

MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DO TOMATEIRO
HÍBRIDO “ALAMBRA”

FRANCISCO JOSÉ BRANDÃO TORRES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MAIO – 2013

MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DO TOMATEIRO
HÍBRIDO “ALAMBRA”

FRANCISCO JOSÉ BRANDÃO TORRES

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal”.

Orientador: Prof. Almy Junior Cordeiro de Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MAIO – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 074/2013

Torres, Francisco José Brandão

Micropropagação e aclimatização do tomateiro híbrido “Alambra” / Francisco José Brandão Torres. – 2013.
60 f. : il.

Orientador: Almy Junior Cordeiro de Carvalho
Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.
Bibliografia: f. 52 – 60.

1. Micropropagação 2. Organogênese 3. Explantes 4. Segmentos Apicais 5. Planta Matriz 6. Tomate I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 635.642

MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DO TOMATEIRO
HÍBRIDO “ALAMBRA”

FRANCISCO JOSÉ BRANDÃO TORRES

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal”.

Aprovada em 03 de Maio de 2013

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ruimário Inácio Coelho (D.Sc., Produção Vegetal) - UFES

Profª Drª Jalille Amim Altoé Freitas (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF

Profª Drª Claudia Lopes Prins (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF

Prof. Dr. Almy Junior Cordeiro de Carvalho (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF
Orientador

Aos meus pais, José de Oliveira Torres (*in memorian*) e Iza Brandão Torres, pelo carinho, amor, dedicação e exemplo de vida. Aos meus tios Adilson de Oliveira Torres e Vera Santana Torres, pela consideração, apoio nas horas precisas;

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

Dedico

AGRADECIMENTO

A Deus, pela minha existência;

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

À Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade concedida para cursar o Doutorado;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Almy Junior Cordeiro de Carvalho, pela orientação das pesquisas, pelo apoio, conhecimentos transmitidos, sugestões e amizade;

Ao Prof. Dr. Almy Junior Cordeiro de Carvalho e Prof. Dr. Antônio Teixeira do Amaral Júnior, pela amizade e nossa inclusão no programa Dinter/Capes–UENF-IFES Alegre, ES;

Ao meu coorientador, amigo, Prof. Dr. Ruimário Inácio Coelho, pelo incentivo, amizade, sugestões e contribuições apresentadas para esta tese; As Dr^a Jalille Amim Altoé e Claudia Lopes Prins pelas sugestões apresentadas;

Aos professores da UENF pela amizade, compreensão e apoio;

Aos colegas do Doutorado em Produção Vegetal do DINTER IFES/UENF;

À professora Fúlvia Maria pela amizade, sugestões e contribuições apresentadas nesse trabalho;

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

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. A cultura do tomateiro.....	4
2.2. Propagação do tomateiro.....	6
3. TRABALHO Nº 1	14
PRODUÇÃO DE PLANTA MATRIZ <i>IN VITRO</i> DO TOMATEIRO “ALAMBRA”	14
RESUMO	14
ABSTRACT	15
3.1.1INTRODUÇÃO	15
3.1.2 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1.3 RESULTADO E DISCUSSÃO	18
3.1.4 CONCLUSÕES	23
3.1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
4. TRABALHO Nº 2	25
MICROPROPAGAÇÃO DO TOMATEIRO ‘ALAMBRA’	25
RESUMO	25

ABSTRACT	25
3.2.1 INTRODUÇÃO	26
3.2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.2.3 RESULTADO E DISCUSSÃO	30
3.2.4 CONCLUSÕES	35
3.2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
5. TRABALHO Nº 3	38
ACLIMATIZAÇÃO DAS PLÂNTULAS DO TOMATEIRO “ALAMBRA”	38
RESUMO	38
ABSTRACT	39
3.3.1 INTRODUÇÃO	40
3.3.2 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.3.3 RESULTADO E DISCUSSÃO	44
3.3.4 CONCLUSÕES	47
3.3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
6. RESUMO E CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

RESUMO

TORRES, FRANCISCO JOSÉ BRANDÃO, D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Maio de 2013. Micropropagação e aclimatização do tomateiro híbrido “Alambra”. Orientador: Prof. Dr. Almy Junior Cordeiro de Carvalho. Coorientador: Prof. Dr. Ruimário Inácio Coelho.

Foram instalados três experimentos, na cidade de Alegre, estado do Espírito Santo, Brasil, com os objetivos de testar diferentes concentrações do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) para a produção de plantas matrizes do tomateiro, estabelecer as dosagens dos reguladores vegetais na sua micropropagação e na aclimatização das mudas micropropagadas do tomateiro híbrido “Alambra”. O primeiro trabalho teve como objetivo testar diferentes concentrações do meio MS na produção de plantas matrizes desenvolvidas *in vitro*, do tomateiro híbrido “Alambra”. Sementes do tomateiro Alambra, foram desinfestadas e inoculadas em frascos de vidro contendo 40 mL de meio MS nas concentrações de 0; 0,25; 0,5 (meia força); 0,75 e 1 (força total) do meio MS. Após inoculação, os frascos foram transferidos para sala de crescimento em delineamento inteiramente casualizado (DIC) composto de cinco concentrações de meio MS e cinco repetições, em um total de 25 unidades amostral, onde permaneceram por 21 dias. Transcorrido esse tempo, foram feitas as análises das características biométricas das plântulas através de regressão polinomial. Concluiu-se que o meio MS força total proporcionou maior desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular das plântulas. O segundo trabalho teve como objetivo testar o efeito de reguladores

vegetais na micropropagação do tomateiro “Alambra”, onde segmentos apicais do caule provenientes das plantas matrizes desenvolvidas *in vitro*, foram excisados e inoculados em 40 mL de meio MS força total, acrescido de 0; 10; 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de auxina. Depois de 21 dias de permanência na sala de crescimento, sob condições controladas foram avaliadas as características biométricas das plântulas por regressão polinomial. A dose de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina, associada a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético, proporcionou maior acúmulo de massa fresca de parte aérea e de raiz. Doses de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina promoveram formação de tecidos calosos nas plântulas, entretanto, não houve desenvolvimento do sistema radicular. No terceiro trabalho verificou-se o efeito de reguladores vegetais sobre a aclimatização das mudas micropropagadas. Segmentos apicais do caule das plantas matrizes foram inoculados em frasco de vidro contendo 40 mL de meio MS força total acrescido de: 0; 1; 10; 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de auxina. Após inoculação os frascos foram transferidos para sala de crescimento onde permaneceram por 21 dias sob condições controladas. Após esse período as plântulas foram transplantadas em vasos plásticos contendo 300 mL de substrato (Brasplant[®]), previamente autoclavado. Transcorrido esse tempo, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação e dispostas sobre bancada em delineamento inteiramente casualizado, com cinco doses de cinetina e cinco repetições. Concluiu-se que a dosagem de cinetina de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ promoveu maior desenvolvimento das características avaliadas.

Palavras-chave: Segmentos apicais, Plantas matriz, Organogênese somática.

ABSTRACT

TORRES, FRANCISCO JOSÉ BRANDÃO, D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. May, 2013. Micropropagation and acclimatization of tomato hybrid Alambra. Advisor: D.Sc. Almy Junior Cordeiro de Carvalho. Co-Advisor: D.Sc. Ruimário Inácio Coelho.

Three experiments were carried out in Alegre, city of Espírito Santo state, Brazil, with the objective of testing different concentrations of MS medium (Murashige and Skoog, 1962) for the tomato matrix plants production, to establish the dosages of plant regulators in the micropropagation and in the acclimatization of tomato hybrid "Alambra" plantlets. The first study aimed to test different concentrations of MS medium in the production of matrix plants of tomato hybrid "Alambra" grown *in vitro*. Seeds of Alambra tomato were disinfected and inoculated into glass container with 40 mL of MS medium in the concentrations of 0, 0.25, 0.5 (half strength), 0.75 and 1 (full power) of MS medium. After inoculation, the glass containers were transferred to a growth chamber in a completely randomized design (CRD) with five concentrations of MS medium and five replications, in a total of 25 sample units, where they remained for 21 days. After this time, the analyses of seedling's biometric characteristics were done by the polynomial regression. It was concluded that the MS medium, full strength, provided greater development of shoots and roots of seedlings. The second study aimed to test the effect of plant regulators on micropropagation of "Alambra" tomato, where the

apical segments of the stem from matrix plants grown in vitro were excised and inoculated in 40 mL of MS medium, full strength, with 0; 10, 100 and 1000 mg L⁻¹ kinetin and 100 mg L⁻¹ auxin. After 21 days in the growth chamber, under controlled conditions, were evaluated biometric characteristics of seedlings by polynomial regression. The dose of 100 mg L⁻¹ kinetin, mixed with 100 mg L⁻¹ naftalen acetic acid, showed higher accumulation of fresh weight of shoot and root. Doses of 1000 mg L⁻¹ kinetin promoted callous tissue formation in seedlings, however, there was no root system development. The third study aimed to verify the effect of plant regulators on the acclimatization of plantlets. Apical segments of stems of matrix plants were inoculated in glass container with 40 mL of MS medium, full strength, plus: 0, 1, 10, 100 and 1000 mg L⁻¹ kinetin and 100 mg L⁻¹ auxin. After inoculation, the flasks were transferred to a growth chamber where they remained for 21 days under controlled conditions. After this time, the seedlings were transplanted into pots with 300 mL of substrate (Basaplant®), previously autoclaved. Then, the seedlings were transferred to the greenhouse and placed on the bench in a completely randomized design with five doses of kinetin and five replications. It was concluded that the dosage of kinetin 1.0 mg L⁻¹ promoted further development of features evaluated.

Keywords: apical segments, matrix plants, somatic organogenesis.

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicon* L.) é a segunda hortaliça mais plantada no mundo, perdendo apenas para a batata inglesa (*Solanum tuberosum*) (Bathia et al., 2004) pertencente da família das Solanaceae. O maior produtor mundial é a China, participando com 27,8% da produção, com 1.454.583 ha (Síntese, 2011), sendo seguida pelos Estados Unidos da América, Turquia, Índia e Egito (Faostat, 2011).

O Brasil encontra-se em 9º lugar, respondendo por 1,2% da produção mundial, com área de 60.912 há e produtividade média de 63.760 kg ha⁻¹ (IBGE, 2011), sendo o terceiro país em produtividade. A produtividade média foi de 64,7 t ha⁻¹. Os estados brasileiros com maior participação na safra nacional foram Goiás, São Paulo e Minas Gerais com 33,4, 16 e 11,4%, respectivamente (Faostat, 2011).

Entretanto, o consumo per capita do brasileiro saltou de 5,4 kg ano⁻¹ em 2004 para 19 kg em 2010, ainda considerado baixo em relação aos países como Turquia, Egito e Itália cujo consumo per capita é de 85,8; 84,4 e 66,1 kg, respectivamente (Faostat, 2011).

O Estado do Espírito Santo é o segundo maior produtor brasileiro por produtividade, com aproximadamente 60 t ha⁻¹, perdendo apenas para Goiás, cuja produtividade ultrapassa 80 toneladas (Embrapa, 2011).

Até a década de oitenta a tomaticultura era baseada nas variedades Santa Cruz, Santa Clara, Ângela, Ângela Hiper e Kadá. Essas variedades

atendiam as exigências dos consumidores devido às suas características em termos de aroma, forma, tamanho, cor, paladar, porém seus frutos possuíam baixa resistência a injúrias provocadas por danos mecânicos na ocasião da colheita, do transporte do armazenamento (Ferreira, 2004).

Na pesquisa de frutos mais resistentes, os híbridos longa vida foram descobertos em 1984 nos Estados Unidos da América (Ferreira, 2004). Dentre as suas principais características, ressalta-se a resistência dos frutos a injúrias mecânicas e o seu maior tempo de prateleira, que chega até 30 dias pós-colhido e por essas razões atualmente lideram o mercado Brasileiro de tomates *in natura* (Embrapa 2011).

Dentre as principais variedades de tomateiro longa vida, o híbrido “Alambra” tem se destacado como uma das mais promissoras, devido a melhor qualidade dos frutos e maior produtividade. No Estado do Espírito Santo houve um crescimento de 19% no plantio de híbridos transgênicos e cerca de 80% dos tomaticultores cultivam essa variedade (Embrapa, 2011).

Para cultivo comercial do tomateiro, a micropropagação é uma técnica apresentada como alternativa para a produção de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária, pois através de apenas um explante é possível produzir centenas e até mesmo milhares de mudas de alta qualidade, com espaço e tempo reduzidos (Souza et al., 2009). Sendo esta técnica ideal para multiplicação de clones de um espécime de características desejadas.

Vários fatores influenciam na micropropagação das plantas, tais como a qualidade fitossanitária e genética das plantas doadoras de explantes (Guerra e Nodari, 2006), além da idade e os tipos desses explantes (Torres, 2008) e concentração dos reguladores vegetais utilizados no meio de cultivo (Perez, 2002), como da concentração de sais e açúcares, além do aspecto físico desse meio, podendo ser, sólido ou líquido. O meio de cultura é constituído de macro e microelementos essenciais, substâncias orgânicas, reguladores vegetais, vitaminas, que aumentam a concentração do meio reduzindo seu potencial hídrico afetando o crescimento e desenvolvimento das plantas (Grattaplagia e Machado, 1998).

As plantas matrizes desenvolvidas *in vitro* podem garantir a qualidade genética e sanitária dos explantes, pois são produzidas em meio asséptico e na

maioria das vezes não há necessidade de desinfestação dos explantes, caso ocorra alguma contaminação os mesmos podem ser descartados.

Dentre os reguladores de crescimento, as auxinas são hormônios vegetais que em dosagens convenientes para cada espécie, estimulam o alongamento celular e induzem o crescimento e desenvolvimento das raízes enquanto as citocininas induzem a multiplicação celular e promovem a formação de ramos.

Quando as plantas são cultivadas *ex vitro*, o balanço entre a dosagem de citocininas e auxinas é sincronizado, ocorrendo naturalmente, e tanto a parte aérea como o sistema radicular, desenvolvem simultaneamente, enquanto no ambiente *in vitro* essa relação hormonal tem que ser determinada para os diferentes hormônios e para espécies e genótipos diferentes.

Geralmente a produção de mudas do tomateiro é seminífera, favorecendo a disseminação e infestação de pragas e doenças, reduzindo sua produtividade e a qualidade dos frutos (Souza et al., 2009). Suas sementes por serem transgênicas e importadas, tornaram-se caras para os tomaticultores, sendo necessário buscar meios alternativos de produção de mudas de maior produtividade, de melhor qualidade e conseqüentemente, de menor custo.

Segundo Murashige (1974), a micropropagação é constituída de quatro etapas distintas, sendo que a aclimatização é considerada a mais difícil. Nessa etapa as mudas saem das condições do ambiente de laboratório e são transferidas para a casa de vegetação. Esta passagem é crítica e representa em alguns casos um fator limitante ao processo de micropropagação. Alguns autores têm relatado a importância das condições ambientais no sucesso da aclimatização (Oliveira e Campostrini, 2008; Pasqual et al., 2011).

