidade citoplasmática. Nesta pesquisa, taxas de fusão da ordem de 6% e 8% foram obtidas nos ensaios envolvendo protoplastos derivados de pétalas de *M. sativa* var. Valley Plus e de calos de *M. sativa* var. Rangelander, respectivamente. Estes tratamentos não comprometeram a viabilidade dos protoplastos de forma drástica, sendo portanto recomendados para a fusão celular em alfafa.

5. CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer a regeneração de plantas a partir de protoplastos de explantes foliares oriundos de *M. sativa* var. Rangelander. Os protocolos utilizados para as variedades Crioula, Alfa 200, Valley Plus e Semit 921 foram adequados para a formação de calos, no entanto, ineficientes para indução de embriogênese somática ou organogênese e consequente regeneração de plantas. Isto confirma que em *M. sativa* a regeneração de plantas é genótipo-dependente. Os tratamentos com soluções de PEG a 20 ou 30% por 15 min. foram eficientes para provocar a fusão de protoplastos interespecífica em *Medicago*, não afetando drasticamente a viabilidade celular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, A. C. **Utilização da técnica de fusão de protoplastos (hibridação somática) no melhoramento genético vegetal**. Piracicaba, 1996. 39p. (Revisão literária. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, não publicado).
- ALVES, A. C. Estudos anatômicos da organogênese *in vitro* de soja e otimização do processo de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. Piracicaba, 1999. 109p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- ANDO, S.; CHIAKI, T.; IKUMI, K.; MASUDA, S.; SHIMIZU, T. Asymmetric somatic hybridization between alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivar and CMS line. **Breeding Science**, v. 47, p. 195-201, 1997.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Aspectos histológicos e ultra-estruturais da organogênese somática *in vitro* de três espécies de leguminosas. Piracicaba, 1998. 74p. Tese (L.D.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- ARCIONI, S.; DAMIANI, F.; PEZZOTTI, M.; LUPOTTO, E. Alfalfa, Lucerne (*Medicago* spp.). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin, Springer-Verlag, 1990. v. 10, p. 197-235.

ATANASSOV, A.; BROWN, D. C. W. Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 3, p. 149-162, 1984.

BENGOCHEA, T. K. ; DODDS, J. D. **Plant protoplasts: a biotechnological tool for plant improvement.**, London, New York: Chapman and Hall, 1986. 90p.

BINGHAM, E. T.; HURLEY, L. V.; KAATZ, D. M.; SAUNDERS, J. W. Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. **Crop Science**. v. 15: p. 719-721, 1975.

BINGHAM, E. T.; McCOY, T. J.; WALKER, K. A. Alfalfa Tissue Culture In: HANSON, A. A; BARNES, P. K.; HILL, R. R. Jr. (Ed.) **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy. 1988. vol. 29, p. 903-925.

BLAYDES, D. F. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. **Physiologia Plantarum**. v. 19, p. 748-753, 1966.

BOTTON, J. L.; GLOPEN, B. P. World distribution and historical development. In: HANSON, C. H. (Ed) **Alfalfa: Science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 1972. 812p.

BROWN, D. C. W.; TIAN, L.; BUCKLEY, D. J.; LEFEBVRE, M.; McGRATH, A.; WEBB, J. Development of a simple particle bombardment device for gene transfer into plant cell. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 37, p. 47-53, 1994.

- CARNEIRO, V. T. C.; CONROI, T. Protoplastos de células vegetais. In: TORRES, A. C. R.; CALDAS, L. S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP-EMBRAPA/CNPH, 1990. p. 171-200.
- CHATTERJEE, G.; SIKDAR, S. R.; DAS, S.; SEN, S. K. Intergeneric somatic hybrid production through protoplast fusion between *Brassica juncea* and *Diplotaxis muralis*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.76, p. 915-922, 1988.
- CHEN, T. H. H.; MAROWITCH, J.; THOMPSON, B. G. Genotype effects on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of alfafa. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 8, p. 73-81, 1987.
- COELHO, Jr. W. Produção de sementes de alfafa: aspectos e considerações sobre comercialização. In: WORKSHOP SOBRE O POTENCIAL FORRAGEIRO DA ALFAFA (*Medicago sativa* L.) NOS TRÓPICOS. Juiz de Fora, 1994. **Anais**, Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL; 1994, p. 81-90.
- DAMIANI, F.; ARCIONI, S. Transformation of *Medicago arborea* L. with an *Agrobacterium rhizogenes* binary vector carrying the hygromycin resistance gene. **Plant Cell Reports**, v. 10, p. 300-303, 1991.
- DAMIANI, F.; PEZZOTI, M.; ARCIONO, S. Electric field mediated fusion of protoplasts of *Medicago sativa* L. and *Medicago arborea* L. **Journal of Plant Physiology**, v. 132, p. 474-479, 1988.
- DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Aspects of protoplast culture and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 12, p. 115-125, 1988.

