

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

FRANCISCO JOSÉ BRANDÃO TORRES

**ORGANOGENESE *IN VITRO* DO TOMATEIRO LONGA VIDA
HÍBRIDO 'ALAMBRA'**

ALEGRE

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FRANCISCO JOSÉ BRANDÃO TORRES

ORGANOGENESE IN VITRO DO TOMATEIRO LONGA VIDA
HIBRIDO 'ALAMBRA'

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Augusto Teixeira do Amaral

Co – Orientadores: Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt

Prof. Dr. Ruimário Inácio Coelho

ALEGRE

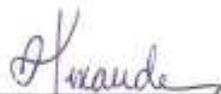
2008

ORGANOGENESE *IN VITRO* DO TOMATEIRO LONGA VIDA HIBRIDO 'ALAMBRA'

FRANCISCO JOSÉ BRANDÃO TORRES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal para obtenção do título de Magister Scientiae em Produção Vegetal.

Aprovada em 10 de julho de 2008.



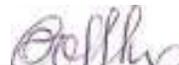
Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre
Escola Agrotécnica Federal de São João
Evangelista



Prof. Dr. José Francisco T. do Amaral
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt
Universidade Federal do Espírito Santo
(Co - Orientador)



Prof. Dr. Ruimário Inácio Coelho
Universidade Federal do Espírito Santo
(Co - orientador)



Prof. Dr. José Augusto Teixeira do Amaral
Universidade Federal do Espírito Santo
(Orientador)

À minha esposa Rita de Cássia, amiga e companheira de todos momentos, aos meus filhos Marcelo, Priscila e Larissa, meus presentes “Divinos” e aos meus netos Antonio e Miguel que trouxeram nova alegria à minha existência.

Aos meus queridos pais José de Oliveira Torres (*In memorian*) e Iza Brandão Torres, que apesar de todas as dificuldades impostas em suas caminhadas me propuseram educação e exemplo de vida para que eu pudesse alcançar mais esta vitória.

Aos meus tios Vera e Adilson Torres, que foram um dos marcos fundamentais na minha carreira, e também uns dos grandes responsáveis por mais esta conquista.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência.

Ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de realizar esse trabalho.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal (PPGPV) do CCA-UFES, pela oportunidade concedida

Ao meu orientador, Professor Dr. José Augusto Teixeira do Amaral, pela orientação das pesquisas, pelo apoio, conhecimentos transmitidos, sugestões e amizade.

Ao meu co-orientador, Professor Dr. Edílson Romais Schmildt, pelas valiosas contribuições e sugestões apresentadas à dissertação e amizade.

Ao meu co-orientador, Professor Dr. Ruimário Inácio Coelho, pelo incentivo, amizade, sugestões e contribuições apresentadas para esta dissertação.

Aos professores do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, pela amizade, compreensão e apoio.

Aos colegas de mestrado da Pós-Graduação em Produção Vegetal do CCA-UFES, pela convivência e apoio durante a realização do curso, especialmente a Izaias dos Santos Bregonci, pelo companheirismo.

Em especial, à minha esposa Rita de Cássia, pelo carinho, amizade, apoio companheirismo e dedicação, minha sincera gratidão.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, registro a minha gratidão.

BIOGRAFIA

Francisco José Brandão Torres, filho de José de Oliveira Torres e Iza Brandão Torres, nasceu em 1951, em Cachoeiro de Itapemirim-ES.

Em 1970, iniciou o curso de Agronomia na Escola Superior de Agronomia do Espírito Santo (ESAES), hoje Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, onde foi diplomado em 1974, obtendo o título de Engenheiro Agrônomo.

Em 1975, foi aprovado em concurso público para o quadro de professor auxiliar de ensino da ESAES, onde permanece até a presente data, estando como professor Adjunto IV.

Em 1975, fez o curso de especialização em Fisiologia Vegetal e Botânica Geral na Escola Superior de Agronomia de Lavras - MG.

De 1976 a 1978, fez curso de especialização em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa-MG.

Em março de 2006, iniciou o curso de Mestrado em Produção Vegetal no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, em Alegre-ES. Defendeu tese em julho de 2008.

RESUMO

TORRES, FRANCISCO JOSÉ BRANDÃO, M.Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, Junho de 2008. **Organogênese *in vitro* do tomateiro Longa vida cv. Híbrido 'Alambra'**. Orientador: José Augusto Teixeira do Amaral. Co-orientador: Edilson Romais Schmildt; Ruimário Inácio Coelho.

Experimentos em meio de estabelecimento e de multiplicação para avaliar a regeneração vegetativa *in vitro* do tomateiro foram realizados no desenvolvimento desta pesquisa. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, localizado na cidade de Alegre, onde segmentos apicais, nodais, hipocótilos e folhas cotiledonares inteiras retirados de plântulas germinadas *in vitro* (Anexo A) foram utilizados como explantes para a organogênese do tomateiro longa vida cv. Híbrido 'Alambra'. Os explantes foram inoculados em frascos de vidro em meio de cultivo e subcultivados três vezes. Em cada subcultivo, as plantas permaneceram em sala de crescimento em condições controladas de fotoperíodo de 16 horas (16 horas luz/8 horas escuro) e intensidade luminosa de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fótons fotossintéticos através de lâmpada tipo luz-do-dia, marca OSRAM, e temperatura controlada de $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, onde permaneceram por 21 dias para cada subcultivo, período necessário à maturação fisiológica dos explantes. Após o terceiro subcultivo, as plântulas foram transferidas para alongamento de ramos utilizando-se 1 mg L^{-1} de cinetina no meio de cultivo e, para indução de rizogênese, as plântulas foram transferidas para meio de cultivo acrescentado-se 1 mg L^{-1} de cinetina e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético (ANA). As plântulas foram mantidas em sala de crescimento onde permaneceram durante trinta dias. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e oito repetições num total de 32 frascos. As variáveis utilizadas para análise de alongamento de ramos foram: comprimento de caule, número de ramos, número de folhas e tamanho de calo, e, além dessas variáveis, foram acrescentados para enraizamento: comprimento e matéria fresca das raízes. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias dos

tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 1 e 5% de significância. O melhor tipo de explante para a maioria das variáveis analisadas é segmento apical. Explantes oriundos de hipocótilos e folhas cotiledonares inteiras não são reativas para induzir calogênese e rizogênese, sendo reativas somente para formação de calos.

Palavras-chave: *Solanum Lycopersicon L.*, 'Alambra', propagação vegetativa, meio de iniciação, explantes.

ABSTRACT

TORRES, FRANCISCO JOSÉ BRANDÃO, M. Sc., Universidade Federal do Espírito Santo, July, 2008. **Organogenesis *in vitro* of the Long-life tomato plant hybrid 'Alambra'**. Adviser: José Augusto Teixeira do Amaral. Co-advisers: Edilson Romais Schmildt; Ruimário Inácio Coelho.

Experiments in medium of establishment and of multiplication to evaluate the regeneration vegetative *in vitro* of the tomato plant were accomplished in the development of this research. The work was development in the Laboratory of Vegetal Tissue Culture of the Department of Vegetal Production of the Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, located in the Alegre city, where apical segments, nodal segments, hypocotyls and entire leaves cotyledon removed of seedling germinated *in vitro* were used as explants for the regeneration of the long-life tomato plant 'Alambra'. The explants were inoculated in glass bottles in medium of establishment and subcultured three times. In each subculture the plants remained in growth room in controlled conditions of photoperiod of 16 hours (16 light/8 hours of dark) and light intensity of $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetic photons through of light-bulb type light-of the day, mark OSRAM and controlled temperature of $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ where remained per 21 days for each subculture, necessary period to the physiological maturation of the explants. After the third subculture the seedlings were transferred to branch lengthening using 1 mg L^{-1} of kinetin in the culture medium and the seedling were transferred to MS medium (MURASHIGE; SKOOG, 1962) added of 1 mg L^{-1} of kinetin e 0.1 mg L^{-1} of naphthaleneacetic acid (NAA) for induction of rooting. The seedlings were kept in growth room where remained during thirty days. The experimental design was completely randomized with four treatments and eight repetitions for treatment in a total of 32 bottles. The variable used for analyze of branch lengthening were: stem length, branch number, leaf number and callus size and for rooting the variable root length and fresh matter were increased. The collected data were submitted to the variance analyze by F test and the averages of the treatments compared by Tukey test at the level of 1 and 5%

of significance. The best explante type for most of the analyzed variables is segment apical. Explantes originating from of hypocotyls and entire leaves cotyledon are not reactive to induce callogenesis and rhizogenesis, being only reactive for formation of calluses.

key Words: *Solanum lycopersicum L.*, 'Alambra', plant propagation, medium initiation, explants.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Resumo da análise de variância para o comprimento do caule em quatro tipos de explantes	30
Tabela 2-	Resumo da análise de variância para o número de ramos em quatro tipos de explantes	32
Tabela 3-	Resumo da análise de variância para o número de folhas em quatro tipos de explantes	33
Tabela 4 -	Resumo da análise de variância para o tamanho do calo em quatro tipos de explantes	35
Tabela 5-	Resumo da análise de variância para comprimento do caule em dois tipos de explantes.....	37
Tabela 6-	Resumo da análise de variância para número de ramos em dois tipos de explantes	38
Tabela 7-	Resumo da análise de variância para número de folhas em dois tipos de explantes.....	39
Tabela 8-	Resumo da análise de variância para comprimento de raízes em dois tipos de explantes	40
Tabela 9-	Resumo da análise de variância para matéria frescas das raízes em dois tipos de explantes	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Média de comprimento de caule em quatro tipos de explantes.....	31
Figura 2-	Média de número de ramos em quatro tipos de explantes.....	32
Figura 3-	Média de número de folhas em quatro tipos de explantes.....	34
Figura 4-	Média de nota de calo em quatro tipos de explantes.....	36
Figura 5-	Média de comprimento de caule e dois tipos de explantes	37
Figura 6-	Frequência média de número de ramos e dois tipos de explantes.....	38
Figura 7-	Frequência média de número de folhas em dois tipos de explantes...	39
Figura 8-	Média de regeneração de raízes e dois tipos de explantes	40
Figura 9-	Média de matéria fresca das raízes em dois tipos de explantes.....	42