Calvete (1998), relata que a transferência do cultivo *in vitro* para a aclimatização, resulta em mudanças abruptas no ambiente e que isto, poderá ter influência na sobrevivência e na aclimatização das plântulas micropropagadas.

Esse trabalho foi desenvolvido com os objetivos de testar diferentes concentrações do meio MS para a produção de plantas matrizes do tomateiro, estabelecer as dosagens dos reguladores vegetais na sua micropropagação e na aclimatização das mudas micropropagadas do tomateiro híbrido "Alambra".

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicon* L.) é a segunda planta olerícola mais cultivada no mundo, perdendo apenas para a batata inglesa (Bathia, 2004). Originado da América do sul, nas regiões andinas do Peru e da Bolívia (Peralta et al., 2005). Foi introduzido no Japão pelos portugueses, vindo do sudeste da Ásia ou da China. No Brasil, foi introduzido pelos imigrantes italianos, na metade do século XIX.

Pela classificação do sistema APG (Angiosperm Phylogeny Group), publicado em 2003, um sistema de taxonomia vegetal moderno utilizado na classificação de plantas com flor, na sua revisão APGIII (2009) classifica a espécie do tomate em: *Cladus Angiosperma*, *Cladus eudicots*, *Core eudicots*, Asterids, Euasterids I, Ordem Solanales; Família Solanaceae; subfamília Solanoideae; Tribus Solaneae; Genus *Solanum* e Espécie *Solanum lycopersicum* (APG III, 2009).

É uma planta herbácea, de caule redondo, piloso e macio. Quando jovem é anguloso e se torna fibroso com o passar do tempo (Minami e Haag, 1989). As flores, são hermafroditas, geralmente ocorrendo de 3 a 12, reunidas em forma de cachos, são pequenas e amarelas, caem em forma de nós no ponto de união dos pedúnculos, dando origem aos frutos (Fontes e Silva, 2002).

O tomateiro é uma cultura de importância econômica, devido ao seu fruto ser fonte de alimentação humana, rico em vitaminas do complexo A e B, açúcares, ácidos orgânicos, minerais, como cálcio, fósforo, ácido fólico e licopeno, substância responsável pela coloração vermelha do fruto, sendo também anticancerígena. Tem expressão social por congregar na cadeia produtiva um efetivo de 10.000 produtores, envolvendo 60.000 famílias e mais de 200.000 trabalhadores (Tavares, 2003).

Até o início da década de 80, era plantado cultivares convencionais, como Santa Cruz, Kada, Ângela, Santa clara, que respondiam por mais de 70% da área cultivada, e cujos frutos, possuíam excelentes qualidades que satisfaziam as necessidades comerciais, tais como, tamanho e formato, aroma, paladar e cor.

A partir de 1984, através da biotecnologia vegetal foi introduzido no mercado americano o primeiro híbrido de tomate transgênico tipo longa vida. Do grupo redondo destaca-se a presença de tomates longa vida estrutural e longa vida com gen rin. Como exemplo do tomate salada longa vida estrutural estão os híbridos F1 Diana, Monalisa, Sheila, Bona Clause e Fanny Royal Aluis (Fontes, Silva, 2002, Filgueira, 2003). Do tomate longa vida com gene rin incluem-se os híbridos F1 Carmen, Raísa, Graziela, Densus Horticerres, Alambra Clause, Séculus Horticerres, Razan, Rodas (Gualberto et al., 2002; Fontes e Silva, 2002; Filgueira, 2003).

Nas variedades convencionais a presença da enzima poligalacturonase atua sobre a celulose do pericarpo do fruto, promovendo seu amolecimento e amadurecimento precoce do fruto, tornando-os vulneráveis a danos mecânicos por ocasião da colheita, embalagem e transporte, reduzindo assim, seu tempo de prateleira (Filgueira, 2003). Os híbridos longa vida contém o gene Flavr Savr, anti-senso que inibe a ação da poligalacturonase. Tornando seus frutos firmes, resistentes à colheita e ao transporte, como também permite o prolongamento da colheita e aumenta o período de prateleira dos frutos em até 30 dias (Ferreira, 2004).

Devido a essas e outras qualidades, os híbridos longa vida tornaram-se líderes no mercado consumidor de frutos *in natura*, respondendo por mais de 80% da produção de tomate brasileira (Embrapa, 2011).

2.2. Propagação do tomateiro

A demanda por sementes, de tomate no segmento de mesa é crescente em todo o mundo mesmo com preços significativamente maiores do que os das cultivares convencionais. Esse aumento da demanda é motivado pelas vantagens que propiciam aos produtores e consumidores, destacando-se o aumento da produtividade, a precocidade, a maior uniformidade, a melhor padronização e qualidade dos frutos, a maior resistência a pragas e doenças, a melhor conservação pós-colheita (Souza et al., 2009), justificando a busca de meios alternativos de produção de mudas produtivas, de qualidade genética, fitossanitária e de menor custo.

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada micropropagação, vem ganhando espaço no processo de produção de mudas. Essa tecnologia baseia-se na produção de plântulas, em tubos de ensaio ou frascos de vidro, a partir de órgãos, tecidos ou células, tais como: meristema apical, folhas, câmbio, raiz, pólen (Torres et al., 1998), permitindo a obtenção de plantas em escala comercial, com elevada qualidade genética e fitossanitária e em curto espaço de tempo (Grattaplagia, 1988)

A micropropagação pode assegurar o suprimento contínuo e uniforme de plantas, além de possibilitar a obtenção de mudas saudáveis e homogêneas. As vantagens e eficiência dessa tecnologia tornam-se mais evidentes, quanto maiores forem a capacidade e a facilidade de multiplicação das plântulas, reduzindo gastos e exigindo pouco espaço e tempo (Hirami, 2000; Naves, 2001).

É baseada na totipotencialidade das células, isto é, na capacidade das células responderem a estímulos, traduzi-los, induzindo a formação dos órgãos vegetais, que constituem o corpo de um organismo completo (Gauthered, 1983).

A organogênese somática relaciona-se com a obtenção de eixos caulinares monopolares originados de gemas preexistentes ou neoformadas. Estes eixos caulinares são induzidos ao enraizamento *in vitro* ou *ex vitro*, resultando em plântulas completas, que podem ser então aclimatizadas (Guerra e Nodari, 2006).

A organogênese direta ocorre sem a passagem por formação calosa. Os explantes utilizados são de células ou tecidos meristemáticos, em meio de cultivo e de reguladores vegetais, que em concentrações micromolares, induzem

diretamente a formação dos órgãos da planta (Peres, 2002; Guerra e Nodari, 2006).

Os explantes mais utilizados na organogênese direta são os meristemas apicais, segmentos apicais e segmentos nodais, por possuírem tecidos indiferenciados e células meristemáticas em constante divisão celular (Torres et al., 1998). São constituídos de células pequenas, com núcleos proeminentes, sendo essas, protegidas por primórdios foliares, dificultando a instalação e disseminação de agentes fitopatogênicos (Guerra e Nodari, 2006).

A organogênese somática indireta é caracterizada, inicialmente pela passagem de calo, que ao ser recultivado, irá promover a formação dos órgãos da futura plântula. Os explantes utilizados geralmente são formados de células diferenciadas, não meristemáticas, que em contato com reguladores de crescimento e em meio de cultivo *in vitro*, sofrem desdiferenciação celular. Suas células retornam ao estágio meristemático, promovendo a formação de células diferenciadas que induzem a formação dos órgãos das plântulas, originando um organismo completo (Peres, 2002).

Calo é um tecido formado de células desorganizadas em resposta à injúria causada em função da excisão do tecido da planta matriz (Fosket, 1994). A calogênese é empregada na cultura de tecidos de plantas, por possibilitar o uso de diferentes partes do vegetal como explante. Geralmente quando se deseja indução de calo utiliza-se como explantes tecidos diferenciados como hipocótilos, folhas cotiledonares inteiras (Torres, 2008), folhas cotiledonares inteiras, e seccionadas ou fendidas (Fari, 2002; Harish et al., 2010; Mohamed, 2010), folhas cotiledonares fendidas (Fari, 2000; Borges et al., 2005).

Na organogênese somática direta, a passagem por calo é indesejável, devido ao fato de algumas plantas regeneradas apresentarem variação genética, comumente denominada, variação somaclonal, podendo obter plantas não idênticas à planta matriz (Larkins e Vasil, 2000).

Segundo Pasqual et al. (1997), o sucesso da micropropagação está relacionado a vários fatores dentre eles, o tipo e tamanho dos explantes, os tipos e tamanho dos frascos utilizados, o meio de cultivo, os reguladores de crescimento, os fatores abióticos e os diferentes genótipos.

Os explantes mais utilizados na micropropagação do tomateiro são os meristemas apicais, segmentos apicais caulinares, e segmentos nodais (Torres,

2008), seguido de folhas, hipocótilos, cotilédones inteiros, cotilédones aparados e cotilédones fendidos (Fari et al., 2000; Sheeja et al., 2004; Bathia, 2004; Harish et al., 2010) ou qualquer tecido que responda a indução de um estímulo expressando-o na regeneração de uma planta.

Na organogênese somática direta, a utilização de segmento apical, mostrou-se mais eficiente na regeneração das plantas de tomateiro longa vida Alambra, em relação a segmento nodal, enquanto hipocótilos e folhas cotiledonares inteiras foram mais efetivos na formação de calos (Torres, 2008).

Harish et al. (2010) e Mohamed et al. (2010) verificaram que hipocótilos de plantas de tomateiros foram mais efetivos na organogênese somática indireta, onde obtiveram alto índice de calejamento, que após recultivados, obtiveram, alta taxa de regeneração das plantas, em relação a outros explantes estudados.

Trabalhos realizados por Sheeja et al. (2004) e Bathia et al. (2004), concluíram que para a regeneração indireta do tomateiro, os melhores tratamentos foram obtidos quando utilizaram cotilédones aparados e fendidos. Resultados semelhantes foram verificados por Fari (2000) e Borges et al., (2005).

O tamanho dos explantes utilizados na micropropagação, também varia de acordo com o objetivo do trabalho experimental. Quando se usa meristema apical como explante, o tamanho ideal varia entre 0,10 a 0,20 mm de comprimento. Explantes menores que 0,3 mm, garantem maior limpeza clonal reduzindo o risco de contaminação, entretanto reduzem também a capacidade germinativa da plântula (Torres, 1998).

Os meristemas são constituídos de células pequenas, indiferenciadas e em constante divisão celular, não permitindo a instalação e disseminação desses agentes contaminantes (Peres, 2002). Por outro lado, explantes muito pequenos, não crescem ou demoram muito a desenvolver (Grattaplagia e Machado, 1998). Explantes maiores que 0,5 mm de comprimento aumentam a percentagem de pegamento dos explantes, entretanto aumenta-se também o risco de contaminação (Guerra e Nodari, 2006).

As plantas são organismos pluricelulares complexos e para o seu desenvolvimento ordenado, necessita de um eficiente meio de comunicação entre os órgãos, os tecidos e as células. Os principais meios de comunicação intercelular são os hormônios, que são mensageiros químicos primários que

carregam a informação entre células e, desta forma, coordenam o seu crescimento e desenvolvimento (Perez, 2002).

A competência celular é definida como a capacidade das células responderem aos estímulos específicos quer seja por reguladores de crescimento ou por fatores abióticos, ela é traduzida na indução de órgãos ou na alteração do desenvolvimento vegetal (Carry et al., 2001). A falta de receptores para induzir o processo organogênico reflete na falta de competência do tecido (Peres, 2002).

A determinação celular é a capacidade que um tecido possui de canalizar o metabolismo para uma via de desenvolvimento específica. Quanto maior a determinação de um tecido, para formar um órgão, menor será sua competência para formar outros órgãos. A raiz tem alta determinação para formar raiz e baixa competência para formar ramificações. Os meristemas e segmentos apicais possuem alta competência e baixa determinação (Peres, 2002).

Moléculas receptoras específicas correspondentes para cada um dos hormônios das plantas estão presentes nas membranas celulares das células alvo, recebem, traduzem, amplificam e respondem aos sinais. O sinal pode estar relacionado com mudança na concentração de íons, respostas à luz, ou no desenvolvimento da planta como germinação ou dormência, senescência, queda de folhas, amadurecimento de frutos.

A detecção do sinal é acompanhada pela interação entre o hormônio e o receptor celular, o qual é específico para cada classe de hormônio e característico da célula alvo. Estes receptores são glicoproteínas que se ligam reversivelmente com o hormônio. A formação do complexo ativo hormônio-receptor, completa o estágio de percepção do sinal, onde inicia uma série de eventos bioquímicos que finalmente levam à resposta final (Perez, 2002). O processo morfogênico depende da atividade e expressão de genes e a organogênese de tecidos vegetais *in vitro* normalmente ocorre em resposta à adição de reguladores de crescimento exógenos, geralmente auxinas e citocininas. Relação alta entre citocinina e auxina no meio de cultivo, induz a proliferação de ramos, enquanto baixa relação induz a formação de raiz. Quantidade equimolar de ambas induz a formação de calo, tecido formado por células desorganizadas (Yamaguchi et al., 2003).

As auxinas são de ocorrência ampla no reino vegetal, sendo encontradas principalmente em órgãos que estão em crescimento ativo, tais como as regiões

meristemáticas dos ápices radiculares e caulinares, folhas jovens, coleóptilos e sementes em desenvolvimento. São sintetizadas em regiões de crescimento ativo, como o meristema apical do caule, gemas axilares ou laterais, folhas jovens e meristemas das raízes. São substâncias quimicamente relacionadas com o ácido indol-3-acético (AIA), que promovem o crescimento das raízes das plantas, principalmente através do alongamento celular (Taiz e Zeiger, 2009).

Os níveis de AIA nos tecidos vegetais são controlados por variações nas velocidades de síntese, inativação e degradação. Assim, através de processos ou reações enzimáticas a molécula de AIA pode se ligar a outras moléculas, produzindo compostos inativos. As auxinas são catabolizadas pela ação da AIA-oxidase, sendo um dos produtos finais, o metileno-oxindol. Ocorre também, fotoxidação da molécula de AIA, na qual substâncias como a riboflavina, absorvem a energia utilizada para ativar a oxidação do ácido indol acético, como o AIA-aspartato e o AIA–glutamato (Bandursk et al., 1995).

O 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} molar, enquanto que a iniciação de raízes laterais e adventícias é estimulada por altos níveis de auxina (Taiz e Zeiger, 2009). Na regeneração *in vitro* por organogênese, a relação dos hormônios citocininas e auxinas influencia diretamente na formação dos órgãos das plantas.

Hartmann e Kester (1990) sugerem que a diferenciação de raízes adventícias, está relacionada com a concentração de moléculas de auxinas presentes na região de regeneração. Em algumas espécies vegetais, foi verificado aumento significativo de auxina endógena na zona de enraizamento. Tem-se utilizado auxina exógena nos meios de cultivo *in vitro* com o intuito de aumentar sua concentração a um nível ótimo para a formação de raízes.