DEAK, M.; KISS, G. B.; KONCZ, C; DUDITS, D. Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium* mediated gene transfer. **Plant Cell Reports**, v. 5, p. 97-100, 1986.

D'HALLUIN, K.; BOTTERMAN, J.; DE GREEF, W. Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions. **Crop Science**, v. 30, p. 866-871, 1990.

DORNELAS, M. C. Cultura e fusão de protoplastos de *Passiflora* spp. Piracicaba, 1995. 182p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

DU, S.; ERICKSON, L.; BOWLEY, S. R. Effect of plant genotype on the transformation of cultivated alfalfa (*Medicago sativa*) by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 330-334, 1994.

DUDITS, D.; FEJÉR, O.; HADLACZKY, G.; LÁZAR, G.; HORVÁTH, H. Intergeneric gene transfer mediated by protoplasts fusion. **Molecular and General Genetics**, v. 179, p. 283-288, 1980.

ELGIN, J. H. Jr.; OSTAZEKY, S. A. Evaluation of selected alfalfa cultivars and related *Medicago* species for resistance to race 1 and 2 anthracnose. **Crop Science**, v. 22, p. 39-42, 1982.

EVANS, D. A. Use of protoplast fusion for crop improvement. In: CROCOMO, O. J.; SHARP, W. R.; MELO, M. (Ed.) **Biotecnologia para produção vegetal**, Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 1991. p. 391- 430.

FLICK, C. E.; EVANS, D. A. Isolation, culture and plant regeneration from protoplasts isolated from flower petals of ornamental *Nicotiana* species. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 109, p.379, 1983.

FIRN, R. D. Growth substance sensitivity: The need for clearer ideas, precise terms and purposeful experiments. **Physiologia Plantarum**, v. 67, p. 267-272, 1986.

FREARSON, E. M.; POWER, J. B.; COCKING E. C. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. **Developmental Biology**, v. 33, p. 130-137, 1973.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Protoplastos de plantas: isolamento e regeneração. **Ciência e Cultura**, v. 41, p. 1151-1159, 1989.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension culture of soybean roots cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GILMOUR, D. M.; DAVEY, M. R.; COCKING, E. C. Plant regeneration from cotyledon of wild *Medicago* species. **Plant Science**, v. 48, p. 107-112, 1987.

GILMOUR, D. M.; DAVEY, M. R.; COCKING, E. C. Production of somatic hybrid tissues following chemical and electrical fusion of protoplasts from albino cell suspensions of *Medicago sativa* and *M. borealis*. **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 29-32, 1989.

- GOLDS, T. J.; LEE, J. Y.; GHOSE, T. K.; DAVEY, M. R. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of the forage legumes *Medicago sativa* and *Onobrychis viciifolia*. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 1147-1157, 1991.
- GUPTA, P. P.; SCHIEDER, O.; GUPTA, M. Intergeneric nuclear gene transfer between somatically and sexually incompatible plants through asymmetric protoplast fusion. **Molecular and General Genetics**. v. 197, p. 30-35, 1984.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogenese somática e sementes sintéticas. In: TORRE, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPQ, 1999, p. 533-568.
- HACCIUS, B. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, v. 28, p. 74-81, 1978.
- HADDAD, C. M.; CASTRO, F. G. F. Sistemas de produção. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM: ALFAFA. 16., Piracicaba, 1999. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1999, p. 7-22.
- HADDAD, C. M.; DOMINGUES, J. L. Aspectos relacionados à produção de alfafa em áreas tropicais. In: SIMPÓSIO COLÉGIO BRASILEIRO DE FORRAGEIRAS E PASTAGENS, Campinas, 1994. **Anais**. Campinas: CBNA, 1994. p.33.