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1	Explantes de hipocótilo <i>in vitro</i> de tomate híbrido 'Alambra'.....	28
Fotografia 2	Explantes de hipocótilo <i>in vitro</i> de tomate híbrido 'Alambra'.....	28
Fotografia 3	Explantes de hipocótilo <i>in vitro</i> de tomate híbrido 'Alambra'.....	33
Fotografia 4	Explantes de folhas cotiledonares inteiras <i>in vitro</i> de tomate híbrido 'Alambra'.	34
Fotografia 5	Multiplicação e enraizamento <i>in vitro</i> de tomate híbrido 'Alambra'. ..	42
Fotografia 6	Multiplicação e enraizamento <i>in vitro</i> de tomate híbrido Alambra' (raízes volumosas e compridas.....	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	CARACTERÍSTICAS DA CULTURA.....	15
2.2	PROPAGAÇÃO VEGETATIVA.....	17
2.3	ESTABELECIMENTO DE EXPLANTES E MULTIPLICAÇÃO DAS PLÂNTULAS.....	20
2.4	ESTÁGIOS DA MULTIPLICAÇÃO VEGETATIVA <i>IN VITRO</i>	22
2.5	COMPOSIÇÕES DOS MEIOS DE CULTURA.....	25
3.0	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1	OBTENÇÕES DOS EXPLANTES.....	26
3.2	INDUÇÃO, MULTIPLICAÇÃO E ALONGAMENTO DE RAMOS.....	27
3.3	INDUÇÃO DE RIZOGÊNESE.....	27
4.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.0	CONCLUSÃO.....	43
6.0	REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum Lycopersicon L.*) é uma das olerícolas mais plantadas e consumidas no mundo (AGRIANUAL, 2007). A China é considerada o maior produtor mundial, seguida pelos Estados Unidos da América, que juntos produzem em torno de 30% da produção mundial total (FONTES; SILVA, 2002). O Brasil ocupa a sexta posição mundial, com produtividade que situa entre 45 a 60 t ha⁻¹, sendo responsável pela produção de 3.641.402 t (IBGE, 2004).

No Brasil o tomate ocupa o 2º lugar entre as olerícolas na produção/consumo, sendo o consumo de 5,3 Kg per capita/ano (MULTIPLICAÇÃO..., 2007). A cultura concentra-se em vários estados brasileiros, sendo Goiás o maior produtor, seguido por São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Bahia que juntos são responsáveis por 77% da produção brasileira (IBGE, 2004).

As variedades originadas da espécie *Solanum Lycopersicon L.*, como Santa Clara, Ângela Hiper, Ângela Super, Ângela Gigante, Kadá (FONTES; SILVA, 2002; FILGUEIRA, 1981), ocuparam até a década de 80 mais de 80% da produção de tomate brasileira. Entretanto, essas cultivares ainda possuíam características indesejáveis para o consumidor exigente, tais como: baixa resistência às injúrias mecânicas provocadas durante o período de colheita, transporte, amadurecimento e amolecimento precoce do fruto e menor tempo de prateleira (GUALBERTO; BRAZ; BANZATO, 2002).

Na década de 80, foi introduzida no mercado americano o híbrido longa vida com o gen anti-senso 'Flarv Sarv' que retarda o amolecimento e amadurecimento do fruto, proporcionando maior resistência mecânica do mesmo na época de colheita, transporte, acondicionamento, como também prolongando seu período de prateleira para até 30 dias pós-colhido (FERREIRA, 2004). Em seguida, surgiram novos híbridos longa vida (gen rin), não transgênicos. Atualmente, respondem por mais de 70% da produção brasileira de tomate de mesa (DELLA VECHIA; KOCH, 2000), sendo que dentre as principais variedades de híbridos longa vida, o híbrido 'Alambra' é o mais cultivado nas regiões produtoras do Brasil, e dentre elas, o Estado do Espírito Santo tem 90% de seu cultivo dedicado a essa variedade. A resistência mecânica, cor, sabor e firmeza do fruto dessa variedade de tomateiro proporcionam

maior flexibilidade ao produtor por ocasião da colheita, menores perdas nas operações de classificação, embalagem, transporte e comercialização dos frutos (FERREIRA, 2004). Essas características são de fundamental importância no incremento da produtividade e qualidade do tomate produzido no Brasil (DELLA VECHIA; KOCH, 2000).

A cultura do tomateiro é altamente susceptível ao ataque de fungos, bactérias, vírus e insetos, por conseguinte aplicações maciças de defensivos químicos são utilizadas de maneira preventiva e periodicamente contra a ação desses agentes fitopatogênicos, aumentando ainda mais o custo de produção para os tomatocultores. Assim sendo, há necessidade de se buscar alternativas à reprodução seminífera, objetivando minimizar o custo de produção, em virtude das sementes serem importadas, tornando-se muito onerosas. A propagação vegetativa *in vitro* é uma ferramenta da biotecnologia que se baseia na capacidade de regeneração de uma planta completa a partir de células ou fragmentos de tecidos denominados explante. Ou seja, baseia-se no princípio de que toda célula é totipotente, isto é, tem competência para regenerar um organismo completo, desde que desenvolvida em condições de meio nutritivo adequado, para que possa expressar sua capacidade organogenética (LINDHIST, 2006).

Os explantes são cultivados em meio de cultivo dentro de frascos de vidro em condições assépticas, proporcionando a produção em massa de plântulas isentas de agentes contaminantes.

Os explantes são retirados de plantas matrizes de boa qualidade produzidas *in vitro* ou *ex vitro*. Explantes produzidos *ex vitro* devem ser desinfestados, normalmente com hipoclorito de sódio e álcool etílico, para serem utilizados. Vários tipos de explantes podem ser utilizados, tais como: segmento apical, segmento nodal, cotilédones inteiros, cotilédones fendidos, folhas e discos foliares. O sucesso na regeneração morfogênica das plantas depende de vários fatores, tais como: idade dos explantes, tipo de explantes, espécie vegetal, concentração de reguladores de crescimento e nutrição mineral.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de identificar o tipo de explante mais eficiente para regeneração morfogênica *in vitro* do tomateiro 'Alambra', buscando a obtenção em massa de plântulas com alta qualidade fitossanitária e genética em menor espaço geográfico e temporal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS DA CULTURA

No Brasil e na China, respectivamente, 62% e 95% da produção de tomate é destinada ao consumo *in natura*, enquanto que nos Estados Unidos da América esse valor é de 21%, o restante é destinado à indústria de alimentos (FONTES; SILVA, 2002).

No Brasil, o tomate ocupa o 2º lugar entre as olerícolas na produção/consumo, sendo seu consumo igual a 5,3 kg per capita/ano (IBGE, 1998). A cultura encontra-se concentrada em vários estados brasileiros, sendo Goiás o maior produtor, seguido de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Bahia, que juntos são responsáveis por 77% da produção Brasileira (IBGE, 2004)

É uma cultura de grande expressão econômica por ser uma fonte de alimentação humana, rico em açúcares, ácidos orgânicos, licopeno em média de $1,33 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ (anti-cancerígeno), vitaminas do complexo A e do complexo B, minerais, cálcio, fósforo e ácido fólico. Apresenta também expressão social, pois congrega mais de 10.000 produtores, com 60.000 famílias de trabalhadores, compostas por um efetivo de mais de 200.000 trabalhadores (TAVARES, 2003).

O tomateiro é originário da América Central e do Sul, nas regiões andinas do Peru e da Bolívia (PERALTA, I. S; KNAPP, S SPOONER, D.M, 2005) e foi difundido para outros continentes. Foi introduzido no Japão pelos portugueses, vindo do sudeste da Ásia ou da China.

Taxonomicamente, o tomateiro comercial é uma dicotiledonea, pertencente à ordem Tubiflorae, família *Solanaceae*, gênero *Lycopersicon*, espécie *Lycopersicon esculentum* Mill, cujo nome foi uma homenagem a MILLER, que foi o primeiro botânico a propor sua classificação botânica em 1754 (MINAMI; HAAG, 1989). Todavia, existe proposta para mudança de sua classificação botânica para *Solanum lycopersicon* L. (PERALTA, I. S; SPOONER, D.M, 2005)

O tomateiro é uma planta herbácea de caule redondo, piloso e macio, anguloso na fase juvenil, tornando-se fibroso, posteriormente (MINAMI; HAAG, 1989), de

crescimento indeterminado, com altura superior a dois metros. As flores são hermafroditas, pequenas, de coloração amarela, em número de 3 a 12, reunidas em forma de cacho. Quando fecundadas desprendem-se do pedúnculo originando o fruto que é uma baga carnuda, suculenta de coloração vermelha, quando madura, unilocular ou plurilocular (FILGUEIRA, 1981). A parede do ovário denomina-se pericarpo e possui três camadas: exocarpo, mesocarpo e endocarpo (FONTES; SILVA, 2002).

A espécie *Lycopersicon esculentum* deu origem a muitas variedades e, até os dias atuais, é a mais cultivada em todo mundo. Muitas variedades surgiram nas diferentes regiões produtoras, sendo que o nome geralmente está relacionado com a região de origem ou com o nome da empresa criadora da variedade. Do cruzamento das cultivares rei Umberto e a variedade chacareiro (japonesa) ocorrido na cidade de Suzano (SP), entre 1935 a 1940, surgiu uma nova variedade que teve grande aceitação comercial. Com a organização da colônia nipônica de Santa Cruz no Rio de Janeiro, a nova cultivar foi denominada Santa Cruz (FERREIRA, 2004).

A partir da variedade Santa Cruz surgiram outras, como: Santa Clara, Ângela hiper, Ângela Super, Ângela Gigante, Kadá (FONTES; SILVA, 2002). Essas variedades ocuparam até a década de 80 mais 80% da produção de tomate brasileira, que apesar de possuírem rusticidade, ainda possuíam características indesejáveis para o consumidor exigente, tais como: baixa resistência às injúrias mecânicas provocadas durante o período de colheita, transporte, amadurecimento e amolecimento precoce do fruto e menor tempo de prateleira (GUALBERTO; BRAZ; BANZATO, 2002).

A partir de 1984, foi introduzida no mercado americano uma variedade híbrida com o gen anti-senso 'Flarv Sarv' que retarda o amadurecimento precoce do fruto por comandar a expressão da poligalactunorase, enzima que retarda a quebra da celulose da parede celular do fruto, proporcionando maior resistência ao fruto, na colheita, transporte, acondicionamento e também prolongando seu período de prateleira para até 30 dias pós-colhido (FERREIRA, 2004).

Em seguida, surgiram novos híbridos longa vida (Gen rin), como as variedades: 'Alambra', 'Carmem', 'Raísa', 'Densus hortices' (GUALBERTO; BRAZ; BANZATTO, 2002) que atualmente respondem por mais de 80% da produção brasileira de tomate de mesa.