A atividade das células iniciais responsáveis pela emissão de raízes adventícias depende da presença de auxina, seja ela endógena ou exógena. De acordo com Hartmann e Kester (1990), o surgimento das raízes pode ser dividido em duas fases: iniciação e alongação.

Na primeira etapa, há uma fase que depende da presença de auxinas na qual se inicia o processo da formação da raiz. A etapa seguinte caracteriza-se pela formação do sistema vascular, que se conecta com os vasos adjacentes

(Hartmann e Kester, 1990). De acordo com Taiz e Zeiger (2009), o meristema dará origem apenas à raiz primária, não apresentando relação com a emissão de raízes laterais.

O enraizamento de brotos propagados *in vitro* requer geralmente transferência de meio de cultura com menor concentração de sais. Thorpe (1991) obteve resultados positivos em diferentes espécies com o emprego do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), diluindo-se 50% de sua concentração inicial. Pereira et al. (1995) testaram diferentes concentrações ácido indol butírico (AIB) e do meio MS, para obtenção de brotações de morangueiro e verificaram, que a adição de AIB ao meio de cultura, prejudicou o desenvolvimento tanto do sistema radicular, quanto da parte aérea e, que o meio MS diluído proporcionou um melhor desenvolvimento de ambas as partes. Ferreira et al. (1996), visando analisar o enraizamento em plantas micropropagadas das cultivares de morangueiro Konvoy, Vila Nova e Campinas, estudaram diferentes concentrações de sais no meio MS e concluíram que ambos os meios favoreceram o enraizamento e a formação de raízes nas cultivares.

Em morangueiros, Boxus et al. (1974) e Kiernan et al. (1984) obtiveram formação de raízes com a inclusão de 4,92 mmol de AIB no meio de enraizamento, embora todos os explantes tenham desenvolvido uma grande quantidade de calo na base das brotações. Grande redução na quantidade e qualidade das raízes foi obtida aumentando-se a concentração de Benzil Amino Purina (BAP), na fase de multiplicação, demonstrando que o BAP endógeno poderia ser importante durante a fase de enraizamento. Resultados semelhantes foram obtidos por Torres (2008) com a cultivar de tomateiro híbrido Alambra, onde nas doses de 0,1 mg L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA), as plântulas apresentaram excelente enraizamento, embora apresentassem pequena formação de calo na zona de excisão dos explantes. Dosagens maiores proporcionaram maior calejamento em relação à formação de raiz.

Costa et al. (2000) analisaram a resposta morfogênica das cultivares de tomateiros IPA-5 e IPA-6 utilizando como explantes, folhas cotiledonares seccionadas em porções apical e basal em diferentes doses de reguladores de crescimento. As cultivares IPA-5 e IPA-6 apresentaram maiores frequências de regeneração de ramos, 97 e 80%, respectivamente. Os melhores meios encontrados para a regeneração e alongamento dos ramos das duas cultivares

foram aqueles compostos de 1,0 mg L⁻¹ de zeatina associado com 0,1 mg L⁻¹ de ácido indol acético (AIA) e 2,5 mg L⁻¹ de BAP associado a 0,2 mg L⁻¹ de ácido indol acético.

Nogueira et al. (2001) obtiveram 92% e 89% de frequência média de regeneração em tomateiros Santa Clara e seu mutante firme, utilizando as partes distal e proximal de folhas cotiledonares como explantes. Segundo os autores, a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de zeatina associado com 0,1 mg L⁻¹ de ácido indol acético (AIA) foi o melhor meio de indução de ramificações e de regeneração para as duas cultivares estudadas.

Borges et al. (2005), trabalhando com abacaxi ornamental, obtiveram 84,1% e 81,9% de enraizamento das plantas com dosagens de 0,05 e 0,01 mg L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA) e recomendam não usar carvão ativado no meio de enraizamento, por promover a redução da percentagem de brotos enraizados, bem como o número médio de raiz por planta.

De acordo com Borges et al. (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 do 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” mestres durante o processo de diferenciação ocorrido anteriormente.

A fase de aclimatização de plantas micropropagadas consiste em retirá-las da condição *in vitro* e transferi-las para casa de vegetação, podendo tornar-se um fator limitante na cultura de tecido. Nesta fase, as plantas, que se desenvolvem heterotroficamente sob condições de alta umidade, alto potencial hídrico e baixa luminosidade passam para condições autotróficas de baixa umidade, altas temperaturas e altas luminosidades. Devido às diferenças entre as duas condições ambientais é necessário que as plantas micropropagadas passem por um período de aclimatização antes de serem transferidas para condições de campo (Pasqual et al., 2011).

A fase de aclimatização é necessária para que a planta se adapte à nova condição de ambiente e se desenvolva antes de ser levada a campo (Pasqual, 2011).

A perda de água é maior em mudas produzidas *in vitro* do que em mudas já aclimatizadas devido à pequena camada epicuticular e ao lento mecanismo de fechamento e abertura de estômatos. A quantidade de cera epicuticular encontrada em plantas sob condições *in vitro* chega a ser 25% do total encontrado em plantas crescidas em casa de vegetação, embora a presença de cera epicuticular não seja um indicativo suficiente da sobrevivência das plantas na aclimatização (Schackel et al., 1990).

O sucesso da técnica de propagação *in vitro* requer que as plantas desenvolvidas heterotroficamente e sob condições de alta umidade (90-100%), posteriormente se adaptem, tornando-se autotróficas passando a crescer sob condições de moderada ou baixa umidade (Zimmerman, 1988). Tradicionalmente, a aclimação *ex vitro* das plantas micropropagadas é realizada segundo a concepção na qual, progressivamente, promove-se o incremento na irradiância mantendo-se, inicialmente, alta umidade relativa do ambiente logo após o transplântio, com gradativa redução da mesma, até que a fase de endurecimento se complete (Campostrini e Otoni, 1996).

A obtenção de mudas totalmente livres de pragas e doenças é possível por meio da cultura de tecidos vegetais, a qual permite a obtenção de milhares de mudas a partir de uma única gema, em curto espaço de tempo. Apesar do grande número de plantas que se obtém através da micropropagação, esta tecnologia apresenta dois grandes problemas para a maioria das espécies de plantas: baixo percentual de adaptabilidade das plântulas micropropagadas durante a etapa de aclimatização e o longo período que essas plantas permanecem nesta fase (González et al., 1997).

3. TRABALHO Nº 1

PRODUÇÃO DE PLANTA MATRIZ *IN VITRO* DO TOMATEIRO “ALAMBRA”

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi testar diferentes concentrações do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), no estabelecimento de plantas matrizes *in vitro* do tomateiro híbrido Alambra. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco concentrações de meio MS: 0; 0,25; 0,5 (meia força); 0,75 e 1 (força total) do meio MS, com cinco repetições. Após desinfestação em câmara de fluxo laminar, sementes de tomate, foram inoculadas em frascos de vidro, contendo 40 ml de meio MS, para as diferentes concentrações do meio MS, onde permaneceram durante 21 dias em sala de crescimento sob condições controladas. Os resultados foram analisados através de regressão polinomial. Concentrações equivalentes a 0,50 força de MS mostraram um ponto mínimo estimado de 210 mg de peso fresco do caule e 350 mg de peso fresco de raiz. O meio 1,0 MS proporcionou maior produção de massa fresca da parte aérea e de raiz. Na ausência de meio, as raízes das plântulas apresentaram-se longas, finas e sem ramificações. O aumento da concentração do meio de cultura MS proporcionou a obtenção de raízes mais curtas, mais grossas e altamente ramificadas.

Palavras-chave: explantes, organogênese, tomate, micropropagação.

PRODUCTION PLANT MATRIX *IN VITRO* OF TOMATO “ALAMBRA”

ABSTRAC – The objective of this study was to test different concentrations of MS medium (Murashige and Skoog, 1962), the establishment of *in vitro* mother plants of tomato hybrid Alambra. The experimental design was completely randomized with five concentrations of the MS (0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 MS), with five replicates. After desinfestation in chamber laminar flow, tomato seeds were inoculated in glass vials containing 40 ml of MS medium, for different concentrations of MS medium, where they remained for 21 days in a growth chamber under control conditions. The results were analyzed by polynomial regression. Concentrations equivalent to 0.5 MS power point showed an estimated minimum of 210 mg fresh weight of the stem and 350 mg fresh weight of root. The 1.0 strength MS medium produced higher fresh weight of the shoots and root. In the absence of MS medium, the roots of seedlings showed up long, thin and without ramifications. Increasing the concentration of the culture medium MS gave the attainment of roots shorter, thicker and highly branched.

Keywords: explants, organogenesis, tomato, micropropagation

INTRODUÇÃO

A técnica de cultivo *in vitro*, consiste na inoculação de sementes ou fragmentos de tecidos da planta matriz previamente desinfestados, denominado explantes em meio de cultura apropriado e em condições assépticas, de modo que os mesmos tenham condições de crescer e desenvolver, produzindo uma planta com as mesmas características genéticas da planta matriz (Minamo et al., 2010; Almeida et al., 2011).

A germinação *in vitro* é uma das alternativas para se produzir plantas matrizes de alta qualidade genética e fitossanitária, pois as sementes são inoculadas em meio de cultura dentro de frascos de vidro previamente esterilizados, onde as sementes encontram condições apropriadas para germinar e desenvolver.

Plantas matriz desenvolvidas *in vitro*, geralmente são saudáveis, vigorosas, uniformes e produzem explantes exponencialmente, de apenas uma semente, pode-se produzir uma planta que fornecerá vários tipos de explantes como segmentos apicais, segmentos nodais (Torres, 2008), fragmentos de folhas cotiledonares (Harish et al., 2010; Mohamed et al., 2010), dos quais poderão ser produzidas milhares de mudas sem perda das características genéticas das plantas matrizes (Souza et al., 2009).

Para a germinação e para o cultivo de tecido *in vitro* é necessário que sejam estabelecidos protocolos adequados para cada espécie de cultura ou tipos de explantes, buscando adequar o desenvolvimento dos mesmos no meio de cultivo (Perez, 2002). O meio de cultivo mais utilizado na micropropagação vegetativa foi estabelecido por Murashige e Skoog em 1962, tornando-se um meio de propagação *in vitro* universal também conhecido como meio MS.

A presença de sais minerais no meio de cultivo influencia na resposta do desenvolvimento dos explantes. O excesso de sais solúveis provoca redução do potencial hídrico do meio induzindo menor capacidade de absorção de água pela planta. A redução do potencial hídrico e os efeitos tóxicos dos sais interferem inicialmente no processo de absorção de água pela semente, influenciando na germinação (Taiz e Zeizer, 2009).

Frettet et al., (1991) afirmaram que a absorção de íons da solução salina pelas sementes, pode determinar distúrbio no balanço osmótico das células, estimulando o influxo de água nas sementes, bem como causar toxidez às plântulas.

Duarte et al., (2006) e Torres (2007) verificaram que a redução do potencial osmótico da solução de NaCl do substrato é prejudicial à germinação e ao desenvolvimento das plantas.

A desuniformidade na germinação das sementes resulta no desenvolvimento das plantas em diferentes estágios de crescimento, influenciando no seu desenvolvimento pós-germinação, geralmente originando explantes em diferentes estágios de desenvolvimento, o que poderá influenciar no seu crescimento e desenvolvimento.

Embora o meio de cultivo mais utilizado *in vitro* seja o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), o mesmo pode ser modificado, pois em determinados

estágios da organogênese, a concentração dos componentes do meio pode influenciar no desenvolvimento das plântulas.

O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito de diferentes concentrações do meio MS no desenvolvimento e vigor de plantas matrizes do tomateiro tipo longa vida “Alambra” germinadas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

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, na cidade de Alegre, estado do Espírito Santo, Brasil.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco doses de meio MS e cinco repetições, em um total de 25 unidades amostrais.

Foram utilizadas sementes certificadas de tomateiro (*Solanum lycopersicon* L.) variedade Alambra, adquiridas na empresa PLANTEC, situada no município de Venda Nova do Imigrante-ES.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas com álcool etílico 70% (v/v) durante 30 segundos, em seguida, com hipoclorito de sódio a 2% (v/v) durante 20 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada e esterilizada. Para obtenção das plântulas matrizes *in vitro*, utilizaram-se meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com as seguintes concentrações modificadas: 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 de concentração do meio MS. Foi acrescentado aos meios 30 g L⁻¹ de sacarose como fonte de carbono e 8 g L⁻¹ de Ágar como meio solidificante. O pH do meio de estabelecimento foi ajustado em 5,8 antes da adição do ágar .

Em frasco de vidro contendo 40 mL de meio MS força total as sementes foram inoculadas em cada frasco, em um total de 25 frascos e em seguida transferidos para a sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de Fluxos de Fótons Fotossintéticos e temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, onde permaneceram por 21 dias. Após esse

período as plântulas foram avaliadas quanto ao comprimento do caule, ao comprimento de raízes, à massa fresca do caule e da raiz e massa fresca total.

Foi utilizada uma balança analítica de precisão para as medidas de peso da parte aérea e do sistema radicular das plântulas e uma régua graduada, para as medidas de comprimento de caule e de raiz. Os resultados das características biométricas foram analisados através de análise de regressão polinomial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variação das concentrações do meio MS influenciou a produção de biomassa, tanto da massa fresca da parte aérea (Figura 2A) quanto da massa fresca de raízes (Figura 2B). Esse comportamento indica que para o tomateiro Alambra, a utilização do meio MS, em concentrações mais elevadas, é fundamental para o crescimento, tanto da parte aérea quanto das raízes das plantas. No cultivo *in vitro*, a ausência de substâncias essenciais, presentes no meio MS, pode induzir a produção de plântulas anormais apresentando sistemas radiculares finos, compridos e sem ramificações radiculares (Figura 1A). Observa-se que na ausência do meio MS não houve desenvolvimento dos explantes.



Figura 1. Sistema radicular de plântulas do tomateiro “Alambra” desenvolvido *in vitro* sobre concentração de 0,25 de força do meio MS (A). Sistema radicular de plântulas do tomateiro “Alambra” desenvolvido *in vitro* sobre concentração de 0,75 de força do meio MS (B).

Verifica-se que à proporção que a concentração do meio aumenta, inicia-se o crescimento da massa fresca da parte aérea e das raízes das plântulas promovendo máximo crescimento dessas características na máxima concentração do meio (1MS).