- HINDSON, S.; McEVANS, A. R.; PORTELANCE, C. Media and genotype effects on the development and conversion of somatic alfalfa (*Medicago sativa* L.) embryos. ***In vitro Cellular Developmental Biology - Plant***, v. 34, p. 181-184, 1998.
- ISAAC, I. Wilt lucerne caused by species of *verticillium*. ***Annals of Biology***, v. 45, p. 550-558, 1957.
- JOHNSON, J. B.; STUTEVILLE, D. L.; HIGGINS, R. K. Pectolyase Y-23 for isolating mesophyll protoplasts from several *Medicago* species. ***Plant Science Letter***, v. 26, p. 113-137, 1982.
- KAO, K. N.; MICHAYLUK, M. R. Nutrient requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. ***Planta***, v. 126, p. 105-110, 1975.
- KAO, K. N.; MICHAYLUK, M. R. Plant regeneration from mesophyll of alfalfa. ***Zeitschrift für Pflanzenphysiologie***, v. 96, p. 135-141, 1980.
- KAO, K. N. Chromosomal behavior in somatic hybrids of Soybean-Nicotiana *glauca*. ***Molecular and General Genetics***, v. 150: p. 225-230, 1977.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use electron microscopy. ***Journal of Cell Biology***, v. 27, p. 137-138, 1965.
- KUCHUCK, N.; KOMARNITSKI, I.; SHAKHOVSKY, A.; GLEBA, Y. Genetic transformation of *Medicago* species by *Agrobacterium tumefaciens* and electroporation of protoplasts. ***Plant Cell Reports***, v. 8, p. 660-663, 1990.

- LI, Y. G.; TANNER, G. J.; DELVEL, A. C.; LARKIN, P. J. Asymmetric somatic hybrid plants between *Medicago sativa* L. (alfalfa, lucerne) and *Onobrychis viciifolis* Scop. (saiófoin). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, p. 455-463, 1993.
- LU, D. Y.; PENTAL, D.; COCKING, E. C. Plant regeneration from seedling cotyledon protoplasts. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 107, p. 59-63, 1982.
- LUPOTTO, E. Programation of an embryogenic of *Medicago sativa* L. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 111, p. 95-104, 1983.
- LUPOTTO, E. The use of single somatic embryo culture in propagating and regenerating lucerne (*Medicago sativa* L.). **Annals of Botany**, v. 57, p. 19-24, 1986.
- MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 333p.
- MARIANI, A. Impiego dell'incrocio interspecifico nel miglioramento genetico dell'erba medica, **Genética Agrária**. v. 22, p. 35-51, 1968.
- MARIANI, A.; ARCIONI, S.; VERONESI, F. Cytological analysis and electrophoresis patterns of seed proteins in *Medicago sativa*, *Medicago glutinosa* and their hybrids. **Genética Agrária**. v. 32, p. 21-39, 1978.
- MARIOTTI, D.; ARCIONI, S.; PEZZOTTI, M. Regeneration of *Medicago arborea* L. plants from tissue and protoplasts cultures of different organ origin. **Plant Science Letters**. v. 37, p. 149-156, 1984.

- MATSUMOTO, T. K.; WEBB, D. T.; KUEHNLE, A. R. Histology and origin of somatic embryos derived from *Anthurium andraeanum* Linden ex André Lamina. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 121, p. 404-407, 1996.
- McCOY, T. J.; BINGHAM, E. T. Cytology and cytogenetics of alfalfa. In: HANSON, A. A.; BARNES, D. K.; HILL, R. R. (Ed) **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, 1988. vol. 29, p. 737-776.
- McEVANS, A. The breeding potential of wild perennial *Medicago* spp. **Acta Agriculture**. v. 16, p. 46-49, 1966.
- McKERSIE, B. D. Somatic embryogenesis in alfalfa: A model for the development of dry artificial seed technology. In: KIGEL, J. & GALILI, G. (Ed) **Seed development and germination**, New York: Marciel Dekker, Inc. 1995, p. 833-845.
- McKERSIE, B. D.; BROWN, D. C. W. Somatic embryogenesis and artificial seeds. In: McKERSIE, B. D.; BROWN, D. C. (Ed.) **Biotechnology and the improvement of forage legumes**, Biotechnology in agriculture series, n. 17, New York: Cab International, 1997, p. 111-143.
- McKERSIE, B. D.; CHEN, Y.; DE BEUS, M.; BOWLEY, S. R.; BOWLER, C. INZÉ, D.; D'HALUIN, K.; BOTTERMAN, J. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant Physiology**, v. 103, p. 1155-1163, 1993.