A resistência mecânica, cor, sabor e firmeza do fruto dessa variedade de tomate proporcionam maior flexibilidade ao produtor: na ocasião da colheita, menores perdas nas operações de classificação, embalagem, transporte e comercialização dos frutos (FILGUEIRA, 1981, FERREIRA, 2004). Características que são de fundamental importância no incremento da produtividade e qualidade do tomate produzido no Brasil (DELLA VECCHIA; KOCK, 2000). Devido à grande produtividade, alta qualidade e aceitação comercial das variedades longa vida no mercado brasileiro, associado ao processo tecnológico de produção de sementes e a importação das mesmas, estas se tornaram onerosas.

A cultura do tomate, assim como a do pimentão, batata, jiló e plantas da família *Solanacea*, são altamente susceptíveis aos ataques de fungos, bactérias vírus e insetos, aplicações maciças de defensivos químicos necessitam ser utilizados de maneira preventiva e periodicamente contra a ação desses agentes fitopatogênicos, aumentando ainda mais o custo de produção para os tomaticultores. Assim sendo, há necessidade de se buscar alternativas à reprodução seminífera, objetivando minimizar o custo de produção, principalmente para aqueles que possuem menor poder aquisitivo.

2.2 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

A propagação vegetativa é uma ferramenta da biotecnologia que se baseia na capacidade de regeneração de uma planta completa a partir de células ou fragmentos de tecidos denominados explante (PERALTA). Ou seja, baseia-se no princípio de que toda a célula é totipotente, isto é, tem competência para regenerar um organismo completo, desde que desenvolvida em condições de meio nutritivo adequado, para que possa expressar sua capacidade organogenética (LINDHIST, 2006).

Quando o explante é composto de células embrionárias ou meristemáticas pode ocorrer embriogênese ou organogênese somática direta (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986), isto é, de uma célula ou tecido indiferenciado pode-se produzir diretamente um órgão ou tecido.

Explantes oriundos de tecidos ou órgãos diferenciados inicialmente formam uma massa desorganizada de células denominada calo, que sofrem desdiferenciação celular originando embriogênese ou organogênese somática indireta e, segundo Fosket (1994), a organogênese ocorre através de atividades dos tecidos meristemáticos os quais induzem a formação de órgãos vegetais, como caule raízes e folhas, no processo de regeneração *in vitro*. Carry et al. (2001) conceituam a competência de um tecido como o potencial para formar um novo órgão em resposta a um estímulo hormonal específico. Assim sendo, a falta de competência organogenética em um determinado tecido poderia ser explicada pela ausência de receptores ao hormônio envolvido na indução da organogênese (INOUE et al., 2000).

O controle do desenvolvimento de raízes é influenciado por substâncias reguladoras de crescimento, sendo que o alongamento de raízes primárias é inibido por concentrações endógenas de auxina maiores que 10^{-8} M, enquanto que a iniciação de raízes laterais e adventícias é estimulada por altos níveis de auxina (TAIZ; ZEIGER, 2004). Na regeneração *in vitro* por organogênese, a relação dos hormônios citocininas e auxinas influenciam diretamente na formação dos órgãos da plântula. As citocininas são classes de hormônios que estimulam a divisão celular e alongamento de ramos, enquanto as auxinas estimulam o crescimento de raízes e podem induzir a formação de calogênese (GEORGE; SHERRINGTON, 1984; GEORGE, 1996).

A fonte de explante é outro fator que influi a organogênese *in vitro*. Os tecidos meristemáticos por serem constituídos de células indiferenciadas apresentam maior competência organogenética, principalmente os localizados nas gemas apicais e axilares (PERES, 2002). Segundo Aung, Bryan e Byrne (1975) os tecidos vegetais apresentam diferentes potenciais de competência organogenética posto que quanto maior a determinação de um explante para formar gemas, menor é sua competência para originar raiz.

Estudos realizados por Koornneef et al. (1993) e Smith, Jackson e Hake (1995) indicam que a competência e a determinação dos explantes resultam da ação diferencial de genes que regulam as etapas do desenvolvimento.

De acordo com Peres e outros (2001), a regeneração de algumas espécies selvagens de tomate é controlada por um ou dois genes.

Explantes que falham em formar um determinado órgão *in vitro*, por estarem “determinados”, podem ter perdido a capacidade de expressão de genes mestres durante um processo intenso de diferenciação sofrido anteriormente (PERES, 2002).

Segundo Borges, Benbadis e Marco (2005), trabalhando com explantes de folhas e raízes de tomateiro, não observaram regeneração de brotos em nenhuma variedade testada. Citam que provavelmente tenha ocorrido falha de competência no genótipo desses explantes, perdendo sua capacidade de regeneração.

Torres e outros (1998) citam que podem ser obtidas respostas diferentes na indução da organogênese *in vitro* do mesmo tecido ao se modificar a dosagem de fontes de açúcares e vitaminas do meio de cultura. A amplitude de respostas organogenética também ocorre em função da alteração da composição mineral do meio de cultivo. As principais vantagens da propagação vegetativa são os altos coeficientes de multiplicação que permitem manipular volumes elevados de plântulas isentas de agentes fitopatogênicos e pragas em curto espaço e tempo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), bem como: introdução rápida de novas variedades ou clones, saneamento de doenças, manutenção de germoplasmas, resgate de embriões interespecíficos e uniformidade das plântulas produzidas.

A cultura de segmentos apicais e os segmentos nodais têm sido utilizados para estabelecer organogênese *in vitro* em várias culturas, incluindo mamoeiro (SCHMILDT, 1994; SCHMILDT, 2006) e tomateiro (ALMEIDA; OLIVEIRA; LOYOLA, 2001; BORGES; BENBADIS; MARCO, 2005). A técnica permite a produção de explantes livres de patógenos, com o objetivo de produzir material de alta qualidade fitossanitária. Esses tipos de explantes apresentam maior competência organogenética, visto que são formados de células perenes embrionárias e indiferenciadas (FAHN, 1967). A cultura desses segmentos consiste na excisão em condições assépticas do meristema apical e lateral, contendo um ou dois primórdios foliares que ainda não estabeleceram conexão vascular com o restante da planta (TORRES; TEIXEIRA; POZZER, 1998).

A organogênese está relacionada com a formação de eixos caulinares originados de gemas pré-existentes ou neoformadas. Esses eixos são induzidos ao enraizamento *in vitro* ou *ex vitro*, resultando em plântulas completas que podem ser aclimatizadas e em seguida aclimatadas. Na organogênese direta, a partir de um explante primário, há a formação de um eixo caulinar a partir de gemas apicais, laterais ou

axilares. Na organogênese indireta, ocorre inicialmente a desdiferenciação do explante, resultando na formação de calos (calogênese), que pode ser definido como a proliferação de uma massa de células indiferenciadas originando meristemóides (THORP, 1989).

De modo geral, a formação de calos não é desejável para a propagação vegetativa, uma vez que a constituição cromossômica desse material é instável, podendo originar variantes genéticas, devido à variação somaclonal (LARKINS; VASIL, 2000).

Segundo Fachinello et al. (1995), a formação de calo na zona de enraizamento é indesejável, pois pode afetar a qualidade das raízes, principalmente no que se refere à conexão vascular com a planta. Esse enraizamento não é interessante para trabalhos visando propagação de plantas, pois essas raízes raramente possuem conexões vasculares com ramos regenerados a partir de calo (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

2.3 ESTABELECIMENTOS DE EXPLANTES E MULTIPLICAÇÃO DAS PLÂNTULAS

A propagação vegetativa, ferramenta da biotecnologia, se baseia na capacidade de regeneração de uma planta completa, a partir de células ou fragmentos de tecidos vegetais reconhecidos como explantes (GEORGE, 1996; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GEORGE; SHERRINGTON, 1984; MURASHIGE; 1962; MURASHIGE; SKOOG, 1974).

Baseado no que orienta Schleiden (1838) e Schwan (1839), citados por Lindhist (2006), toda célula tem competência para regenerar um organismo completo, desde que desenvolvida em condições de meio nutritivo adequado, para que possa expressar sua capacidade organogenética, vê-se então aí a base da propagação vegetativa.

As principais vantagens da propagação vegetativa *in vitro* são os altos coeficientes de multiplicação que permitem manipular volumes elevados de plântulas isentas de agentes fitopatogênicos e pragas em curto espaço e tempo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, citado por TORRES; CALDAS; BUSO, 1998), introdução rápida de

novas variedades ou clones, saneamento de doenças, manutenção de germoplasmas, resgate de embriões interespecíficos e uniformidade das plântulas produzidas.

Na propagação *in vitro*, as plantas se desenvolvem dentro de frascos de vidro contendo meio de cultura. De acordo com Decatti (2000), das plantas cultivadas *in vitro* em condições adequadas e em presença de reguladores de crescimento, controle de luminosidade e fonte de carbono no meio de estabelecimento, pode-se obter matrizes isentas de agentes fitopatogênicos para obtenção de explantes.

Vários trabalhos têm sido conduzidos com a espécie do gênero *Lycopersicon*, entretanto poucos foram desenvolvidos para estabelecer protocolos de regeneração *in vitro* dessa espécie. Vários autores encontraram diferentes resultados quando utilizaram diferentes tipos de explantes nessa espécie, tais como cotilédones fendidos (ALMEIDA; OLIVEIRA; LOYOLA, 2001; FARI et al. 2000), folha cotiledonar inteira, base e ápice de folha cotiledonar, hipocótilo, raízes e folhas definitivas (BORGES; BENBADIS; MARCO, 2005) e discos foliares.

No gênero *Lycopersicon*, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos, mas poucos com cultivo *in vitro*, principalmente com o tomate longa vida híbrido 'Alambra', hoje responsável por mais de 80% da produção brasileira de tomate de mesa.

Com base no processo de propagação vegetativa *in vitro*, procurou-se desenvolver um trabalho para determinar o melhor tipo de explante para a regeneração morfogênica dessa variedade, possibilitando a produção maciça de plantas de qualidade genética e fitossanitária.

2.4 ESTÁGIOS DA MULTIPLICAÇÃO VEGETATIVA IN VITRO

A propagação vegetativa *in vitro*, de acordo com Murashige (1974), ocorre em quatro estágios, observando uma seqüência laboratorial: estágios I, II, III e IV. Debergh e Read (1991) propuseram o estágio zero, seqüência em que a indução e expressão das respostas morfogênicas *in vitro* devem seguir os passos abaixo citados.

Estágio 0 – Consiste em selecionar e cultivar a planta matriz doadora de explantes em condições adequadas e, eventualmente, controladas. Isso significa que pode ser

necessário modificar as condições de fotoperíodo e temperatura, ou aplicar a essa planta fitorreguladores do grupo das giberelinas e auxinas, alterando com isto a sua condição fisiológica.