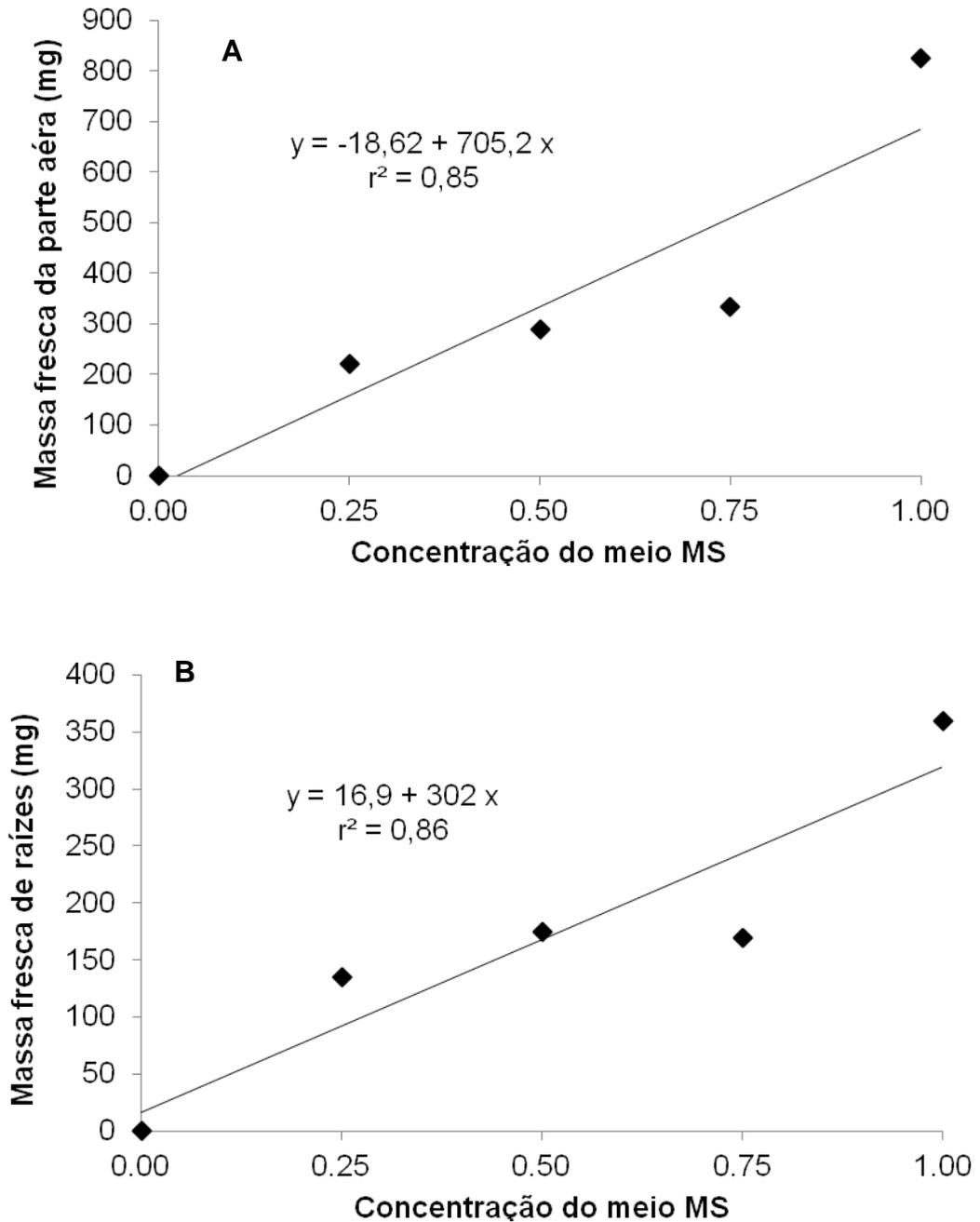
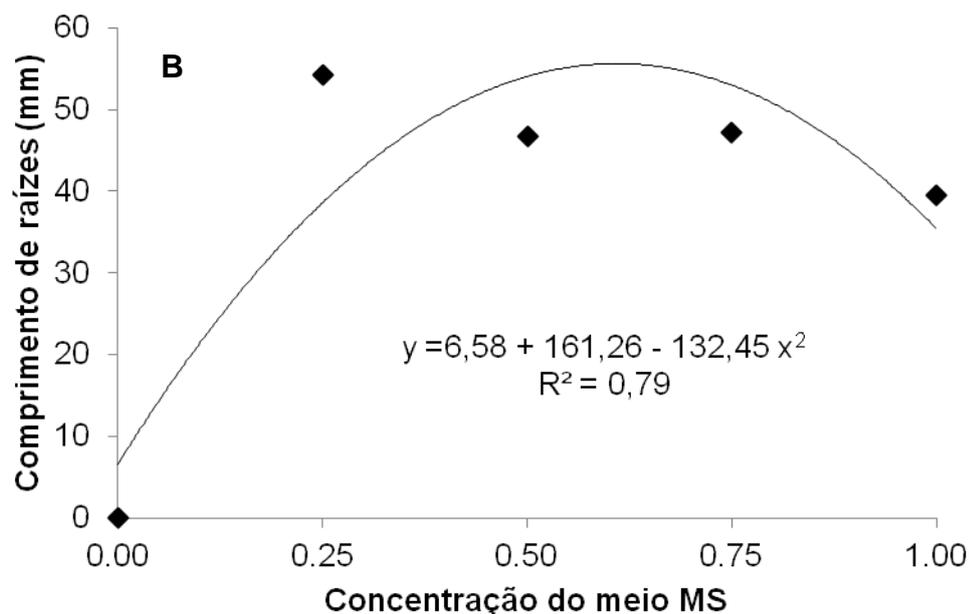
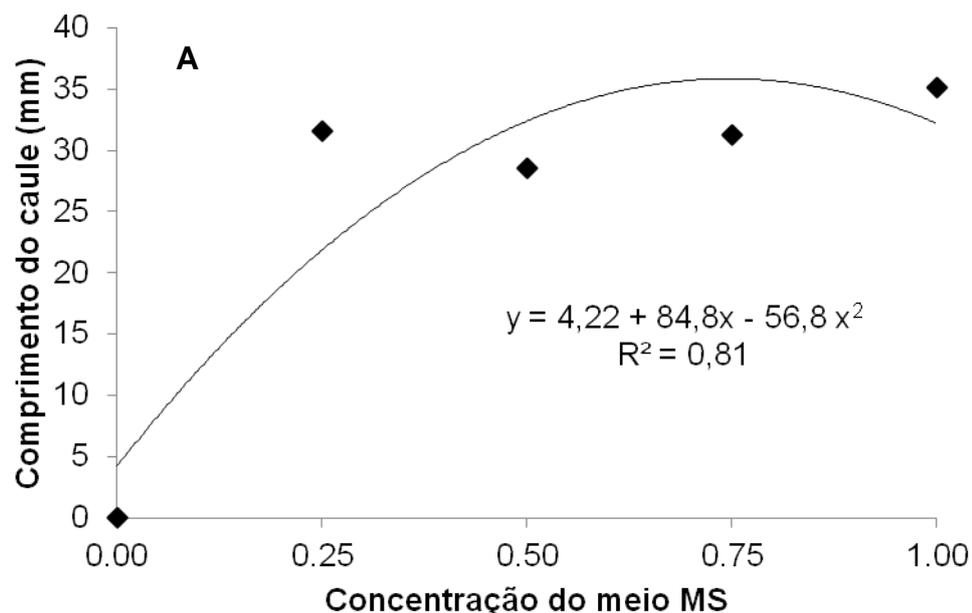


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações do meio MS sobre a massa fresca do caule (A) e de raízes (B) do tomateiro “Alambra”.

Os elementos minerais presentes no meio MS são cofatores do metabolismo fotossintético e respiratório das plantas. Esses processos são, respectivamente, responsáveis pela síntese de açúcares e produção de energia que é utilizada para o desenvolvimento das plantas. A ausência ou deficiência desses elementos minerais no meio de cultivo afetam o crescimento e desenvolvimento induzindo a redução da massa fresca e seca dos principais órgãos das plantas.

A concentração de sais estimada em 0,74 de força do meio MS proporcionou maior crescimento em comprimento do caule, onde a planta atingiu, com esta dosagem, um ponto de máximo crescimento para esta característica, estimado em 57,2 cm (Figura 3A). De acordo com Marengo (2009) a ausência ou a deficiência dos elementos essenciais ao meio de cultivo, reduz o crescimento comprometendo principalmente o desenvolvimento dos órgãos das plântulas.

Comportamento semelhante ocorreu sobre o crescimento em comprimento das raízes. Verifica-se na (Figura 3B) que o ponto máximo de crescimento estimado pela equação ocorreu na dose de 0,61 MS, proporcionando crescimento radicular em comprimento de 34,8 cm. A partir dessa concentração, houve redução do crescimento da parte aérea das plântulas. Comportamento semelhante foi observado por Torres (2008), ao adicionar doses crescentes de sacarose ao meio MS para a germinação *in vitro* de sementes do tomateiro Santa Clara. As plântulas, aos 21 dias após germinação, apresentaram raízes muito compridas, porém muito finas e sem nenhuma ramificação, na menor concentração do meio de cultura.



B

Figura 3. Efeito de diferentes concentrações do meio MS sobre o comprimento do caule (A) e da raiz (B) do tomateiro “Alambra”

A massa fresca total das plantas desenvolvidas *in vitro* também apresentou comportamento linear (Figura 4). À proporção que a concentração de sais do meio MS foi aumentada até a máxima concentração (1MS), houve maior aumento da massa fresca total (da parte aérea e das raízes) das plântulas.

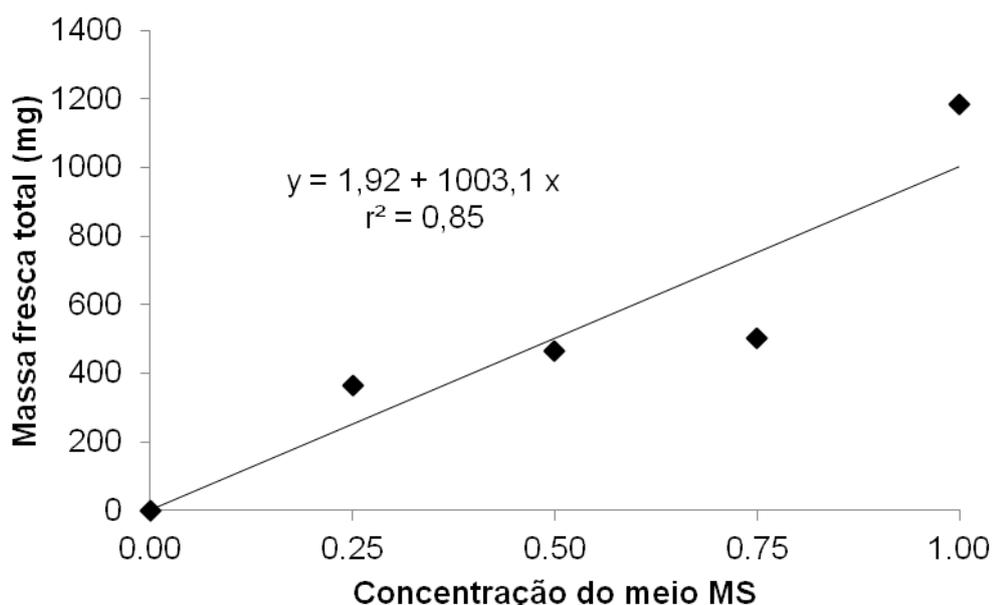


Figura 4. Efeito de diferentes concentrações do meio MS sobre a massa fresca total do tomateiro “Alambra”.

Esse resultado demonstra que maior crescimento em comprimento de parte aérea e de raiz não traduz ganho de biomassa, pois as mesmas, na maior concentração do meio MS, exibiram menor comprimento, mas desenvolveram maior ganho de biomassa de: parte aérea, de raiz e maior volume de raiz (Figuras 1B, 2 e 3).

Lopes e Peixoto (2008), trabalhando com couve chinesa, verificaram que à proporção que a componente osmótica da solução sais de cloreto de sódio foi reduzida de $-0,2$ para $-0,8$ Mpa, houve redução do crescimento das plântulas. Resultado semelhante foi observado por (Torres et al., 2000) que ao avaliarem o efeito da salinidade no crescimento de plântulas de pepino, verificaram que a redução progressiva da componente osmótica de sais de cloreto de sódio no substrato, foi prejudicial ao crescimento das plântulas a partir de potenciais osmóticos inferiores a $-0,4$ Mpa.

Torres (2007) verificou redução da germinação e do crescimento de plantas de melancia com aumento da concentração salina. Altas concentrações de solutos no meio de cultivo promovem a redução de sua componente osmótica, reduzindo o potencial hídrico da solução, interferindo na absorção de água pelas

plântulas, influenciando no crescimento e desenvolvimento dos seus principais órgãos.

Plântulas cultivadas *in vitro*, são desenvolvidas em meio de estabelecimento, que são constituídos de sais minerais, substâncias orgânicas, reguladores vegetais e sacarose que alteram o potencial hídrico da solução, podendo interferir na absorção de água pelas plantas, principalmente pelo fato das raízes das plantas cultivadas *in vitro* não apresentarem totalmente vascularizadas, pouco funcionais e com baixa capacidade absorptiva de água e nutrientes.

CONCLUSÕES

- Concentrações do meio MS força total proporciona aumento da massa fresca da parte aérea, massa fresca da raiz e massa fresca total, promovendo plantas matrizes do tomateiro "Alambra" *in vitro* vigorosas e aptas para a produção de explantes.
- Na ausência e em concentrações inferiores a 0,50 MS induzem a formação de plantas matrizes pouco vigorosas e inaptas como doadoras de explantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, A.A.F. (2011) Passion Flow hybrids and their use in ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. *Euphytica*, 166(3):307-315.

Firmino Junior, P.C.; Poeta, P.C.; Everson. J. (2009) Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.) a partir de genótipos estabelecidos da Amazônia Sul-Occidental. *Scientia Florestalis*, 37(84):427-436.

- Frettet, J.J.; Pill, W.G.; Morneau, D.C. (1991) A comparison of priming agents for tomato and asparagus seeds. *HortScience*, 26(9):1158-1159.
- Harish, M.C.; Rajeevkumar, S.; Sathishkumar, R. (2010) Efficient *in vitro* callus induction and regeneration of different tomato cultivars of India. *Asian Journal of Biotechnology*, 2(3):178-184.
- Minamo L.N.; Macharia, C.M.; Wassilwa, L.A. (2010) Micropropagation a used tool for rapid multiplication of oil palm (*Elaeis guionensis*) hybrids in Kenya. In: KAR I BIENAL SCIENTIFIC CONFERENCE, Kenya. Anais, Kenya.
- Mohamed, A.A.N.; Ismail, M.R.; Rahman, M.H. (2010) *In vitro* response from cotyledoand hypocotyls explants in tomato by inducing 6-benzylaminopurine. *African Journal of Biotechnology*, 9(30):4802-4807.
- Murashige, J.R.; Skoog, F.A. (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15:473-497.
- Peres, L.E.P. (2002). Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. *Biotecnologia e Desenvolvimento*, Brasília, (25):44-48.
- Souza, F.V.D.; Cabral, J.R.S.; Souza, E.H.; Ferreira, F.R.; Nepomuceno, O.S.; Silva, M.J. (2009) Evaluation of F1 hybrids between *Ananas comosus* var. ananassoides and *Ananas comosus* var. erectifolius. *Acta Horticulturae*, 822:79-84.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2009) *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed. 848p.
- Torres, A.C.; Teixeira, S.L.; Pozzer, L. (1998) 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, 133-145.
- Torres, F.J.B. (2008). *Organogênese in vitro do tomateiro Longa Vida Híbrido 'Alambra'*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Programa de Pós-graduação em produção Vegetal, Alegre. ES. Universidade Federal do Estado do Espírito Santo. UFES, 50p.
- Torres, S.B. (2007) Germinação e desenvolvimento de plântulas de melancia em função da salinidade. *Revista Brasileira de Sementes*, 29(3):68-72.