- McKERSIE, B. D.; MURNAGHAN, J.; BOWLEY, S. R. Manipulating freezing tolerance in transgenic plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 19, p. 485-495, 1997.
- MEIJER, E. G. M.; BROWN, D. C. W. Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 10, p. 11-19, 1987.
- MENDIS, M. H.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Somatic hybrids of the forage legumes *Medicago sativa* L. and *M. falcata* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 1565-1573, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAGARAJAN, P.; McKENZIE, J. S.; WALTON, P. D. Embryogenesis and plant regeneration of *Medicago* spp. in tissue culture. **Plant Cell Reports**, v. 5, p. 77-80, 1986.
- NARVAEZ-VASQUEZ, J.; OROZCO-CARDENAS, M. L.; RYAN, C. A. Differential expression of a chimeric CaMV-tomato proteinase inhibitor I gene in leaves of transformed nightshade, tobacco and alfalfa plants. **Plant Molecular Biology**, v. 20, p. 1149-1157, 1992.
- NENZ, E.; PUPILLI, F.; DAMIANI, F.; ARCIONI, S. Somatic hybrid plants between the forage legumes *Medicago sativa* L. and *Medicago arborea* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 183-189, 1996.

- PAIM, N. R. Utilização e melhoramento da alfafa. In: WORKSHOP SOBRE O POTENCIAL FORRAGEIRO DA ALFAFA (*Medicago sativa* L.) NOS TRÓPICOS. Juiz de Fora, 1994. **Anais**, Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL; 1994, p. 141-147.
- PARROTT, W. A.; DURHAM, R. E.; BAILEY, M. A. Somatic embryogenesis in legumes. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, New York: Springer-Verlag, 1995. v. 29 p. 199-222.
- PASSOS, I., R. S.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M. L. C. Embryogenic responses of *Vitis* spp.: effects of genotype and polyvinylpyrrolidone. **Vitis**. v. 38, p. 47-50, 1999.
- PEREIRA, L. F.; ERICKSON, L. Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v. 14, p. 290-293, 1995.
- POTRIKUS, I. & SHILLITO, R. D. Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration, In: WEISSBACH, A.; WEISSBACH, H. (Ed.) **Methods for Plant Molecular Biology**, New York: Academic Press, 1988, p. 355-383.
- POWER, J. B.; CHAPMAN, J. V. Isolation, culture and genetic manipulation of plant protoplasts. In: DIXON, R. A. (Ed.) **Plant Cell Culture: a practical approach**. Washington: IRL Press, 1985, p.37-66.
- POWER, J. B.; CUMMING, S. E.; COCKING, E. C. Fusion of isolated plant protoplasts. **Nature**, v. 225, p. 1016-1018, 1970.

POWER, J. B.; PEARSON, E. M.; HEYWARD, C.; GEORGE, D.; EVANS, P. K.; BERRY, S. F.; COCKING, E. C. Somatic hybridization of *Petunia hybrida* and *P. paridii*. **Nature**, v. 263, p. 500-502, 1976.

PUPILLI, F.; SCARPA, G. M.; CAMIANI, F.; ARCIONI, S. Interspecific somatic hybrids plants in the genus *Medicago* developed through protoplast fusion. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 84, p. 792-797, 1992.

QUIROS, C. F.; BAUCHAN, G. R. The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. In: HANSON, A. A; BARNES, P. K.; HILL, R. R. Jr. (Ed) **Alfafa and alfafa improvement**. Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, 1988. vol. 29, p. 25-91.

REICH, T. J.; IYER, V. N.; MIKI, B. L. Efficient transformation of alfalfa protoplasts by the intranuclear microinjection of Ti plasmids. **Bio/Technology**, v. 4, p. 1001-1004, 1986.

RENFRO, B. L. & SPRAGUE, E. W. Reaction of *Medicago* species to eight alfalfa pathogens. **Journal of Agronomy**. v. 51, p. 481-483, 1959.

SAKAI, W. S. Simple method for different staining of parafin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, v. 48, p. 247-249, 1973.

SANGWAN, R. S.; BOURGEOIS, Y.; BROWN, S.; VASSEUR, G.; SANGWAN-NORREEL, B. Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 188, p. 439-456, 1992.