Estágio I – Consiste no estabelecimento da cultura isenta de agentes contaminantes. O objetivo desse estágio é a definição do tipo de explante a ser utilizado, o seu alto índice de sobrevivência e rápido crescimento. Neste estágio torna-se necessário monitorar e controlar as reações de oxidação que ocorrem no meio de cultivo: como:

- a) respostas a ferimentos provocados nos explantes pela excisão do órgão ou tecido quando retirado da planta matriz;
- b) incubação dessas culturas na ausência da luz por alguns dias pode inibir os processos oxidativos.

Estágio II - Multiplicação: este estágio é fundamentado na divisão e diferenciação celular, objetivando a obtenção de uma plântula, de acordo com as diferentes rotas morfogénicas possíveis. De maneira geral, procura-se promover a liberação de gemas axilares pré-formadas ou a indução de gemas adventícias. Em muitos casos, estágios intermediários de calo estão envolvidos, contudo, quando o objetivo é a manutenção da conformidade clonal, a passagem por estágios de calo deve ser evitada, tendo em vista a possibilidade de ocorrência de variações somaclonais.

Nesse estágio deve-se determinar o número e o intervalo de subcultivos, bem como determinar e otimizar a taxa de multiplicação, ou seja, o número de gemas ou de eixos caulinares que podem ser obtidos a partir de cada inócuo nos subcultivos. A partir desses subcultivos podem aparecer mutantes ou variantes somaclonais.

As condições ambientais nesse estágio relacionam-se com a temperatura, cuja faixa ótima está entre 27 e 29 °C para plantas de clima temperado e tropical, respectivamente. O período de luz deve permanecer em torno de 16 a 18 horas em intensidades luminosas médias de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fótons fotossintéticos.

Estágio III - Nesta fase procura-se alongar ramos, induzir a iniciação radicular e a preparação para a aclimatização. Nesse estágio ocorre a preparação para a conversão das condições heterotróficas para autotróficas. As estratégias desse estágio incluem eventuais inclusões no meio de cultura de:

- a) GA_3 para induzir o alongamento de eixos caulinares;

- b) AIB para induzir a iniciação radicular;
- c) carvão ativado para favorecer a iniciação radicular.

Reduções nas concentrações dos sais e das fontes de carboidratos do meio de cultura podem trazer benefícios à iniciação radicular, bem como facilitar o processo de aclimatização.

Este estágio inicia-se com a obtenção de explantes mais adequados para a propagação vegetativa e termina com a obtenção de plantas livres de agentes contaminantes visíveis e adaptadas completamente às condições *in vitro*.

Um dos primeiros meios de cultura desenvolvidos foi o de White (1934), meio que apresenta baixo nível de nitrogênio e de potássio, restringindo o seu uso para muitas células, entretanto, essa formulação com baixa concentração em sais, é usada em muitas situações. O meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) foi uma das primeiras formulações melhoradas usadas em cultura de tecidos de plantas, apresentando altos níveis de nitrato, potássio e amônio, sendo um dos meios de cultivo mais utilizado atualmente.

2.5 COMPOSIÇÕES DOS MEIOS DE CULTURA

Um dos meios nutritivos bastante utilizados no cultivo *in vitro* é o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), que é constituído de macro e micro elementos essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plântulas. Além desses elementos, também são adicionados ao meio sais orgânicos e vitaminas, fonte de carbono e hormônios vegetais nas diferentes etapas do desenvolvimento das plântulas. Tendo em vista que esse estágio da cultura *in vitro* pode representar 30 a 60% do custo de uma planta propagada, muitos laboratórios preferem promover o enraizamento *ex vitro*, estratégia que deve ser considerada sempre que possível.

Estágio IV - Aclimatização: neste estágio ocorre a transição da condição heterotrófica para autotrófica. O principal objetivo neste estágio é diminuir ao máximo as perdas que ocorrem principalmente pela desidratação dos tecidos da microplanta. O emprego de estufas, túneis plásticos, sistemas de nebulização e de antitranspirantes deve ser considerado para cada situação, tendo em vista que as

plantas nesse estágio normalmente não apresentam estômatos funcionais e suas folhas têm reduzida capacidade de formação de cutículas cerosas protetoras.

Composições adequadas de substratos também são importantes e, na maior parte dos casos, o emprego de areia, terra, vermiculita, casca de arroz carbonizada isoladamente ou em misturas proporcionais, resulta em elevados índices de sobrevivência.

De maneira geral, esse estágio inicia com a retirada das plântulas dos frascos e a cuidadosa remoção por lavagem de resíduos de meio de cultura solidificado junto ao sistema radicular. Um segundo passo consiste em repicar as plântulas para bandejas de isopor contendo o substrato autoclavado, cuja composição foi previamente determinada. O terceiro passo consiste em manter as bandejas, por períodos de até 15 dias, em sala de cultura cuja temperatura, duração e intensidade luminosa possam ser controladas.

A manutenção de uma câmara úmida sobre as bandejas pode ser feita pela utilização de filmes plásticos em cobertura. Posteriormente, transfere-se as bandejas para uma estufa com sistema de nebulização intermitente por períodos médios de 15 a 30 dias, podendo depois repicar as plântulas para sacos plásticos contendo uma mistura convencional não autoclavada de solo argiloso, arenoso e matéria orgânica e mantê-las em condição de ripado ou cobertura com sombrite que deixem passar em torno de 50% da luminosidade.

Por fim procede-se uma retirada gradual da cobertura para que as mudas sejam submetidas às condições normais que se verificam após o transplante para o local definitivo. É importante salientar que determinadas seqüências destas operações podem ser eliminadas em algumas espécies. Para abacaxizeiro, por exemplo, o segundo passo anteriormente descrito pode ser eliminado e não há a necessidade de ser feita a repicagem para sacos plásticos, podendo as mudas ser comercializadas ou enviadas ao campo nas bandejas de isopor. Torna-se necessário, portanto, estabelecer procedimentos específicos.

Os meios nutritivos são formados por múltiplos componentes, sendo bastante variáveis em função da espécie vegetal e da origem do explante. É constituído de componentes essenciais e opcionais. Os essenciais compreendem a água, os sais inorgânicos, a fonte de carbono e energia, as vitaminas e as substâncias

reguladoras de crescimento. Entre os componentes adicionais estão incluídos os aminoácidos e as amidas, os ácidos orgânicos e as substâncias naturais complexas (GEORGE, 1996; GEORGE; SHERRINGTON, 1984; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GUERRA, 1988; GUERRA; NODARI, 2008; MURASHIGE, 1974; MURASHIGE; SKOOG, 1962).

3 MATERIAL E MÉTODOS

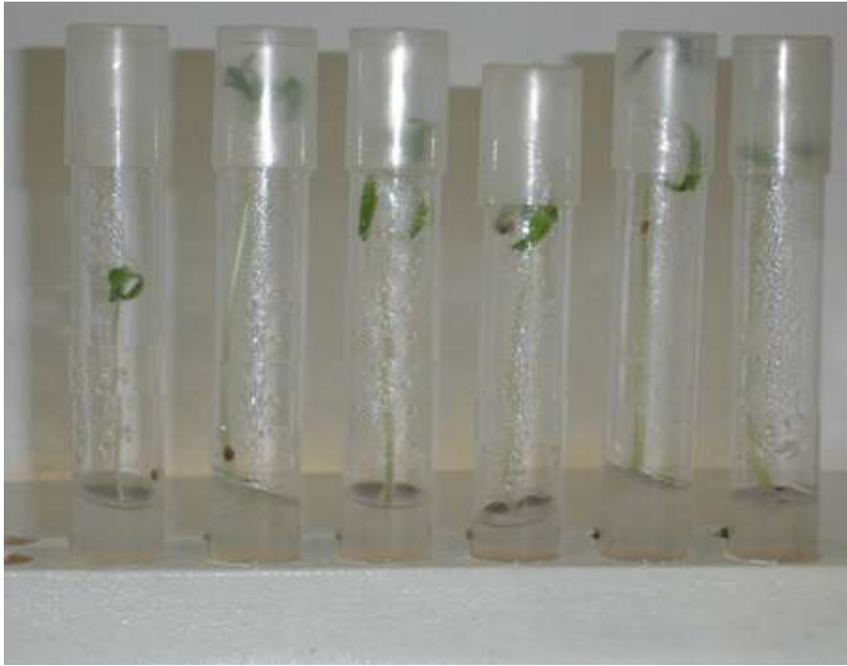
3.1 OBTENÇÕES DOS EXPLANTES

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, localizado na cidade de Alegre, Estado do Espírito Santo.

Foram utilizadas sementes certificadas de tomateiro (*Solanum lycopersicon L.*), híbrido 'Alambra' adquiridas na França pela empresa PLANTEC, do município de Venda Nova do Imigrante - ES.

As sementes foram inicialmente desinfestadas em câmara de fluxo laminar horizontal, com álcool etílico 70% (v/v), durante um minuto, e em seguida com hipoclorito de sódio a 1% (v/v) durante 20 minutos. Após a desinfestação as sementes foram lavadas três vezes com água destilada e esterilizada.

Para obtenção das plântulas matrizes doadoras dos explantes, utilizaram-se 25 tubos de ensaio contendo 15 ml de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), incorporando-se ao meio 30 g L⁻¹ de sacarose, como fonte de carbono, e 8 g L⁻¹ de ágar-ágar, como agente solidificante, conforme fotografia 1 e 2. Uma semente foi inoculada em cada um dos tubos de ensaio, que a seguir foram tampados e lacrados com filme PVC e transferidos para a sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas (16 horas luz/8 horas de escuro) e intensidade luminosa de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fótons fotossintéticos fornecidos por lâmpadas do tipo luz-do-dia, marca OSRAM e temperatura controlada de $27 \pm 2^\circ \text{C}$, onde permaneceram por 21 dias.



FOTOGRAFIA 1 e 2 - EXPLANTES DE HIPOCÓTILO *IN VITRO* DE TOMATE HÍBRIDO 'ALAMBRA'

Fonte: Torres (Experimentos desenvolvidos 2007/2008).¹

¹ TORRES, Francisco José Brandão. Experimentos realizados para o desenvolvimento da Tese de MS no Centro de Ciências Agrárias do ES- Pós Graduação em Produção Vegetal, Alegre, 2007/08.

Findo esse tempo, as plântulas foram retiradas dos tubos de ensaio, em câmara de fluxo laminar horizontal, para obtenção dos explantes, que foram excisados das plântulas matrizes, constituídos de segmentos apicais, segmentos nodais, folhas cotiledonares inteiras e hipocótilos. Em seguida, foi feita a limpeza dos explantes, retirando-se o excesso de material vegetal.

Cada tratamento foi inoculado no meio de estabelecimento num total de quatro tipos de explantes, com 8 repetições por tratamento, totalizando 32 frascos de vidro.