4. TRABALHO Nº 2

MICROPROPAGAÇÃO DO TOMATEIRO “ALAMBRA”

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi de testar diferentes doses de cinetina na regeneração de plantas do tomateiro “Alambra” através da micropropagação. Segmentos apicais caulinares, obtidos de plantas matrizes, produzidas *in vitro*, em meio Murashige e Skoog (MS) força total, foram utilizados para organogênese somática direta do tomateiro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) e constituído de quatro doses de cinetina com cinco repetições, em um total de 20 unidades amostrais. Ao meio de cultivo foram adicionadas as seguintes doses de reguladores vegetais: (0,0; 10; 100 e 1000) $\mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina, para induzir ramificação e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético (ANA), para indução de raízes. Após a inoculação, o material experimental foi transferido para a sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de Fluxos de Fótons Fotossintéticos e temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, onde permaneceu por vinte e um dias. A dose de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina, associada a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ANA, proporcionou maior acúmulo de massa fresca de parte aérea e de raiz. Doses de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina promoveram formação de tecidos calosos nas plântulas, entretanto, não houve desenvolvimento do sistema radicular.

Palavras-chave: Regeneração, *Solanum lycopersicon*, tomate, propagação

MICROPROPAGATION OF TOMATO “ALAMBRA”

ABSTRACT- The objective of this study was to test different concentrations of kinetin on regeneration of tomato plants “Alambra” through basic gation. Segments apical meristems obtained from mother plants produced *in vitro* on Murashige and Skoog (MS) total force, were used for direct somatic organogenesis of tomato. The experimental design was completely randomized (DIC) and consists of four doses of kinetin with five replicates, a total of 25 sampling units. To the culture medium were added the following doses hormone: (0.0, 10, 100 and 1000) $\mu\text{g L}^{-1}$ kinetin to induce branching and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ naphthalene acetic acid (NAA) to induce roots. After inoculation, the experimental material was transferred to a growth chamber under a photoperiod of 16 hours light and light intensity of $36 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Flow and Photosynthetic Photon controlled temperature of $25 \pm 2^\circ\text{C}$, where they remained twenty-one days. The results were analyzed by polynomial regression, according to the significance level. The dose of 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ kinetin, mixed with 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ NAA, showed higher accumulation of fresh weight of seedling shoots and root. Doses of 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ kinetin, promoted callous tissue formation in seedlings, however, there was no root system development.

Keywords: Regeneration, *Solanum lycopersicon*, tomato, propagation

INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos tem papel preponderante nas técnicas de transformação genética das plantas, uma vez que é necessário, a partir de células ou fragmentos de tecido em meio de estabelecimento *in vitro*, induzir gemas vegetativas e em seguida regenerar brotos e plântulas completas, geneticamente idênticas às plantas matriz (Fari, 2005).

Na organogênese somática é necessário o estabelecimento de células competentes no explante inicial. No caso do explante já possuir células

meristemáticas, ocorrerá organogênese direta. Quando há necessidade de desdiferenciação do explante, com a formação de calo previamente ao estabelecimento das células competentes, ocorrerá organogênese indireta. Esses calos ao serem recultivados, produzirão ramos que em meio de multiplicação produzirão explantes exponencialmente (Harish et al., 2010; Mohamed et al., 2010).

Embora o meristema radicular seja constituído de células jovens e meristemáticas, possui pouca ou nenhuma competência, pois são determinados para formação de raízes. Quanto maior a determinação de um órgão para formar raízes, menor será sua competência para formar outro órgão, portanto o tecido caloso tem baixa determinação e alta competência para formação tanto de raízes quanto de gemas caulinares (Peres et al., 1999).

Peres e Kerbaury (1999) associam a falta dessa competência ao próprio metabolismo hormonal do explante, pois ele é quem determina o balanço Auxina/Citocinina para indução da organogênese. A falta de competência de um tecido pode refletir, portanto, a falta de receptores para a classe hormonal, que irá induzir o processo organogênético.

Diferentes tipos de explantes podem ser utilizados na micropropagação vegetativa, tais como meristema apical, segmento apical, segmento nodal, cotilédones, hipocótilo, epicótilo (Torres, 2008; Borges et al., 2005) folhas, raízes, cotilédones fendido e aparados (Fari et al., 1995; Harish et al., 2010; Mohamed et al., 2010).

Torres (2008) testando vários tipos de explantes e seus efeitos na organogênese verificou que explantes oriundos de segmentos apicais apresentaram melhores resultados para o tomateiro tipo "Alambra", em relação aos obtidos de segmento nodal, folhas cotiledonares inteiras e hipocótilos. Trabalhos realizados por Fari (2001), Harish et al. (2010) e Mohamed et al. (2010), utilizando via indireta de regeneração, verificaram que folhas cotiledonares e hipocótilos foram mais expressivos na formação de calos e posteriormente na regeneração de plântulas de tomateiro.

As auxinas, citocininas e giberelinas são os reguladores vegetais mais utilizados em cultura de tecidos (Caldas et al., 1998). A natureza dos hormônios e suas combinações dependem do padrão de desenvolvimento dos explantes e genótipos.

As auxinas em microdoses estimulam o alongamento celular e, induzem o crescimento e desenvolvimento das raízes, enquanto as citocininas induzem a multiplicação celular e promovem a formação de ramos. O balanço entre doses de citocinina e auxina tem que ser bem equilibrado, no cultivo *in vitro*, pois inicialmente existe a necessidade de indução de ramos, que depois de alongados, serão multiplicados exponencialmente, que em seguida serão transferidos para meio de indução de raízes. Nas plantas cultivadas *ex vitro*, o balanço entre as doses de citocinina e auxina ocorre naturalmente e tanto parte aérea como sistema radicular desenvolvem simultaneamente enquanto no ambiente *in vitro* essa relação hormonal tem que ser determinada para as diferentes espécies e genótipos.

As auxinas são grupos de reguladores de crescimento, promotores de formação de calos (organogênese somática indireta) e de enraizamento (Peres et al., 1999). Dentre as principais auxinas o Ácido Naftaleno Acético (ANA) é o mais utilizado por apresentar maior estabilidade à temperatura de autoclavagem, enquanto o Ácido Indol Acético (AIA) é menos estável.

Resultados obtidos por Borges et al. (2005) sugerem que embora a competência para regeneração *in vitro* possa ser dependente do Balanço entre auxina e citocinina, ou da resposta a esse balanço, existem interações mais complexas entre esses hormônios e seus efeitos na regeneração. Parece que a sensibilidade a auxina é necessária no processo de dediferenciação. Segundo os autores, auxinas e citocininas não só atuam na diferenciação, como também podem interferir na regeneração, independente do balanço (Auxina/Citocinina), sendo necessários para a expansão e divisão celular.

Segundo Peres (2002), as diferenças significativas na capacidade organogênica *in vitro* são dependentes dos fatores ligados às plantas, como genótipo e natureza dos explantes (órgãos embrionários, jovens e adultos), componentes mineral do meio de cultivo, fatores físicos e ambientais e a natureza e concentração dos reguladores de crescimento.

Plântulas cultivadas *in vitro* têm sua morfogênese afetada, podendo levar a consequências negativas no crescimento e no desenvolvimento, tendo como resultado uma diminuição das taxas de estabelecimento e de multiplicação e aclimatização (Campostrini e Otoni, 1996). Podem apresentar variação no tamanho, forma e estágio de desenvolvimento (Kozai e Kitaya, 1995).

Apresentam folhas pouco lignificadas, com células de paredes delgadas, com espaços intercelulares abundantes, sistema vascular pouco desenvolvido e reduzida quantidade de material estrutural como nos tecidos do colênquima e esclerênquima (Donnelly et al., 1985). Possuem o sistema vascular pouco desenvolvido, tendo como consequência uma pequena porcentagem de sobrevivência dessas raízes durante a aclimatização (Ziv, 1995).

As raízes formadas *in vitro* não se apresentam totalmente funcionais quando transferidas para o meio *ex vitro*, sendo fracas e com poucos pelos absorventes, geralmente morrendo logo após a transferência (Pierlk, 1990). São plântula com reduzida eficiência fotossintética em função da baixa luminosidade e alta umidade relativa do meio de cultivo, possuem folhas com menor quantidade de cera epicuticular do que as plantas crescidas em condições naturais (Baker, 1974; Sutter e Langhans, 1979). Isso aumenta a perda de água pela transpiração que, aliada ao reduzido número de estômatos e a má estruturação do colênquima, pode levar a desidratação e morte da muda (Campostrini e Otoni, 1996).

O objetivo deste trabalho foi testar os efeitos da cinetina no crescimento e desenvolvimento do tomateiro “Alambra”.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Produção Vegetal (DPV) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA/ UFES) na cidade de Alegre, estado do Espírito Santo, Brasil.

Plantas do tomateiro híbrido “Alambra”, desenvolvidas *in vitro* em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), força total, foram utilizadas como doadoras de explantes.

Em frascos de vidro contendo 40 mL de meio MS, foram adicionadas as seguintes doses de reguladores vegetais: cinetina (0, 10 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$) para indução de ramos e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético (ANA), para indução de raízes. Foi acrescentado ao meio 30 g L^{-1} de sacarose como fonte de carbono e 8

g L⁻¹ de Ágar como agente solidificante, mantendo-se o pH da solução em 5,8 após a adição do Ágar e da sacarose.

Os frascos contendo cada tratamento com suas respectivas repetições foram identificados, colocados em sacos plásticos e esterilizados em autoclave durante 20 minutos após atingir a temperatura de 121°C. Após esse período os frascos foram transferidos para sala de inoculação, onde permaneceram até a completa solidificação do meio.

Em câmara de fluxo laminar horizontal, segmentos apicais caulinares excisados das plantas matrizes, foram inoculados em cada frasco. Depois da inoculação dos explantes os frascos foram fechados com tampas de roscas biológicas e lacrados com filme PVC.

Os frascos foram transferidos para sala de crescimento, onde permaneceram por 21 dias, sob fotoperíodo luminoso de 16 horas e intensidade luminosa de 36 $\mu\text{mol M}^{-2} \text{S}^{-1}$ de Fluxos de Fótons Fotossintéticos, fornecidos por lâmpadas frias tipo luz do dia e temperatura controlada de 27 \pm 2°C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de quatro tratamentos e cinco repetições, em um total de 20 unidades.

Foram analisadas as seguintes características biométricas: massa fresca e massa seca da parte aérea, massa fresca e massa seca das raízes, comprimento caule, e volume das raízes, número de ramos e de folhas.

Os dados experimentais obtidos neste estudo foram submetidos à análise de variância e as variáveis dependentes foram relacionadas com doses de cinetina por meio de equação de regressão optando-se pelo modelo com melhor ajuste e as doses de cinetina 0; 1; 10; 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram transformadas em log (x).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A equação de segundo grau para massa fresca da raiz das plântulas indica que, o máximo de produção ocorreu tanto na presença de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, quanto na ausência de cinetina exógena (Figura 1A).

Para a característica massa fresca da parte aérea das plântulas verifica-se que o ponto de máxima produção ocorre na ausência de cinetina e decresce linearmente com o aumento das doses subsequentes até atingir o ponto de

minimo na dose máxima utilizada. Segmentos apicais caulinares são explantes que possuem células meristemáticas em constante divisão celular. Os reguladores vegetais são utilizados em cultura de tecidos com o objetivo de complementar a deficiência dos mesmos presentes nos explantes. Nesse trabalho, para a micropropagação das plantulas, foi utilizado segmentos apicais caulinares como explantes. Possivelmente a presença de reguladores vegetais nos explantes utilizados na organogênese, possa ter contribuído para promover aumento da massa fresca da parte aérea e das raízes das plântulas, não necessitando da adição dos mesmos ao meio de cultivo.

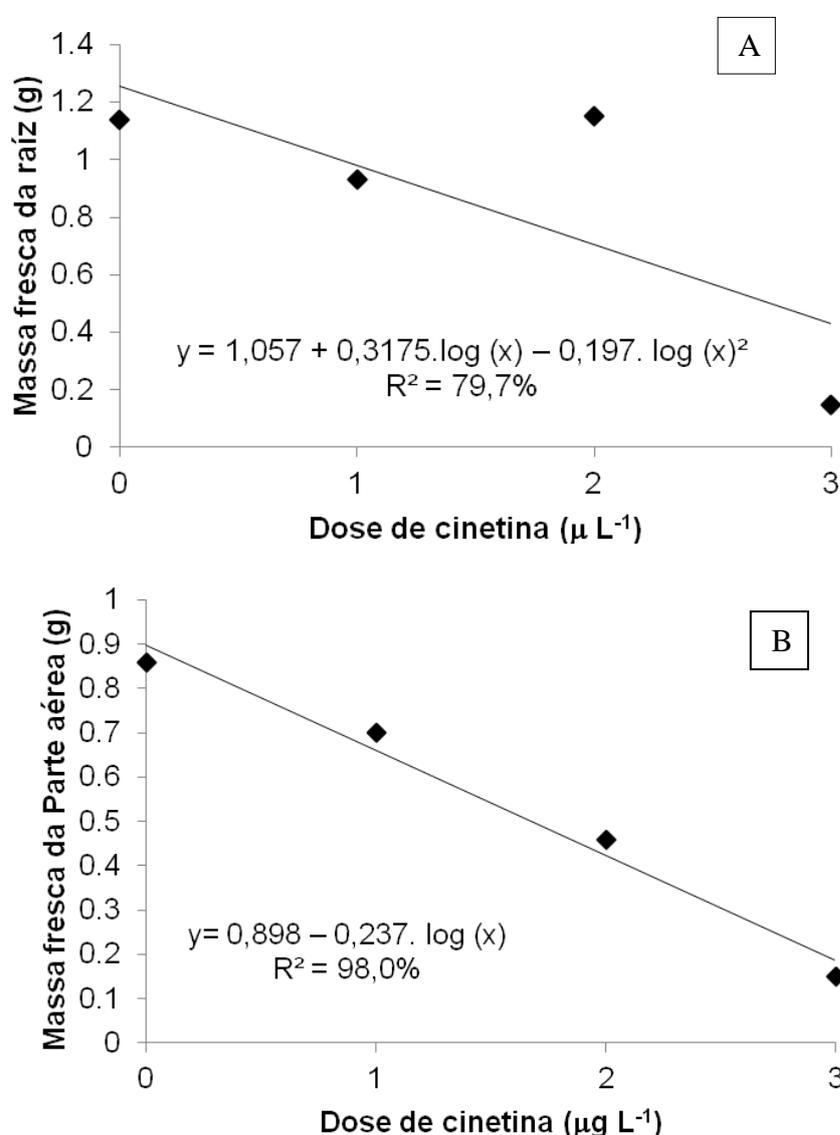


Figura 1. Efeito de doses de cinetina sobre a massa fresca da raiz (A) e massa fresca da parte aérea (B) do tomateiro tipo longa vida híbrido “Alambra” em meio MS acrescido de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético (ANA).