- SANTOS, A. V. P.; OUTKA, D. E.; COCKING, E. C.; DAVEY, M. R.
Organogenesis and somatic embryogenesis in tissue derived from leaf protoplasts and leaf explants of *Medicago sativa*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 99, p. 261-270, 1980.
- SAUNDERS, J. W.; BINGHAN, E. T. Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of *Medicago sativa*. **American Journal of Botany**, v. 62, p. 850-855, 1975.
- SCHROEDER, H. E.; KHAN, M. R. I.; KNIBB, W. R.; SPENCER, D.; HIGGIS, T. J. V. Expression of a chicken ovalbumin gene in three lucerne cultivars. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 495-505, 1991.
- SCHWARZACHER, T.; LEITH, A. R.; BENNET, M. D.; HESLOP-HARRISON J. S. In-situ localization of parental genomes in a wide hybrid. **Annals of Botany**, v. 64, p. 315-324. 1989.
- SHAHIN, E. A.; SPIELMANN, A.; SUKHAPINDA, K.; SIMPSON, R. B.; YASHAR, M. Transformation of cultivated alfalfa using disarmed *Agrobacterium tumefaciens*. **Crop Science**, v. 26, p. 1235-1239, 1986.
- SMITH, R. H.; BHASKARAM, S. Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin, Springer-Verlag, 1986. p13-23.
- SPANO, L.; MARIOTTI, D.; PEZZOTTI, M.; DAMIANI, F.; ARCIONI, S. Hairy root transformation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 73, p. 523-530, 1987.

SOMASEGARAN, P.; WACEK, T. Tecnologia para o melhoramento. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM: ALFAFA. 16., Piracicaba, 1999. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1999, p. 215-223.

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.

SUGIMOTO, A.; MATSUOKA, M.; YAMAGUCHI, I.; KATO, S. A Simple method for morphogenic callus formation from protoplasts in sugarcane. **JARQ**, v. 25, p. 289-293, 1992.

SUGIYAMA, M. Genetic analysis of plant morphogenesis *in vitro*. **International Review of Cytology**, v. 196, p. 67-84, 2000.

TÉOULÉ, E.; DATTEÉ, Y. Recherche d'une méthode fiable de culture de protoplastes, d'hybridation somatique et de régénération chez *Medicago*. **Agronomie**, v.7, p. 575-584, 1987.

TÉOULÉ, E. Hybridation somatique entre *Medicago sativa* L. et *Medicago falcata* L. **Academie de Sciences de Paris**, v. 297, p. 16-13, 1983.

UCHIMIYA, H.; MURASHIGE, T. Evaluation of parameters in isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells. **Plant Physiology**, v. 54, p. 963-944, 1974.

VARDI, A.; ARZEE-GONEN, P.; FRYDMAN-SHANI, A.; BLEICHMAN, S.; GALUN, E. Protoplast-fusion-mediated transfer of organelles from *Microcitrus* from *Citrus* and regeneration of novel alloplasmic trees. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 78, p. 741-747, 1989.

VASIL, I. K.; THORPE, T. A. **Plant Cell and Tissue Culture**. London, Kluwer Academic Publishers, 1994. 312p.

VIEIRA, M. L. C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Técnicas de cultura de tecidos aplicadas ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.) **Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**, 2001. /No prelo/.

WALKER, K. A.; SATO, S.J. Morphogenesis in callus tissues of *Medicago sativa*. The role of ammonium ion in somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 1, p. 109-121, 1981.

WALKER, K. A.; WENDELN, M. L.; JAWORSKI, E. G. Organogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*. The temporal separation of induction processes from differentiation processes. **Plant Science Letters**. v. 16: p. 23-30, 1979.

XU, Z. H.; DAVEY, M. R.; COCKING, E. C. Organogenesis from root protoplasts of the forage legumes *Medicago sativa* and *Trigonell foenum-graecum*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 107, p. 231-235, 1982.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

Apêndice 1 – Porcentagem de calos formados aos 21 dias de cultivo, segundo a variedade, explante e densidade de cultivo.

Variedade							
Explante	Densidade	Repetições	Crioula	Alfa 200	Valley Plus	Semit 921	Rangelander
Folhas	0,5	1	3,3	2,9	1,5	3,2	3,3
		2	2,1	2,3	1,6	1,3	2,7
		3	1,3	0,0	2,7	3,9	2,9
	1,0	1	4,0	3,1	3,5	3,0	7,0
		2	3,4	2,4	3,4	3,1	5,4
		3	4,4	2,7	2,4	4,0	5,6
	1,5	1	1,8	1,6	1,9	2,4	3,6
		2	1,8	2,3	1,0	2,1	3,4
		3	1,9	1,3	0,9	3,0	3,1
Cotilédones	0,5	1	26,9	10,0	8,4	7,8	
		2	13,3	17,5	7,0	7,6	
		3	12,5	13,8	9,2	7,1	
	1,0	1	11,0	4,8	5,0	3,8	
		2	15,7	0,9	3,6	3,2	
		3	15,2	3,9	3,6	5,0	
	1,5	1	8,4	3,0	3,3	3,0	
		2	7,0	0,9	3,4	3,5	
		3	9,2	1,3	4,0	3,0	