Após a inoculação dos explantes, os frascos foram fechados com tampa e lacrados com filme de PVC e o material experimental foi transferido e mantido em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas (16 horas luz/8 horas de escuro) e intensidade luminosa de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fótons fotossintéticos fornecida por lâmpadas tipo luz-do-dia, marca OSRAM e temperatura controlada de $27 \pm 2^\circ \text{C}$, onde permaneceram por 21 dias.

Transcorrido o tempo de estabelecimento da cultura, as plântulas foram subcultivadas duas vezes e recultivadas uma vez nas mesmas condições de luminosidade, fotoperíodo e temperatura, em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado, em cada recultivo, com 1 mg L^{-1} de cinetina, cuja concentração desse regulador de crescimento foi determinada por intermédio de estudos preliminares.

3.2 INDUÇÃO, MULTIPLICAÇÃO E ALONGAMENTO DE RAMOS

Após o recultivo, as plântulas foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) adicionando-se ao meio 1 mg L^{-1} de cinetina para alongamento de ramos. De acordo com Fari, Resende e Mello (2000), as plântulas estão maduras fisiologicamente para induzir organogênese somática direta somente após três subcultivos. Nessas condições as plântulas foram mantidas em sala de crescimento por mais trinta dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e oito repetições por tratamento, num total de 32 frascos.

As características utilizadas para análise foram: comprimento de caule, número de ramos, número de folhas e tamanho de calo. O comprimento do caule e o tamanho do calo foram determinados sobrepondo uma placa de Petri, contendo os tecidos sobre uma escala milimétrica.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

3.3 INDUÇÃO DA RIZOGÊNESE

Após alongamento dos ramos, segmentos apicais e segmentos nodais, foram utilizados para a indução de rizogênese, posto que as folhas cotiledonares inteiras e hipocótilos, após o recultivo, não foram reativas para induzir organogênese somática. Alguns tipos de explantes perdem a competência com subcultivos e recultivos sucessivos.

Em câmara de fluxo laminar horizontal e em frascos de vidro de 6 cm de diâmetro por 6 cm de altura, contendo 30 ml do meio de cultura MS (MURASIGHE; SKOOG, 1962), segmentos apicais e segmentos nodais foram inoculados. Foi acrescentado ao meio 1 mg L^{-1} de cinetina e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA (ácido naftaleno acético). Em seguida os explantes foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de fótons fotossintéticos, através de lâmpada tipo luz-do-dia, marca OSRAM, e a temperatura controlada em $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, onde foram mantidas por trinta dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos e oito repetições, e dois frascos por repetição num total de 32 frascos.

O modelo estatístico utilizado foi $Y_{ij} = \mu + G_i + E_{ij}$

Após trinta dias de cultivo, as plântulas foram colhidas para avaliação do comprimento do caule, número de ramos, número de folhas, tamanho dos calos, comprimento e matéria fresca das raízes.

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste F ao nível de 1% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o resumo da análise de variância, não há diferença significativa quando se usou segmentos apicais, segmentos nodais e folhas cotiledonares inteiras para indução de calogênese (Tabela 1), embora o tratamento em que foram usados segmentos nodais mostre-se mais eficiente em relação ao segmento apical (Figura 1).

Os calos são massas desorganizadas de células que posteriormente sofrem desdiferenciação e, quando cultivadas em meio nutritivo adequado, podem induzir a regeneração morfogênética indireta das plântulas. Um dos problemas da organogênese somática indireta é a variação somaclonal, onde algumas plantas podem apresentar variantes genéticas (LARKIN, 2000). Na propagação vegetativa, formação de calo geralmente não é desejável, posto que a constituição cromossômica desse material é instável, podendo originar variantes genéticos. Por outro lado a formação de calo na zona de enraizamento também é indesejável, pois pode afetar a qualidade das raízes, visto que essas raramente possuem conexões vasculares com ramos regenerados a partir do calo (GEOGE; SHERRINGTON, 1984). No presente estudo, não há diferenças significativas na indução de calos, quando se usou folhas cotiledonares e hipocótilos (Figura 1).

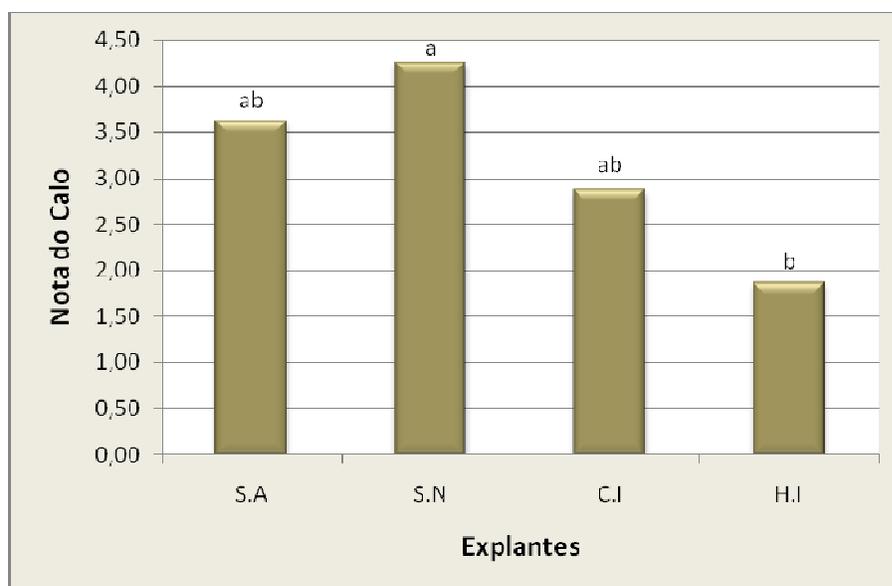
TABELA 1 - Resumo da análise de variância para o tamanho do calo em quatro tipos de explantes: segmentos apicais (S.A), segmentos nodais (S.N), folhas cotiledonares inteiras (C.I) e hipocótilos (H.I) de tomate híbrido 'Alambra'

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	3	25, 09	8, 36	3, 2*
Resíduo	28	71, 12	2, 54	
Total	31			
CV(%)		50, 4		

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Foi atribuído notas para o tamanho de calo. Sem calos nota = 0, calos 1.0 a 1,5 cm nota = 2, calos de 1,5 a 3.0 cm nota = 3 e calos acima de 3.0 cm nota = 5.

Os tratamentos utilizados apresentam-se reativos na indução da calogênese. Segundo Borges, Benbadis e Marco (2005), quando é feita a retirada dos explantes, no local excisado, onde houve ferimento do tecido, ocorre a formação de calos.

Entretanto, Kut, Bravo e Evans (1984) afirmam que a quantidade de calos não está diretamente relacionada com o potencial morfogênético para regenerarem brotos. Relato esse confirmado neste trabalho, visto que os explantes que promoveram maiores tamanhos de calos (segmento nodal) não são responsivos para promoverem a rizogênese somática (Figuras, 8 e 9).



*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Sem calos nota = 0, calos 1.0 a 1,5 cm nota = 2, calos de 1,5 a 3.0 cm nota = 3 e calos acima de 3.0 cm nota = 5

FIGURA 1 - Frequência média de formação de calo *in vitro* em quatro tipos de explante: segmentos apicais (S.A), segmentos nodais (S.N), folhas cotiledonares inteiras (C.I) e hipocótilos (H.I) de tomate híbrido 'Alambra'.

A análise de variância indicou que há diferenças significativas entre os explantes utilizados para a regeneração morfogênética das plantas de tomate 'Alambra' (Tabela 2). O melhor tratamento obtido é o que foi utilizado o segmento apical como explante. Os segmentos nodais são o segundo explante mais eficiente na regeneração morfogênética das plântulas. Os piores tratamentos são aqueles onde se utilizou folhas cotiledonares inteiras e hipocótilos como explantes.

Trabalhos realizados por Borges, Benbadis e Marco (2005) encontraram diferentes resultados quando utilizaram tipos diferentes de explantes nas variedades de tomate Diva, Thomas e Carmem na presença de 2,2 mg L⁻¹ de TDZ. Os autores obtiveram 61% de brotos regenerados para a variedade Thomas, quando o hipocótilo foi

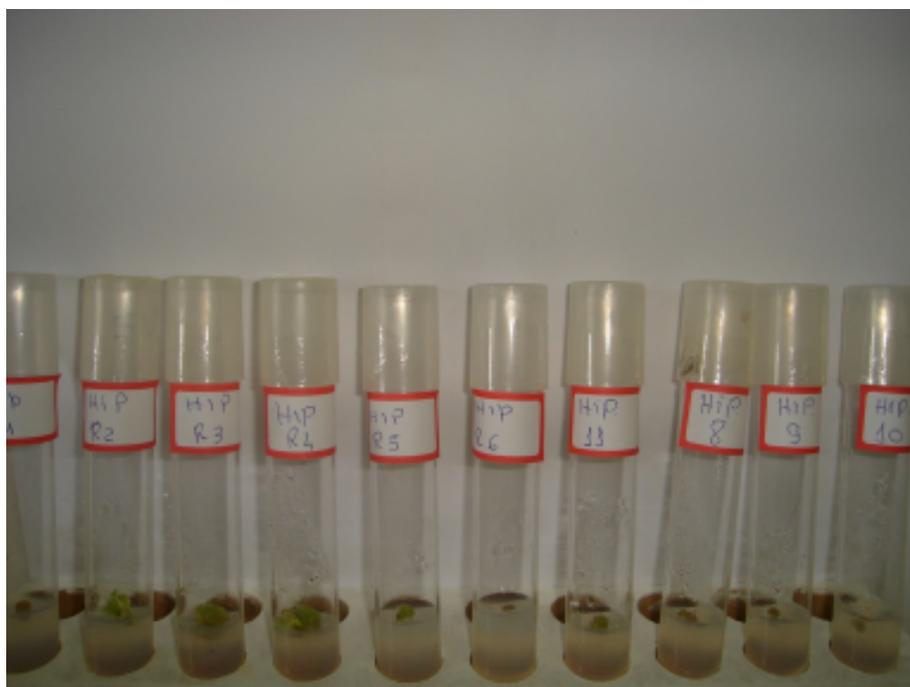
utilizado como explante, enquanto que para as variedades Diva e Carmem não foi verificado respostas morfogênicas para esse tratamento. De acordo com Peres (2002), a determinação e a competência dos explantes variam com a idade, nutrição da planta matriz e com o tipo de explante. Segundo Borges, Benbadis e Marco (2005), no local excisado na retirada dos explantes, ocorrem ferimentos, onde aumenta a capacidade dos mesmos em induzir calogênese. Todavia, ao utilizarem hipocótilo e folhas como explante, eles verificaram 100% de formação de calos.