No cultivo de segmentos apicais caulinares do tomateiro “Alambra” com $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina no meio de cultura verifica-se que houve decréscimo acentuado da biomassa fresca do caule e biomassa fresca da raiz e um acentuado desenvolvimento de tecido caloso (Figura 1 e 4). De acordo com Peres (2002) quando a relação citocinina /auxina é aumentada ocorre formação de ramificação e quando reduzida favorece a formação de enraizamento e calejamento dos explantes. Provavelmente a maior dose de cinetina utilizada nesse trabalho possibilitou a formação de calo e desfavoreceu a formação de raízes devido ao desequilíbrio entre os reguladores vegetais.

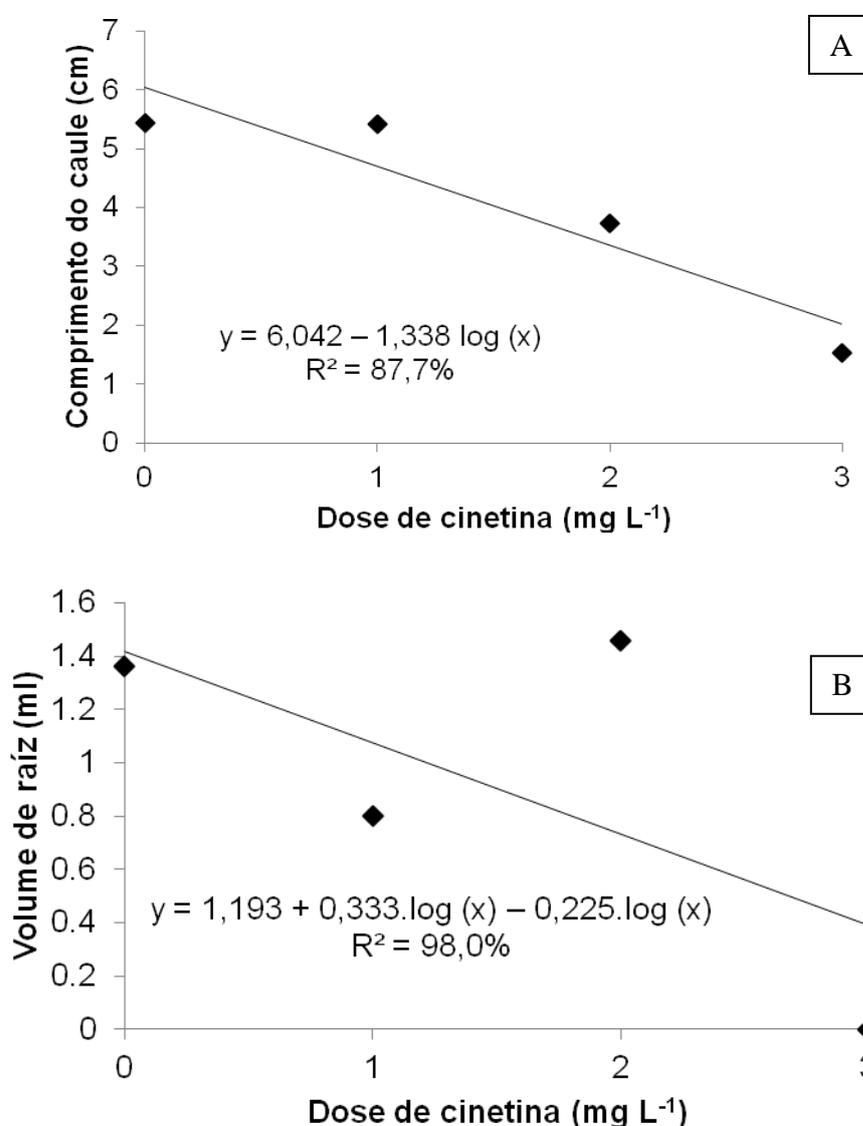
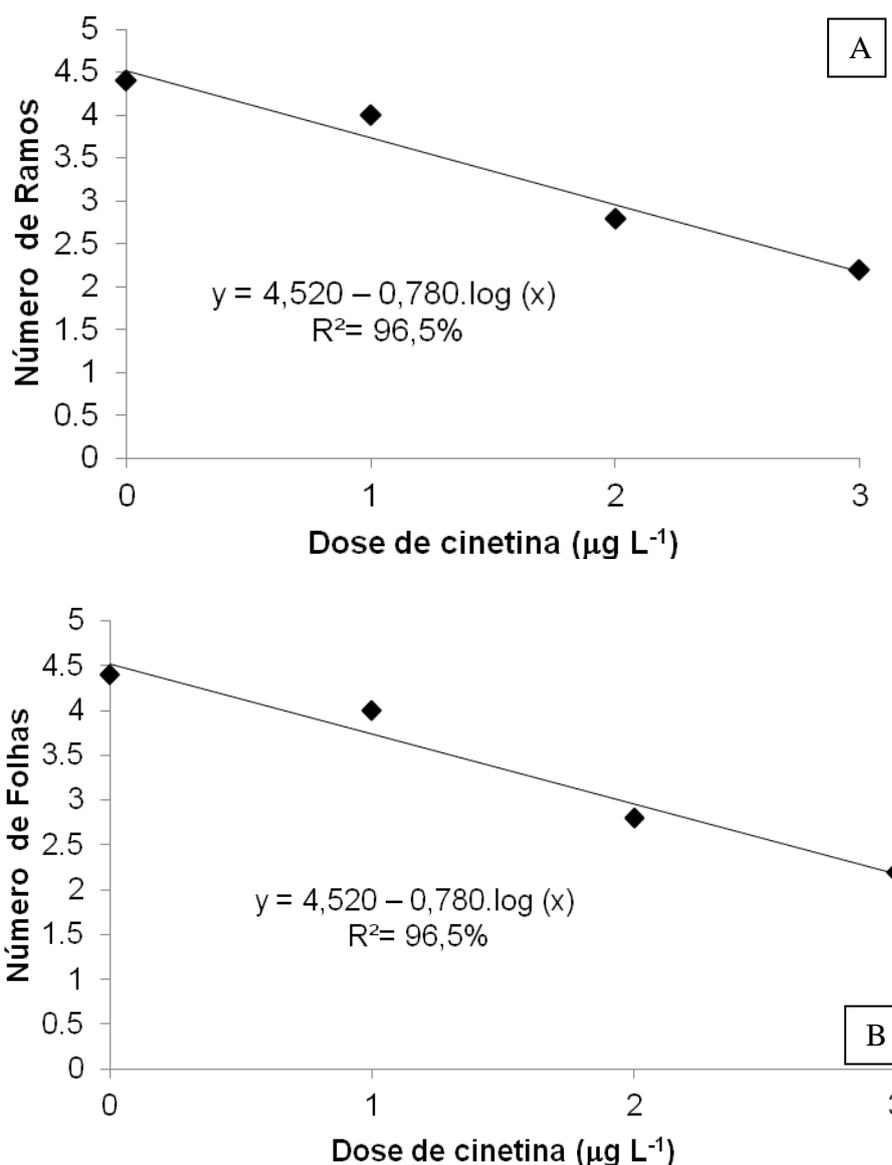


Figura 2. Efeito de doses de cinetina sobre comprimento do caule (A) e o volume de raiz (B) do tomateiro “Alambra” acrescido de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético (ANA).



Figuras 3. Efeito de doses de cinetina sobre o número de ramos (A) o número de folhas (B) do tomateiro tipo longa vida híbrido “Alambra” acrescido de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético (ANA).

Esses resultados corroboram com Harish et al. (2010) e Mohamed et al. (2010), que observaram que o aumento na concentração de cinetina provocou redução da massa fresca da parte aérea e massa fresca das raízes porém, proporcionou maior formação de tecido caloso. Observa-se na Figura 4, que a máxima dose de cinetina, associada a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de auxina proporcionou maior desenvolvimento de calo em detrimento da formação de raízes.

Para a característica volume de raiz, verifica-se pelo comportamento da equação de 1º grau, que o volume máximo de raízes também ocorreu na ausência de cinetina. À proporção que as doses de cinetina foram aumentadas houve redução do volume das raízes até atingir o ponto de mínimo na dose de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 2B). Entretanto, verifica-se através da (Figura 4) que o volume de massa calosa aumentou nessa dose. Segundo Borges (2004) concentrações excessivas de citocinina promovem a formação de massa calosa na base do explante, podendo comprometer a proliferação de gemas axilares e afetar o enraizamento

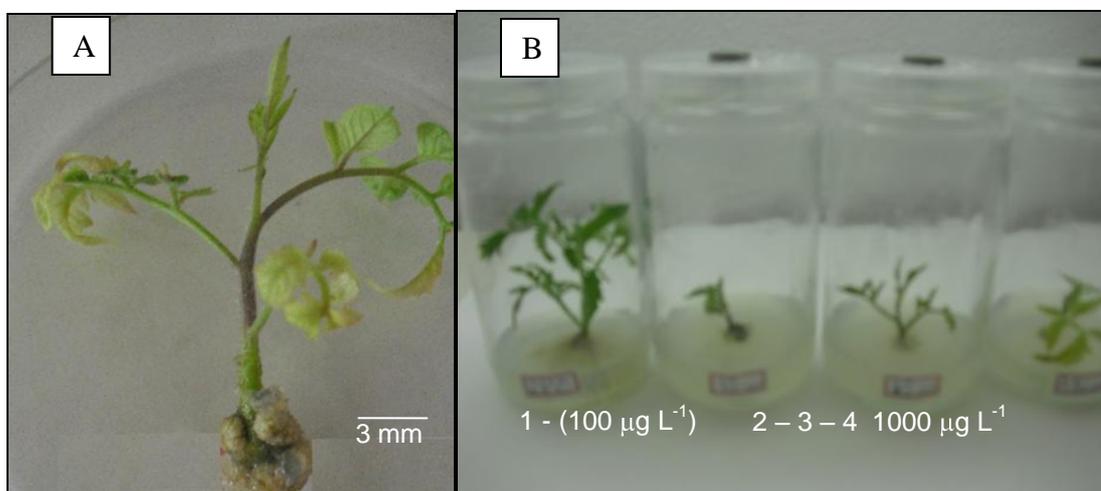


Figura 4. Produção de massa calosa com cinetina na dose de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ do tomateiro “Alambra” (A); Efeito de doses de cinetina sobre o desenvolvimento de massa fresca do caule e massa fresca de raízes do tomateiro Alambra acrescido de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético (B).

Verifica-se na Figura 2B que doses de até $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina promovem o desenvolvimento normal das plantas, proporcionando maior volume de área foliar em relação à dose de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, a qual originou plantas de menor porte (Figura 4B)

Doses crescentes de cinetina promoveram reduções do número de ramos e número de folhas das plântulas (figuras 3A e 3B) respectivamente. O ponto de máximo da equação estimada foi de 4,5 para número de ramos e de folhas. À proporção que as doses de cinetina foram aumentadas houve redução de ambas

características, atingindo um ponto mínimo de 2 ramos e de 2 folhas na maior dose de cinetina ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$).

CONCLUSÕES

- As doses de cinetina associada a doses de auxina respondem negativamente na organogênese somática direta *in vitro* do tomateiro “Alambra”.
- Na ausência dos reguladores vegetais houve maior desenvolvimento de todas as características estudadas.
- Dosagens de cinetina de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ associadas à aplicação de ácido naftaleno acético são efetivas para organogênese somática indireta.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Borges, N.S.S.; Benbadis, A.; Marco, C.A. (2005) Respostas morfogênicas de tomates cultivado *in vitro*. *Revista Ciência Agronômica*, 36(1):91-97.
- Caldas, L.S.; Haridasan, P.; Ferreira, M.E. (1998) Meios nutritivos. In: Torres, C. Caldas, L.S. Buso, J.A. (1998). *Cultura de Tecidos Transformação Genética de Plantas*. Brasília, 1:87-32.
- Campostrini, E.; Otoni, W.C. Aclimatização de muda: Aclimatização de muda: abordagens recentes. *ABCTP Notícias*, CNPH/EMBRAPA, Brasília, 25: 1996.
- Fari, M.; Resende, G.R de; Mello, N.F. (2000) Avaliação da capacidade de regeneração *in vitro* em tomateiro industrial. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 35(8):1523-1529.
- Grattapaglia, D.; Machado, M.A. (1998) Micropropagação. In: Torres, A.C. Caldas, L.S. Buso, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI\Embrapa CNPH, 1:183-260.

- Harish, M.C.; Rajeevkumar, S.; Sathishkumar, R. (2010). Efficient *in vitro* callus induction and regeneration of different tomato cultivars of India. *Asian Journal of Biotechnology*, 2(3):178-184.
- Hartmann, H.T.; Kerster, D.E. (1975) *Plant propagation, principles and practices*. 3.ed. New Jersey Prentice-Hall. 662p.
- Mohamed, A.A.N.; Ismail, M.R.; Rahman, M.H. (2010) *In vitro* response from cotyledon and hypocotyls explants in tomato by inducing 6-benzylaminopurine. *African Journal of Biotechnology*, 9(30):4802-4807.
- Murashige, J.R.; Skoog, F.A. (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15:473-497.
- Murashige, T. (1974) Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 25:135-66.
- Murashige, T. (1977) Clonal crops through tissue culture. In: Barz, W.; Reinhard, D.E.; Zenk, M.H. (eds). *Tissue Culture and its bio-technological application*. P. 392-403. Springer-Verlag. Berlin.
- Pasqual, M.; Soares, J.D.R.; Rodrigues F.A.; Araújo A.G.; Santos R.R. (2011) Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. *Horticultura Brasileira*, 29:324-329.
- Peralta, I.; Spooner, D.M. (2001) GBSSI gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. Subsection *Lycopersicon*) *American Journal of Botany*, 88:1888-1902.
- Peralta, I.; Knapp, S.; Spooner, D.M. (2005) New species of wild tomatoes (*Solanum lycopersicon*: Solanaceae) from northern Peru, *Syst. Bot.* 30:424-434.
- Peres, L.E.P.; Morgante, P.G.; Vicchi, C.; Kraus, J.E.; van Sluys, M.A. (2001) Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species. *Plant Cell Tissue and Culture*, 65:37-44.
- Peres, L.E.P. (2002) Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. *Biotecnologia e Desenvolvimento*, Brasília, 25:44-48.

- Perez, S.C.J.G.; Moraes, J.A.P.V. (1994) Estresse salino no processo germinativo de algarobeira e atenuação de seus efeitos pelo uso de reguladores de crescimento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, 29(3):389-396.
- Pospsilová, J.; Háisel, D.; Synkova, H.; Catski, J.; Wilhelmová, N.; Plzáková, S.; Prochárková, D.; Sramek, F. (2000) Photosynthetic pigments and gas Exchange during *ex vitro* acclimation of tobacco plants as affected by CO² supply and abscísico acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 61: 125-133.
- Schmidt, O. (2010) *Cultivo in vitro e estaquia dos mamoeiros 'Golden' e 'UENF/CALIMAN 01'*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)-Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 116p.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2009) *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed.
- Torres, A.C.; Teixeira, S.L.; Pozzer, L. (1998) 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, 1: 133-145.
- Torres, F.J.B. (2008) *Organogênese in vitro do tomateiro Longa Vida híbrido "Alambra"*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal. Alegre. ES. Universidade Federal do Estado do Espírito Santo. UFES. 50p.

5. TRABALHO Nº 3

ACLIMATIZAÇÃO DAS PLÂNTULAS DO TOMATEIRO “ALAMBRA”

RESUMO – Esse trabalho teve como objetivo testar diferentes doses de cinetina na aclimatização de plântulas micropropagadas do tomateiro “Alambra”. Em frascos de vidro contendo 40 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionados com dosagens de cinetina: 0; 1; 10; 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para indução de ramificação e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético (ANN) para indução de raízes. Segmentos apicais caulinares de plantas matrizes produzidas *in vitro* foram excisados e inoculados nos frascos. Após inoculação os frascos foram fechados e lacrados com filme PVC e transferidos para sala de crescimento, sob condições controladas de luminosidade e temperatura, onde permaneceram por 21 dias. Após este período as plântulas foram retiradas dos frascos e transferidas para recipientes plásticos contendo 300 mL de substratos para hortaliças. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado composto de cinco tratamentos e cinco repetições totalizando 25 vasos. As plântulas foram transferidas para casa de vegetação onde permaneceram por mais 21 dias em aclimatização. A casa de vegetação foi coberta com filme plástico transparente com 150 micra de espessura e sobre este, utilizou-se tela preta tipo sombrite para redução de 50% da luminosidade. Após vinte e um dias de aclimatização as plantas foram colhidas e as características biométricas foram analisadas. Plântulas tratadas com

doses de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ cinetina e de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ANA, foram mais efetivas na sobrevivência e aclimatização das plantas.

Palavras-chave: Micropropagadas, planta matriz, excisados, segmentos apicais.

ACCLIMATIZATION OF SEEDLINGS OF TOMATO “Alambra”

ABSTRACT – This study aimed to test different doses of kinetin in the acclimatization of plantlets of tomato “Alambra”. Glass bottles containing 40 mL of MS medium (Murashige and Skoog, 1962) with added doses of kinetin 0; 1; 10; 100 and 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for inducing branching and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ naphthalene acetic acid (NAA) for root induction. The apical meristems of stock plants produced in vitro were excised and inoculated into bottles. After inoculation, the flasks were closed and sealed with PVC film and transferred to a growth chamber under controlled conditions of light and temperature, where they remained for 21 days. After this time the seedlings were removed from the flasks and transferred into plastic containers containing 300 mL of substrate for vegetable. We used a completely randomized design consisting of five treatments and five replicates totaling 25 vessels. The seedlings were transferred to the greenhouse for, where they remained for 21 days of acclimatization. The greenhouse was covered with transparent plastic film 150 microns thick and about this, we used the black screen type shading to reduce 50% brightness and 50% of the growing environment. After twenty-one days acclimation, the plants were harvested and the biometric characteristics were analyzed. Seedlings treated with doses of 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ kinetin and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ NAA, were more effective in the survival and acclimatization of plants.

Keyword: Micropropagated plant matrix, excised, apical segments.

INTRODUÇÃO

A aclimatização é uma das fases mais difíceis da organogênese somática e pode comprometer o processo de micropropagação por envolver a neoformação do sistema radicular e a passagem para condições *ex vitro* (Bandeira et al., 2007).

Quando transferidas para as condições *ex vitro*, as plântulas geralmente apresentam altas taxas de transpiração, em função da alta condutividade hidráulica de suas folhas (Bandeira et al., 2007, Oliveira e Campostrini 2008), o que na maioria das situações, provoca um elevado déficit hídrico, causando sua desidratação, podendo causar a morte das mudas (Diaz-Perez et al., 1995).

Segundo Campostrini e Otoni (1996), os brotos regenerados *in vitro* não estão adaptados ao novo ambiente, pois não possuem mecanismos de proteção contra a desidratação, já que seus estômatos geralmente se encontram abertos. As folhas são frágeis, tenras e delgadas, com reduzida camada de cera e fotossinteticamente inativas (Souza et al., 2006). Possuem raízes pouco vascularizadas, comprometendo a absorção de água e nutrientes.

Essas modificações em conjunto comprometem a adaptação das plantas micropropagadas às condições naturais, o que tem resultado na redução da taxa de sobrevivência e aclimatização das plântulas quando transplantadas para o ambiente (Otoni, 2010).

Ao comparar a morfologia dos estômatos em folhas de *T. grandis*, Firmino Junior et al. (2009) observaram que aqueles desenvolvidos *in vitro* são mais arredondados do que os desenvolvidos *ex vitro*. Resultados semelhantes foram obtidos por Porspísilová et al. (1999), os quais descrevem que os estômatos *in vitro* são malformados, e mais arredondados. Os estômatos das plantas cultivadas *in vitro* estão relacionados significativamente com a capacidade de fotossíntese e o processo de aclimatização (Porspísilová et al., 1999).

No ambiente do cultivo *in vitro*, a intensidade luminosa situa-se entre 40 a 50 $\mu\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-2}$ de Fluxo de Fótons Fotossintéticos, sendo muito inferior quando comparada com a intensidade luminosa da casa de vegetação. Geralmente, as folhas que desenvolvem sob alta intensidade de radiação luminosa, são menores e mais espessas do que aquelas que permanecem sob-baixa intensidade luminosa, sendo consideradas como folhas de sombra (Milaneze-Gutierrez, 2003).

A redução nas dimensões dos estômatos, o maior espessamento da cutícula e das células epidérmicas, e a maior espessura do parênquima paliçádico das folhas cultivadas *ex vitro* indicam plasticidade adaptativa de *T. grandis*, o que poderá permitir a aclimatização das plantas micropropagadas (Firmino Junior et al., 2009).

A radiação solar chega ao nível das plantas promovendo o aumento da temperatura das folhas, aumentando sua taxa transpiratória. À medida que a planta perde água por transpiração inicia-se a desidratação das células guardas, os estômatos fecham e a taxa fotossintética é reduzida, influenciando na taxa de sobrevivência e na aclimatização das plantas.

Os brotos desenvolvidos *in vitro* estão expostos a um microambiente único, organizado para gerar estresse mínimo, mas, com ótimas condições para a multiplicação (Hazarika, 2006). O modo heterotrófico de nutrição e a falta de mecanismos de controle de perda de água dessas plantas as tornam vulneráveis ao choque no transplante para a casa de vegetação (Lamhanedi et al., 2003).

Calvete (1998) relata que a transferência do cultivo *in vitro* para a aclimatização resulta em mudanças abruptas no ambiente e que isto poderá ter influência no crescimento das plântulas a serem aclimatizadas. Principalmente a umidade da atmosfera do ambiente de aclimatização deve ser aumentada, para que não ocorra a desidratação das plântulas.

Para evitar a desidratação das plântulas tem sido utilizado o sistema de nebulização, e sombreamento das plantas (Forte e Pereira, 2003). Quando a umidificação do ambiente de cultivo é aumentada e associada a temperaturas amenas, observou-se aumento na taxa de sobrevivência das plantas (Souza et al. 2009).

Segundo Pasqual et al. (2011), ocorrem mudanças na anatomia, morfologia e fisiologia das plantas influenciando assim, no crescimento, no desenvolvimento, na aclimatização e na sobrevivência das plantas micropropagadas.

De acordo com Pasqual et al. (2001), alguns ajustes devem se feitos com a finalidade de promover maior resistência das mudas micropropagadas ao estresse ambiental, tais como:

- Endurecimento *in vitro*, conseguido com a redução do potencial hídrico do meio de estabelecimento e redução da umidade no frasco de cultivo, favorecendo a pré-adaptação das plântulas na aclimatização;
- Schmidt (1994), trabalhando com microestacas de mamoeiro, promoveu a abertura das tampas dos frascos três dias antes de transferir as plântulas para casa de vegetação, objetivando a pré-aclimatização das mudas;
- A utilização de sistema de nebulização automática intermitente mantendo-se a umidade relativa da casa de vegetação em condições ótimas para a aclimatização e reduzindo a temperatura da planta, evitando transpiração excessiva da mesma;
- Redução ou eliminação da sacarose para estimular a fotossíntese, reduzir a contaminação das plântulas devido à presença do açúcar no meio nutritivo, tornando-a autotrófica, com objetivo de ajustes adaptativos para a aclimatização.

O objetivo deste trabalho foi testar o efeito de doses de cinetina na aclimatização de plântulas micropropagadas do tomateiro “Alambra”.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido entre os meses de fevereiro e junho de 2012 no laboratório de cultura de tecidos vegetais do Departamento de Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Estado do Espírito Santo, localizado na cidade de Alegre, estado do Espírito Santo, Brasil.

O experimento foi conduzido com plantas de tomateiro, cultivar “Alambra”. A obtenção dos explantes foi através de plantas de tomateiro produzidas *in vitro*. Ao meio de estabelecimento foram adicionadas as seguintes doses de citocinina: 0; 1; 10; 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para indução de ramificação e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ácido Naftaleno Acético (ANA), para indução de raízes. Para cada tratamento foi acrescido ao meio de indução 30 g L^{-1} de sacarose como fonte de carbono e 8 g L^{-1} de Ágar como agente gelificante. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH, antes da autoclavagem do material experimental.

Em câmara de fluxo laminar, segmentos apicais caulinares excisados das plântulas matrizes, foram inoculados em frascos de vidro de 293 mL de capacidade contendo 60 mL de meio de indução de ramificação e de enraizamento. Os frascos foram fechados com tampas de roscas biológicas e lacrados com filme PVC e o material experimental foi transferido e mantido em sala de crescimento, com fotoperíodo luminoso de 16 horas e irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de Fluxos de Fótons Fotossintéticos fornecidos por lâmpadas tipo luz do dia e temperatura controlada de $27 \pm 2^\circ \text{C}$, onde permaneceram por 21 dias em delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco doses de cinetina e cinco repetições em um total de 25 unidades amostral.

Após esse período as plântulas foram, retiradas dos frascos e seus sistemas radiculares foram lavados em água corrente para retirada do excesso de gel.

Em seguida, as plântulas foram transplantadas em recipientes de plástico de 300 mL de capacidade contendo substrato sólido para hortaliças da marca Basplant®. Após transplantes os recipientes foram cobertos com recipientes de plásticos transparentes previamente furados para permitir trocas gasosas, manter a umidade relativa do ambiente e evitar a desidratação das mudas. As plantas retornaram para a sala de crescimento do laboratório sob as mesmas condições de luminosidade e temperatura a que estavam anteriormente e permaneceram por três dias em sala de crescimento para pré-aclimatização.

Na etapa seguinte, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação coberta com filme plástico de $150 \mu\text{m}$ de espessura e sobre este uma tela sombrite permitindo sombreamento de 50% da radiação solar.

Em casa de vegetação as plântulas foram dispostas sobre uma bancada de 0,80 m de altura em delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições, em um total de vinte e cinco unidades amostrais.

A umidade do ambiente foi mantida através de um sistema de nebulização automática acionada quando a temperatura ambiente atingia 27°C e permaneceram nesse ambiente durante 18 dias. Após esse tempo as plantas foram transferidas para laboratório, onde foram determinadas: Taxa de sobrevivência das plantas, comprimento do caule, peso da massa fresca e seca da parte aérea e raízes, e volume de raízes.

Os dados obtidos foram submetidos à análises de variância e quando significativo as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se que não houve diferença significativa entre os dois primeiros tratamentos para a característica comprimento da parte aérea das plântulas, ou seja, a ausência de cinetina exógena no meio de cultura *in vitro* não influenciou no comprimento das plantas, em relação à dose de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina (Tabela 1). Segundo (Grattapaglia e Machado, 1998, Caldas et al., 1998), o principal objetivo das aplicações exógenas dos reguladores vegetais é de suprir possíveis deficiências endógenas nos explantes isolados da planta matriz, como também estimular respostas como multiplicação da parte aérea ou a formação de raízes adventícias.

Tabela 1. Características biométricas do tomateiro “Alambra”, em função de doses de cinetina acrescido de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético (ANA).

Cinetina ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Massa fresca da parte aérea (g)	Massa seca da parte aérea (g)	Massa fresca de raiz (g)	Massa seca de raiz (g)	Comp. da parte aérea (cm)	Volume de raiz (mL)
0	6,07ab	0,47b	2,46b	0,11b	17,20a	2,22b
1	8,22a	0,60a	4,14a	0,18a	17,30a	3,96a
10	5,44b	0,39b	2,74ab	0,12b	13,60b	2,20b
100	5,77b	0,41b	3,30b	0,13b	14,80ab	3,00b
1000	4,40b	0,29b	2,39b	0,09b	11,90b	2,00b

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

Vários tipos de explantes são utilizados na regeneração *in vitro* do tomateiro, sendo que segmentos apicais e nodais do caule são os preferidos na micropropagação clonal, por serem constituídos de células meristemáticas, pouco diferenciadas e com grande capacidade de divisão celular (Peres, 2002). Também pelo fato de possuírem determinadas concentrações endógenas de reguladores vegetais (Grattapaglia e Machado, 1998; Guerra e Nodari, 2006).

Provavelmente a presença de determinadas concentrações de citocinina (cinetina) e auxina (ANA) nos segmentos apicais do caule utilizados nessa pesquisa estavam presentes em concentrações ótimas para induzir o crescimento da parte aérea e das raízes do tomateiro, não necessitando de complementação exógena, visto que a presença de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina não diferiu estatisticamente do tratamento sem cinetina exógena ($0 \mu\text{g L}^{-1}$) em nível 5% de significância.

Torres (2008), verificou que explantes oriundos de segmentos apicais caulinares apresentaram melhores resultados para o tomateiro “Alambra”, em relação aos obtidos de segmento nodal, folhas cotiledonares inteiras e hipocótilos.

Trabalhos realizados por Fari (2001), Torres (2008), Harish et al. (2010) e Mohamed et al. (2010), utilizando dosagens acima de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de citocinina na organogênese somática indireta obtiveram maior indução de tecido caloso. Esses resultados estão de acordo com os encontrados nessa pesquisa.

À proporção que as doses exógenas de cinetina foram aumentadas para 10; 100; e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, verifica-se redução do comprimento da parte aérea da planta. Essas doses diferiram estatisticamente dos dois primeiros tratamentos (0 e $1 \mu\text{g L}^{-1}$). Segundo Borges et al. (2004), concentrações excessivas de citocinina promovem a formação de massa calosa na base do explante, podendo comprometer a proliferação de gemas axilares e afetar o enraizamento, comprometendo assim a taxa de sobrevivência e a aclimatização das plantas micropropagadas.