No presente trabalho, todos os tipos de explantes utilizados foram reativos na promoção da calogênese. Contudo, para indução de alongamento de caule, os resultados obtidos neste trabalho diferem daqueles alcançados por Borges, Benbadis e Marco (2005), visto que explantes cotiledonares e hipocotiledonares não são reativos para induzir regeneração morfogênica (Figura 2). Portanto, verifica-se que esses explantes possivelmente tenham determinação para calogênese (Figura 1), visto que não apresentam competência para organogênese somática (produção de brotos), entretanto segmentos apicais, seguidos dos nodais são os que mais se alongaram. Pratta, Zorgoli e Picardi (1997) verificaram diferenças significativas na frequência de regeneração e no número de brotações por explante entre espécies e entre genótipos de uma mesma espécie. De acordo com Koornneef e outros (1993), o componente genético associado com a regeneração determinam a manutenção da competência morfogênica dos tecidos de acordo com os reguladores de crescimento do meio de cultura.

Assim sendo, a competência morfogênica da planta pode variar de acordo com o balanço hormonal, tipo de explante, concentração do meio de cultivo, diferentes espécies e com as diferentes variedades da mesma espécie. Possivelmente, algum desses fatores podem ter influenciado na competência morfogênica das folhas cotiledonares inteiras e hipocotiledonares, quando esses materiais foram utilizados como explantes, visto que os mesmos não foram reativos para induzir organogênese somática.

Fari, Resende e Mello (2000), Costa e outros (2000) obtiveram elevada frequência de alongamento de brotos e gemas vegetativas, quando usaram explantes da cultivar de tomate IPA - 5 e IPA - 6 após o terceiro subcultivo. Os autores obtiveram também menos brotos alongados com a variedade IPA -5 utilizando como explantes folhas cotiledonares fendidas.

No meio de alongamento do caule, pode-se verificar, na Figura 2, que o melhor tratamento obtido é o que se usou segmentos apicais, seguidos do segundo tratamento (segmentos nodais). Explantes oriundos de folhas cotiledonares e de hipocótilos não promovem regeneração das plantas, tornando-se ineficientes para crescimento do caule da variedade 'Alambra' de acordo com a fotografia 3 e 4. Verifica-se que esses tipos de explantes possivelmente tenham determinação para calogênese (Figura 3), visto que não apresentam competência para organogênese somática (produção de brotos).



FOTOGRAFIA 3 - EXPLANTES DE HIPOCÓTILO *IN VITRO* DE TOMATE HÍBRIDO 'ALAMBRA'

Fonte: Torres (Experimentos desenvolvidos 2007/2008).



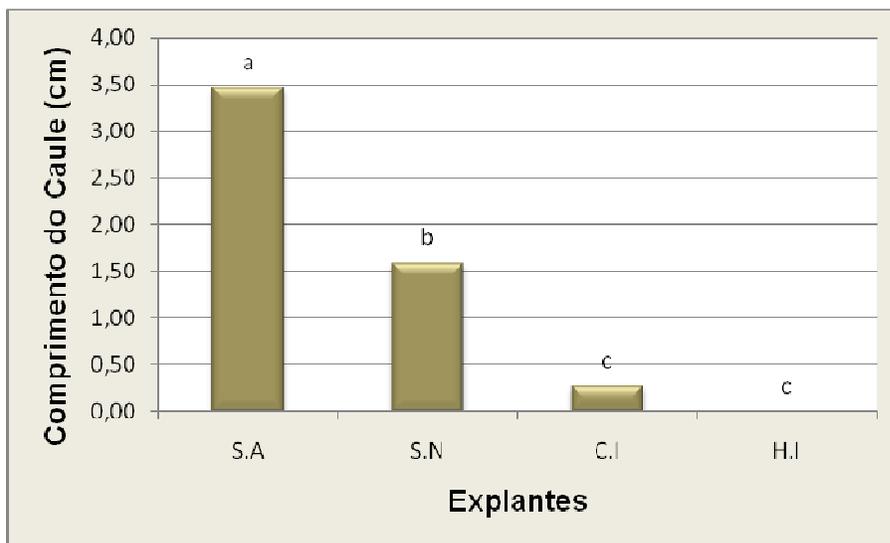
FOTOGRAFIA 10 - EXPLANTES DE FOLHAS COTILEDONARES INTEIRAS IN VITRO DE TOMATE HÍBRIDO 'ALAMBRA'

Fonte: Torres (Experimentos desenvolvidos 2007/2008).

TABELA 2 - Resumo da análise de variância para o comprimento do caule em quatro tipos de explantes: segmentos apicais (S.A), segmentos nodais (S.N), folhas cotiledonares inteiras (C.I) e hipocótilos (H.I) de tomate híbrido 'Alambra'

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	3	59,96	19,98	38,2**
Resíduo	28	14,62	0,52	
Total	31			
CV(%)	54,2			

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de F.



**Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente a 1% de probabilidade pelo teste Tukey.

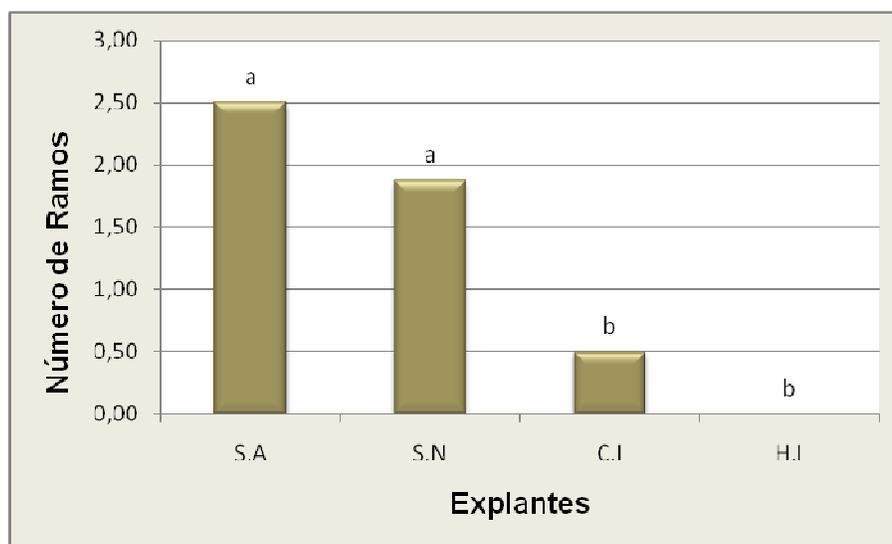
FIGURA 2- Média de comprimento de caule em quatro tipos de explantes: segmentos apicais (S.A), segmentos nodais (S.N), folhas cotiledonares inteiras (C.I) e hipocótilos (H.I) de tomate híbrido 'Alambra'

A análise de variância do número de ramos formados e diferentes tipos de explante para regeneração do tomate 'Alambra' encontra-se na Tabela 3. Observa-se que não houve diferença significativa entre os explantes segmento apical e segmento nodal para a regeneração de ramos, embora as plântulas originadas de segmento apical obtivessem um melhor comportamento para a variável em análise (Figura 3). Na avaliação feita para o número de ramos formados nota-se que não houve diferença significativa entre os dois primeiros tratamentos, embora se observe maior eficiência dos segmentos apicais em relação aos segmentos nodais.

Quando se usou como explantes hipocótilo e folhas cotiledonares não houve produção de ramos (Figura 3). Possivelmente esses explantes perderam a competência regenerativa durante o período de estabelecimento dos mesmos.

Tratamento	3	32, 59	8, 36	3, 2**
Resíduo	28	20, 87	2, 54	
Total	31			
CV(%)		70, 8		

**significativo ao nível de 1% de possibilidade pelo teste de F



**Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente a 1% de probabilidade pelo teste Tukey.

FIGURA 3 - Média de regeneração *in vitro* de números de ramos em quatro tipos de explante: segmentos apicais (S.A), segmentos nodais (S.N), folhas cotiledonares inteiras (C.I) e hipocótilos (H.I) de tomate híbrido 'Alambra'.

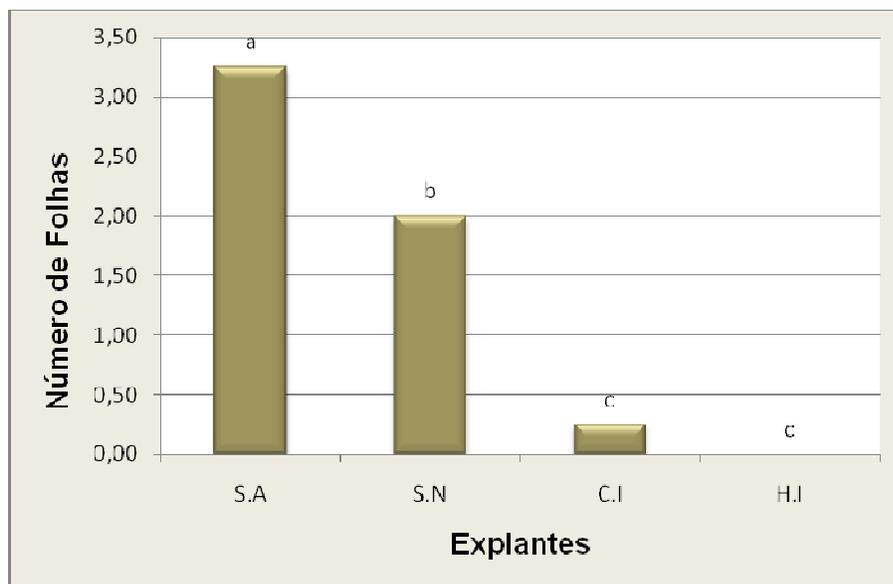
Pelo resumo da análise de variância, para número de folhas crescidas em 4 tipos de explantes (segmento apical, segmento nodal, folhas cotiledonares inteiras e hipocótilo), para a regeneração do tomate 'Alambra', pode-se observar que há diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 4). A Figura 4 ilustra que há superioridade do explante segmento apical em relação aos demais tratamentos. Quando se utilizou folhas cotiledonares e hipocótilos como explantes, verifica-se inicialmente a formação de calos, sem, no entanto, haver regeneração de ramos e folhas. Esses dois tratamentos não foram reativos para a variedade 'Alambra', mostrando-se inferiores aos dois primeiros tratamentos. A formação de calo na zona de enraizamento é indesejável, pois pode afetar a qualidade das raízes,

principalmente no que se refere à conexão vascular com a planta (FACHINELLO et al., 1995). Em mamoeiro, Medhi e Hogan (1976), utilizando AIB em concentrações variando de 5 a 30 mg L⁻¹, obtiveram bom enraizamento, mas essas raízes eram de geotropismo negativo, surgidas pela rediferenciação de células do calo. Esse enraizamento não é interessante para trabalhos visando propagação de plantas, pois essas raízes raramente possuem conexões vasculares com ramos regenerados a partir de calo (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

TABELA 4 - Resumo da análise de variância para o número de folhas em quatro tipos de explantes: segmentos apicais (S.A), segmentos nodais (S.N), folhas cotiledonares inteiras (C.I) e hipocótilos (H.I) de tomate híbrido 'Alambra'

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	3	56, 50	18, 83	40,5**
Resíduo	28	13, 00	0, 46	
Total	31			
CV (%)		49, 5		

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de F.



Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Figura 4 - Freqüência média de regeneração *in vitro* de folhas em quatro tipos de explantes: segmentos apicais (S.A), segmentos nodais (S.N), folhas cotiledonares inteiras (C.) e hipocótilos (H.I) de tomate híbrido 'Alambra'.

A tabela 5 refere-se à análise de variância das médias do comprimento do caule e dois tipos de explantes estabelecido em meio Ms (MURASHIGE ; SKOOG, 1962) acrescido de de 1 mg L⁻¹ de cinetina e de 0,1 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftaleno acético) para desenvolvimento de caule e raízes, isto é, organogênese e rizogênese somática do tomate 'Alambra' F1. Neste estudo só foi possível trabalhar com apenas dois tipos de explantes, que foram os únicos reativos, visto que as folhas cotiledonares e hipocótilos durante o trabalho da fase de estabelecimento e dos recultivos, possivelmente perderam a competência para indução de organogênese e rizogênese. Nota-se que há diferenças significativas entre os tratamentos segmentos apicais e segmentos nodais mostrando a supremacia do primeiro tratamento em relação ao segundo. Observa-se, ainda, que há maior desenvolvimento do caule, quando são utilizados explantes do segmento apical, enquanto que aqueles provenientes de segmentos nodais apresentam menor desenvolvimento (Figura 5). De acordo com Fahn (1967), esses explantes apresentam maior competência organogenética por serem formados de células perenes embrionárias e indiferenciadas.

TABELA 5 - Resumo da análise de variância para comprimento do caule em dois tipos de explantes: segmentos apicais (S.A) e segmentos nodais (S.N)

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	136, 89	136, 89	13, 5**
Resíduo	14	141, 14	10,81	
Total	15			
CV(%)		60, 6		

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

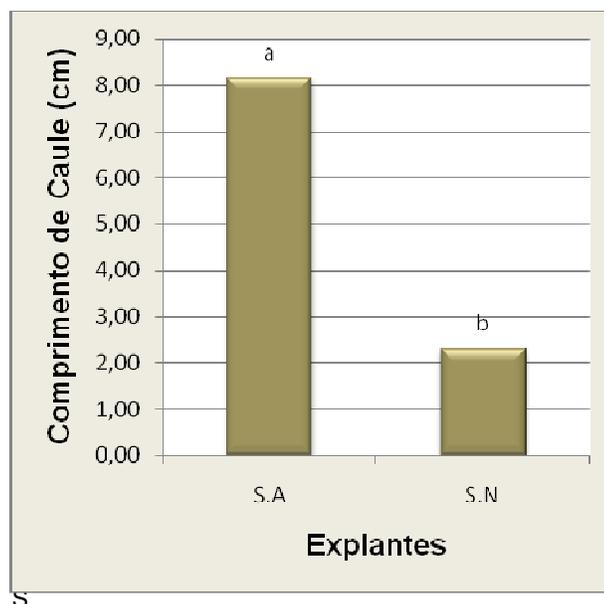


FIGURA 5 - Frequência média do comprimento do caule em dois tipos de explantes: segmentos apicais (S.A) e segmentos nodais (S.N).

A análise de variância para o número de ramos em dois tipos de explantes (segmentos apicais e nodais) mostra que há diferença significativa entre os dois tratamentos (Tabela 6). Plântulas oriundas de segmentos apicais têm desenvolvimento superior àquelas originadas de segmentos nodais, ocorrendo maior frequência média do número de ramos no primeiro tratamento (Figura 6).

TABELA 6 - Resumo da análise de variância para número de ramos em dois tipos de explantes: segmentos apicais (S.A) e segmentos nodais (S.N)

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	10, 56	10, 56	6, 4**
Resíduo	14	22, 87	1, 63	
Total	15			
CV(%)		27, 26		

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

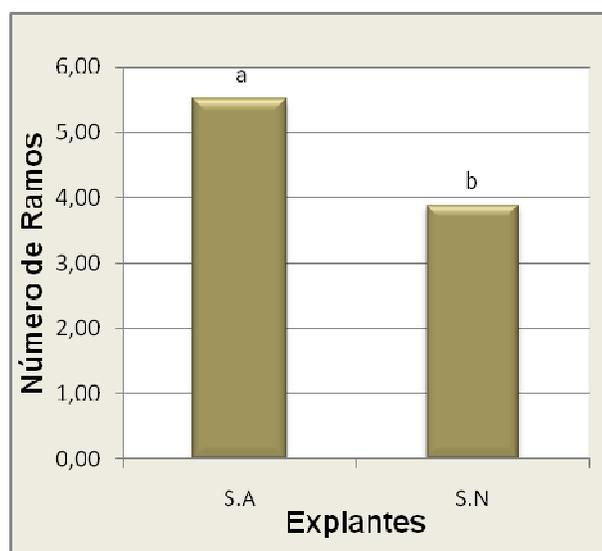


FIGURA 6 - Frequência média do número de ramos em dois tipos de explantes: segmentos apicais (S.A) e segmentos nodais (S.N).

Há diferenças significativas para o número de folhas crescidas em dois tipos de explantes (segmentos apicais e nodais) (Tabela 7). Pode-se constatar que plântulas originadas de segmentos apicais dão origem a um maior número de folhas do que aquelas oriundas de segmentos nodais (Figura 7).

TABELA 7 - Resumo da análise de variância para número de folhas em dois tipos de explantes: segmentos apicais (S.A) e segmentos nodais (S.N)

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	42, 50	42, 50	7, 8*
Resíduo	14	75, 00		
Total	15			
CV(%)		37, 9		

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

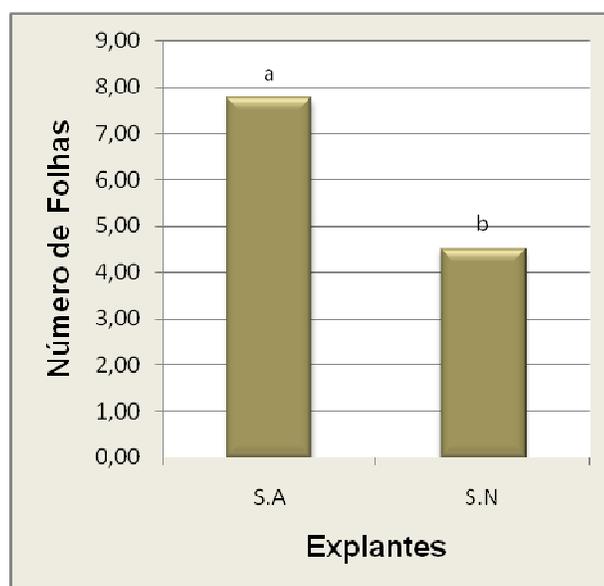


FIGURA 7 - Frequência média do número de folhas em dois tipos de explantes: segmentos apicais (S.A) e segmentos nodais (S.N).

A análise de variância revela diferenças significativas para o comprimento de raízes surgidas em dois tipos de explantes (segmentos apicais e nodais) (Tabela 8). Pode-se notar que as plântulas oriundas de segmentos nodais não apresentam raízes, enquanto aquelas provenientes de segmentos apicais produzem sistema radicular bem desenvolvido, conforme fotografia 5 e 6. Essas raízes apresentam-se bastante volumosas, ramificadas e compridas, conforme observa-se na Figura 5.



FOTOGRAFIA 5 - MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE TOMATE HÍBRIDO 'ALAMBRA'.

Fonte: Torres (Experimentos desenvolvidos 2007/2008).



FOTOGRAFIA 6 - MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE TOMATE HÍBRIDO 'ALAMBRA' COM RAÍZES VOLUMOSAS E COMPRIDAS.

Fonte: Torres (Experimentos desenvolvidos 2007/2008).

TABELA 8 - Resumo da análise de variância para comprimento de raízes em dois tipos de explantes: segmentos apicais (S.A) e segmentos nodais (S.N)

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	892, 51	892, 5	24, 1*
Resíduo	14	518, 21		
Total	15			
CV(%)		81, 4		

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

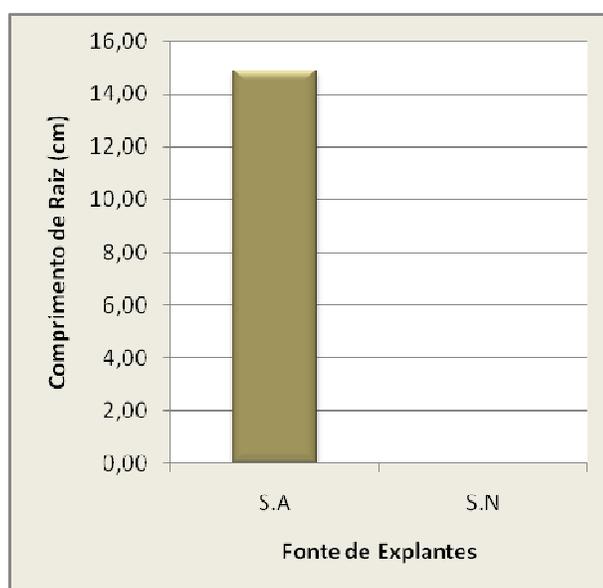


FIGURA 8 - Média do comprimento das raízes em dois tipos de explantes: segmentos apicais (S.A) e segmentos nodais (S.N).

A Tabela 9 ilustra a análise de variância para massa fresca das raízes em dois tipos de explantes (segmentos apicais e nodais), indicando significância entre os tratamentos. Com relação ao peso do sistema radicular, verifica-se que as plantas originadas de segmentos apicais dão origem a raízes volumosas, ramificadas e compridas, enquanto que aquelas oriundas de segmentos nodais não emitem raízes (Figura 9). Pode-se destacar que o tamanho, o volume e a ramificação das raízes também são traduzidos em aumento de massa da matéria fresca das mesmas.

De acordo com Borges, Benbadis e Marco (2005), explantes provenientes de folhas e raízes não apresentaram competência para regeneração das variedades de

tomate, Diva, Carmem e Thomas. Provavelmente tenha ocorrido falha na competência no genótipo desses explantes.

Peres (2002) relata que explantes que falham em formar um determinado órgão *in vitro* por estarem “determinados” podem ter perdido a capacidade de expressão de “genes” mestre durante o processo de diferenciação ocorrido anteriormente. Segundo Van e outros (1993), os tecidos vegetais apresentam diferentes potenciais de competência organogênica. O autor afirma que quanto maior a “determinação” de um explante para uma via de desenvolvimento (formação do caule), menor será a sua competência para formar outro órgão (formação da raiz). Assim pode-se sugerir que os explantes oriundos de segmentos nodais possuem determinação para formação de ramos, mas que perdem a competência para regenerar o sistema radicular (Figuras 8 e Anexo D).

TABELA 9 - Resumo da análise de variância para peso de matéria fresca das raízes em dois tipos de explantes: segmentos apicais (S.A) e segmentos nodais (S.N)

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	2, 59	2, 59	14, 7**
Resíduo	14	2, 46		
Total	15			
CV(%)		104, 1		

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

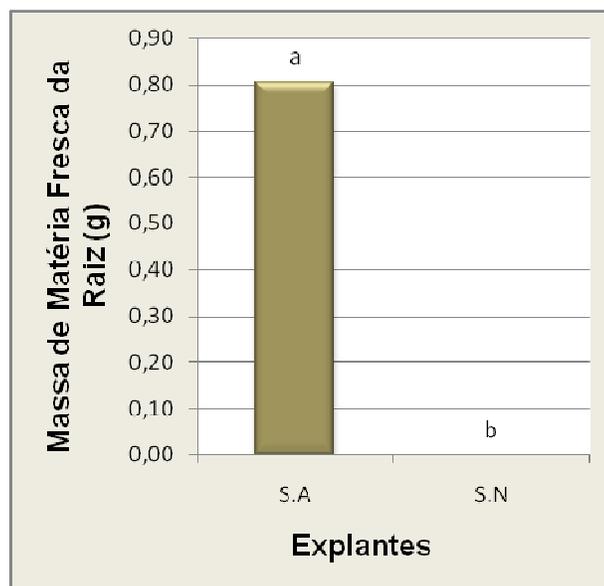


FIGURA 9 - Média da matéria fresca das raízes em dois tipos de explantes: segmentos apicais (S.A) e segmentos nodais (S.N).

5 CONCLUSÕES

Há regeneração morfogênética direta das plântulas (cauligênese e rizogênese) quando se usa segmentos apicais

Quando se utiliza segmentos nodais, há somente cauligênese somática direta, esses explantes não proporcionam rizogênese das plântulas.

As melhores respostas para a regeneração morfogênética das plântulas de tomateiro 'Alambra' são obtidas de segmentos apicais.

Folhas cotiledonares e hipocótilos não promovem organogênese somática quando utilizados como explantes.

Explantes de folhas cotiledonares e de hipocótilos não promovem organogênese somática, embora apresentem suficiência na formação de calos.

6 REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. **Anuário estatístico da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consutoria e comércio, 2004.

_____. **Anuário estatístico da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consutoria e Comércio 2007.

ALMEIDA, E. P. OLIVEIRA; R. P, LOYOLA, J. L. Indução e desenvolvimento de calos e embriões somáticos em mamoeiro. **Ciência Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n.1, Jan./mar. 2001.

AMMIRATO, P. V. et al.; **Handbook of plant cell. culture**. New York: MacMillan, 1993. v.3.

AUNG, L. H.; BRYAN, H. H.; BYRNE, J. M. Charges in rooting substances of tomato explants. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Virginia, v.100, n. 1, p. 19-22, jan. 1975.

BORGES, N. S. S.; BENBADIS, A.; MARCO, C. A. Respostas morfogênicas de tomateiros cultivado *in vitro*. **Revista Ciência Agrônômica**, vol. 36, n.1, jan / abr. p. 91-97, 2005.

CARRY, A. et al . Arabidopsis mutants with increased organ regeneration in tissue cultures are more competent to respond to hormonal signals. **Planta**, Germany, v. 213, n. 5, p. 700-707, set. 2001.

COSTA, M. G.; NOGUEIRA, F. T. S.; OTONI, W. C.; BROMMONSCHENKEL, S. H. Regeneração *in vitro* de cultivares de tomateiro (*Lycopersicon sculentum* Mill.) industrial IPA-5 e IPA-6. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n.3, p 671-678, jun./set. 2001.

DEBERGH P.C.; READ, P.E. Micropropagation technology and applications. **Kluwer Acad Publ The Netherlands** v.2,1991.

DELLA VECCHIA, P. T.; KOCH, P. S. Tomate longa vida: o que são, como foram desenvolvidos? **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 1, p. 3-4, 2000

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. Londrina: Planta, 2006.

EVANS et al. **Handbook of plant cell cultura**. New York: MacMilan Publisher Company, v.3, 1984.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. L. de. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 1995.

FAHN, A. **Plant anatomy**. New York: Pergamon, 1967.

FARI, M.; RESENDE, G. R. de.; MELLO, N. F. Avaliação da capacidade de regeneração *in vitro* em tomateiro industrial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, ago. 2000.

FERREIRA, S. M. R. **Características de qualidade do tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivado nos sistemas convencional e orgânico comercializado na região metropolitana de Curitiba**. 2004. 249 f. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)- Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Paraná. 2004.

FILGUEIRA, F. A. R. **Manual de olericultura: cultura e comercialização de hortaliças: olericultura geral, olericultura especial**. 2 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981. v.1. 338 p.

FONTES, P. C. R.; SILVA, D. J. H. Produção de tomate de mesa. **Aprenda Fácil**, Viçosa, 2002.

FOSKET, D. E. **Plant growth and development: a molecular approach**. New York: Academic Press, 1994.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley: Exegetics, 1984.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture, the technology**. Reino Unido: Edington, 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, v. 1, p. 183-260.1998.

GUALBERTO, R.; BRAZ, L. T.; BANZATO, D. A. Produtividade, adaptabilidade e estabilidade fenotípica de cultivares de tomateiro sob diferentes condições de ambiente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Embrapa, v. 37, n.1, p. 81- 88, 2002.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Material didático de apoio à disciplina de biotecnologia**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Disponível em: <file:///C:/Documents%20and%20Settings/Particular/Desktop/Tese%20-%20mg/Apostila%20de%20Biotecnologia.htm>. Acesso em: 28 jun. 2008.

INOUE, T. et al. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. **Nature**, n.409, p.1060-1063, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de orçamento familiar, consumo domiciliar, alimentar per capita**. Rio de Janeiro: IBGE, v.2, p. 27. 1998.

_____. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, dez. 2004. Disponível em: < http: // www.sidra/. Ibge.gov.br / /bdal / >. Acesso em: 03 fev. 2007.

KOORNNEEF, F. M. et al. Breeding of tomato genotype readily accessible to genet manipulation. **Plant Science**, Limerick, v.45, n.2, p. 201-208, 1986.

- KUT, S. A.; BRAVO, J. E.; EVANS, D. A. Tomato. In: AMMIRATO, P. et al. **Handbook of cell culture**. New York: MacMillan, v. 3, p. 247- 289. 1984.
- LARKINS, B. A.; VASIL, I. K. Cellular and molecular biology of plant seed development. In: KAMÍNER, M. **Biologia Plantarum**, v.43, n. 2, p. 238, ago. 2000.
- LIRDHIST, P. C. Introducing the cell concept by both animal and plant cells: a historical and didactic approach. **Science & Education**, v.35, n.5, p. 423-440, mar. 2006.
- MEDHI, A. A.; HOGAN, L. Tissue culture of *Carica papaya*. **HortScience**, Virginia, v.11, n. 3, p. 311, 1976.
- MURASHIGE, J. R.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of plant Physiology**, v. 25, p. 135-166, 1974.
- MINAMI, R.; HAAG, H. P. **O tomateiro**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1989.
- MULTIPLICAÇÃO de Tomates. **Portal do Agronegocio**, 29 set. 2007. Disponível em <<http://portaldoaagronegocio.com.br>> .Acesso em 10 abr.2008.
- PERALTA, I.; SPOONER D.M. GBSSI gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). **Amer. J. Bot.** v.88, p.1888-1902, 2001.
- PERALTA, I.; KNAPP, S.; SPOONER, D.M. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from northern Peru, **Syst. Bot.** v.30, p.424-434, 2005.
- PRATTA, G.; ZORGOLI, R. PICARDI, L. A. Intra and interspecific variability of *in vitro* culture response in *Lycopersicon* (tomatoes). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, p. 75-78, 1997.
- PERES L. E. P. et al. Regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of different tomato cultivars and wild related species. **Plant Cell Tissue And Culture**. v.65, p.37-44, 2001.
- PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia e Desenvolvimento**, Brasília, n. 25, p. 44-48, mar./abr. 2002.
- SANTIAGO, E. J. A. et al. **Aclimação**: cultura de tecidos. Lavras: UFLA, 2001.
- _____. **Meios de cultura**: cultura de tecidos. Lavras: UFLA, 2001.
- _____. **Multiplicação**: cultura de tecidos. Lavras: UFLA, 2001.
- SCHMILDT, E.R. **Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de ramos de mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 1994. 76p. Dissertação. (Mestrado em Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 1994.

SCHMILDT, O. **Multiplicação *in vitro* de mamoeiro 'Tainung' 01**. 2006. 46p. Dissertação, (Mestrado em Produção Vegetal) - Programa de pós graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo. Alegre, 2006.

SMITH, L. G.; JACKSON, D.; HAKE, S. Expression of knotted1 marks shoot meristem formation during maize embryogenesis. **Developmental Genetics**, n.16, p. 344-348, 1995.

TAIZ, L.; ZEIZER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAVARES, C. A. M. Ataque dos vírus. **Cultivar: Frutas e Hortaliças**, Pelotas, ano IV, n. 20, p. 26-28, 2003.

THROP, T. A. Organogenesis *in vitro*: Structural, physiological, and biochemical aspects, In: **Perspectives in plant cell and tissue culture**. Vasil, I. K. (Ed.). New York: Academic Press, p. 71-111. 1989.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S.L.; POZZER. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, v. 1, p. 133-145. 1998.

VAN ROEKEL, J.S.C. et al Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Cell Reports**, Berlin, v.12, p.644-647, 1993.

WHITE, P. R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips a liquid medium. **Plant Physiology**, n. 9, p. 585-600, 1934.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenic group. **Ann. Bot.**, n.57, p. 443-462, 1986.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)