Tanto na ausência como na presença de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina exógena não houve diferença significativa entre os dois tratamentos em nível de 5% de probabilidade para a característica comprimento da parte aérea. Com relação à massa fresca da parte aérea das plantas, embora não tenha havido diferença significativa entre os dois primeiros tratamentos nota-se que a presença de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ promoveu maior desenvolvimento dessa característica em relação aos outros tratamentos. A aplicação exógena de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina apresentou melhor resultado para todas as características analisadas (Tabela 1). As doses de cinetina exógena de 10, 100 e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ não diferiram entre si estatisticamente em nível de 5% de significância, no entanto as doses de 10 e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ proporcionaram 100% da taxa de sobrevivência e aclimatização das plantas, enquanto $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ reduziu em 80% as mesmas.

De acordo com Pasqual (2001), quando as plântulas são cultivadas *in vitro*, com sistema radicular estabelecido, quando transferidas para o ambiente de aclimatização aumenta-se a taxa de sobrevivência e a aclimatização das mesmas.

A presença de cinetina associada a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ácido naftaleno acético, indutor de enraizamento, provavelmente pode ter estimulado o desenvolvimento do sistema radicular das plantas tanto em tamanho quanto em volume, promovendo maior capacidade de absorção de água e nutrientes para o seu crescimento.

A redução da taxa de sobrevivência e aclimatização das plantas na dose de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina pode ter explicação em função do não desenvolvimento do sistema radicular da planta, que nessa dose promoveu a formação de massa calosa. Mohamed et al., (2010) e Harish et al. (2010), trabalhando com diferentes variedades de tomateiro, verificaram que doses entre 1000 e $2000 \mu\text{g L}^{-1}$ de citocinina proporcionaram formação de calos em detrimento do desenvolvimento de caule e raízes.

Para a característica volume de raízes também houve diferença significativa entre os tratamentos com cinetina. Maior volume de raízes foi obtido também na dose de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina exógena em relação aos demais tratamentos (Tabela 1 e Figura 1).



Figura 1. Volume e desenvolvimento de massa fresca de raízes de plantas do tomateiro “Alambra” micropropagadas e aclimatizadas com doses de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina, acrescido de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético.

CONCLUSÕES

- A utilização de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, associada a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético, adicionadas ao meio MS, promoveu melhor aclimatização das plântulas de tomateiro “Alambra”;
- A utilização de cinetina proporciona taxas de sobrevivência de 100% das plântulas;
- A dose de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina promove redução de 80% na taxa de sobrevivência das mudas do tomateiro “Alambra”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bandeira, F.S. (2007) Aclimatização *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis*. *Revista Árvore*, 35(1):773-781.
- Calvete, E.O. (2002) Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. *Horticultura Brasileira*, 20(4):649-653.
- Campostrini, E.; Otoni, W.C. (1996) Aclimatização de muda: Aclimatização de muda abordagens recentes. *ABCTP Notícias*, CNPH/EMBRAPA, Brasília, (25): 1996.
- Diaz-Perez, J.C.; Sutter, E.G.; Shackel, K.A. (1995) Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. *Physiologia Plantarum*. 95(2):225-235.
- Hazakira, B.N. (2006) Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 108(1):105-120.
- Lamhanedi, M.; Chamberland, H.; Tremblay, F.M. (2003) Epidermal transpiration, ultrastructural characteristics and net photosynthesis of white spruce somatic

seedlings in response to in vitro acclimatization. *Physiologia Plantarum*, 118:554-561.

Milanese-Gutierrez, M.A.; Mello, J.C.P.; Delaport, E.R.H. (2003) Efeito da intensidade luminosa sobre a morfo-anatomia foliar de *Bouche fluminensis* (Vell.) Mold. (Verbenaceae) e sua importância no controle de qualidade da droga vegetal. *Revista Brasileira Farm.* 13(1):23-33.

Murashige, J.R.; Skoog, F.A. (1962) Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15:473-497.

Oliveira, F.R.; Campostrini, E. (2008). Trocas gasosas e eficiência fotoquímica potencial em mamoeiro do grupo "Formosa" cultivados em condições de campo. *Bragantia*, 67(4):815-822.

Pasqual, M. (2001) *Textos acadêmicos: Meios de cultura*. Lavras: FAEPE/UFLA, 127p.

Pasqual, M.; Soares, J.D.R.; Rodrigues, F.A.; Araujo A.G.; Santos R.R. (2011) Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. *Horticultura Brasileira*, 29: 324-329.

Pospílová, J.; Háisel, D.; Synkova, H.; Catski, J.; Wilhelmová, N.; Plzáková, S.; Procházková, D.; Sramek, F. (2000) Photosynthetic pigments and gas Exchange during *ex vitro* acclimation of tobacco plants as affected by CO₂ supply and abscisic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 61: 125-133.

Schackel, K.A.; Novello, V.; Sutter, E.G. (1990) Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 115(3):468-472.

Schmidt, E.R. (1994) *Enraizamento in vitro e ex vitro de ramos de mamoeiro (Carica papaya L.)*. Dissertação. (Mestrado em Fitotecnia) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 76p.

Souza, F.V.D.; Cabral, J.R.S.; Souza, E.H.; Ferreira, F.R.; Nepomuceno, O.S.; Silva, M.J. (2009) Evaluation of F1 hybrids between *Ananas comosus* var.

ananassoides and *Ananas comosus* var. *erectifolius*. *Acta Horticulturae*, 822:79-84.

Souza, F.V.D.; Costa, M.A.P.C.; Silva Neto, H.P. (2006) Aclimatização. *In*: Souza, A. da S.; Junhans, T.G. (Org.). *Introdução a micropropagação de plantas*. Cruz das Almas: EMBRAPA, 1:131-140.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Foram instalados três experimentos, na cidade de Alegre, estado do Espírito Santo, Brasil, com os objetivos de testar diferentes concentrações do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) para a produção de plantas matrizes do tomateiro, estabelecer as dosagens dos reguladores vegetais na sua micropropagação e na aclimatização das mudas micropropagadas do tomateiro híbrido “Alambra”.

O primeiro trabalho teve como objetivo testar diferentes concentrações do meio MS na produção de plantas matrizes desenvolvidas *in vitro*, do tomateiro híbrido “Alambra”. Sementes do tomateiro Alambra, foram desinfestadas e inoculadas em frascos de vidro contendo 40 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) nas concentrações: 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 MS. Após inoculação, os frascos foram transferidos para sala de crescimento em delineamento inteiramente casualizado (DIC) composto de cinco concentrações de meio MS e cinco repetições, em um total de 25 unidades amostrais, durante 21 dias.

No segundo experimento utilizaram-se as doses de: 0; 10; 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina para indução de ramificação, associada a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ácido naftaleno acético para indução de raízes, na organogênese somática direta do tomateiro híbrido “Alambra. Segmentos apicais do caule provenientes das plantas matrizes foram utilizados como explante, que após excisados foram inoculados em meio MS força total e em seguida transferidos para sala de crescimento sob condições controladas de temperatura, luminosidade e umidade relativa do ambiente de cultivo, onde permaneceram por 21 dias. Em seguida, as mudas

micropropagadas foram retiradas dos frascos e avaliadas quanto às características biométricas.

O terceiro experimento foi realizado com o objetivo de verificar a aclimatização das mudas micropropagadas e foi conduzido sob as mesmas condições do segundo experimento, com as seguintes dosagens de cinetina: 0; 1; 10; 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, com cinco repetições. Após 21 dias de permanência na câmara de crescimento, as plântulas micropropagadas foram retiradas dos frascos e transplantadas em vasos plásticos contendo 300 mL de substrato para hortaliças, em seguida foram transferidas para casa de vegetação, onde permaneceram vinte e um dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e as médias dos tratamentos analisadas pelo teste de Duncan, a 5% de significância.

Conclui-se que:

- Concentrações do meio MS força total proporciona aumento da massa fresca da parte aérea, massa fresca da raiz e massa fresca total promovendo plantas matrizes do tomateiro "Alambra" *in vitro* vigorosas e aptas para a produção de explantes;
- Na ausência e em concentrações inferiores a 0,50 MS induzem a formação de plantas matrizes pouco vigorosas e inaptas como doadoras de explantes;
- Cinetina associada a doses de auxina respondem negativamente na organogênese somática direta *in vitro* do tomateiro "Alambra";
- Na ausência dos reguladores vegetais houve maior desenvolvimento de todas as características estudadas;
- Dosagens de cinetina de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ associadas à aplicação de ácido naftaleno acético são efetivas para organogênese somática indireta;
- A melhor dose de cinetina adicionada ao meio de cultivo MS para aclimatização das plântulas de tomateiro "Alambra" é de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, associada a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético;
- A utilização de cinetina proporciona taxas de sobrevivência de 100% das plântulas;
- A dose de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cinetina promove redução de 80% na taxa de sobrevivência das mudas do tomateiro "Alambra".

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agriannual (2010) Tomate. *Anuário da Agricultura de Santa Catarina*. 75p.
- Almeida, A.A.F. (2011) Passion Flow hybrids and their use in ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. *Euphytica*, 166(3):307-315.
- Almeida, S.M.Z.; Soares, A.M.; Castro, E.M.; Vieira, C.V.; Galejo, E.B. (2005) Alterações morfológicas e alocação de biomassa em plantas jovens de espécies florestais sob diferentes condições de sombreamento. *Ciência Rural*, 35(1):62-68.
- APG III (2009) "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III," *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161: 105-121.
- Bandeira, F.S. (2007) Aclimatização *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis*. *Revista Árvore*, 35(1):773-781.
- Bandurski, R.S.; Cohen, J.D.; Slovin, J.P.; Reinecke, D.M. (1995) Auxin biosynthesis and metabolism. In: Davies, P. (ed.). *Plant hormones: Physiology, biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 39-65.

- Bhatia, P.; Ashwath, N.; Senaratna, T.; Midmore, D. (2004) Tissue Culture Studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78:1-21.
- Borges, N.S.S.; Benbadis, A.; Marco, C.A. (2005) Respostas morfogênicas de tomateiros cultivado *in vitro*. *Revista Ciência Agronômica*, 36(1):91-97.
- Boxus, P.; Quoirin, M.; Laine, J.M. (1974) Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. In: Reinert, J.; Bajaj, Y.P.S., eds. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture E*. Springer Verlag, 130-143.
- Caldas, L.S.; Haridasan, P.; Ferreira, M.E. (1998) Meios nutritivos. In: Torres, C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (1998). *Cultura de Tecidos Transformação Genética de Plantas*. Brasília, 1:87-32.
- Calvete, E.O. (2002) Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. *Horticultura Brasileira*, 20(4):649-653.
- Calvete, E.O.; Kampf, A.N.; Suzin, M. (2002) Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 20(2): 186-191.
- Campos, I.S.; Assunção, M.V. (1990). Efeito do cloreto de sódio na germinação e vigor de plântulas de arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 25(6): 837-843.
- Campostrini, E.; Otoni, W.C. (1996) *Aclimatização de plantas: abordagens recentes*. Boletim da ABCTP. Brasília-DF, (25): 2-12.
- Carry, A. (2001) Arabidopsis mutants with increased organ regeneration in tissue cultures are more competent to respond to hormonal signals. *Planta*, Germany. 213(5):700-707.
- Cavalcante, M.B.; Perez, S.C.J.G. de A. (1995). Efeitos dos estresses hídrico e salino sobre a germinação de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 30(2):281-289.
- Chaudhry, Z.; Darima, H.; Hamid, R.; Sharif, A. (2004) Regeneration from various explants of *in vitro* seedling of tomato (*Lycopersicon esculentum* L., cv. Roma). *Pak. J. Biol. Sci*, 7:269-272.

- Costa, F.H.S.; Pereira, J.E.S.; Pasqual, M.; Castro, E.M.; Santos, A.M. (2009) Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. *Ciência Rural*, 39(3):742-748.
- Costa, M.G.; Nogueira, F.T.S.; Otoni, W.C.; Brommonschenkel, S.H. (2000) Regeneração *in vitro* de cultivares de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) industrial IPA-5 e IPA-6. *Ciências e Agrotecnologia*, Lavras, 4(3):671-678.
- Coutinho, O.L.; Rego, M.M.; Rego, E.R. Kitamura, M.C. Marques, L.F. Farias Filho, L.P. (2011) Desenvolvimento de protocolo para microenxertia do tomateiro *Lycopersicon esculentum* Mill. *Acta Scientiarum. Agronomy*, Maringá, 32(1): 87-92.
- Deberg, P.C.; Read, P.E. (1991) Micropropagation. In: Debergh, P.C.; Zimmermann, R.H. (eds.). *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 3-13.
- Diaz-Perez, J.C.; Sutter, E.G.; Shackel, K.A. (1995) Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. *Physiologia Plantarum*. 95(2):225-235.
- Erig, A.C.; Schhutz. M.W. (2005) Micropropagação autotrófica e uso da luz natural. *Ciência Rural*, 35-4.
- Fanti, S.C.; Perez, S.C.J.G.A. (1996). Efeitos de estresses hídrico e salino na germinação de *Bauhinia forficata* Link. *Revista Ceres*, Viçosa, 43(249):654-662.
- Faostat. (2011) *Agricultural statistics database*. Home: World Agricultural Information Center. Disponível em: <http://apps.fao.org>. Acesso em: 20/04/2012.
- Fari, M.; Resende. G.R de; Mello, N.F. (2000) Avaliação da capacidade de regeneração *in vitro* em tomateiro industrial. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 35(8):1523-1529.
- Ferreira, S.M.R. (2004) Características de qualidade do tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivado nos sistemas convencional e orgânico terceirizado na região metropolitana de Curitiba. 249p. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Paraná.

- Filgueira, F.A.R. (1981). *Manual de olericultura*. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 338p.
- Firmino Junior, P.C.; Poeta, P.C.; Everson. J. (2009) Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.) a partir de genótipos estabelecidos da Amazônia Sul-Occidental. *Scientia Florestalis*, 37(84):427-436.
- Fontes, P.C.R.; Silva, D.J.H. (2002) *Produção de tomate de mesa*. Aprenda Fácil, Viçosa.
- Fortes, G.R.L.; Pereira, J.E.S. (2003) Batata-semente Pré-básica: Cultura e Tecidos. In: Pereira, A.S.; Daniels, J. (Eds.). *O cultivo da batata na região sul do Brasil*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, 421-433.
- Freire, A.L.O.; Rodrigues, T.J.D.; Souza Filho, G. M. (2001). Efeitos da salinidade do substrato na germinação de sementes de algarobeira (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA. *Anais...* João Pessoa: Sociedade Botânica do Brasil, 47p.
- Frettet, J.J.; Pill, W.G.; Morneau, D.C. (1991) A comparison of priming agents for tomato and asparagus seeds. *HortScience*, 26(9):1158-1159.
- George, E.F.; Sherrington, P.D. (1984) Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories. Eversley: Exegetics.
- González, R.R.; Quintín, M.D.; Expósito, L.A.; González, J.L.; Martínez, T.; Hidalgo, M. (1977) Effectiveness of eight strains of azotobacter on the adaptation of tissue cultured plantlets of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.), CV 'Smooth Cayenne'. *Acta Horticulturae*, (425): 277-284.
- Grattapaglia, D.; Machado, M.A. (1998) Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI\Embrapa CNPH, 1:183-260.
- Gualberto, R.; Braz, L.T.; Banzato, D.A. (2002). Produtividade, adaptabilidade e estabilidade fenotípica de cultivares de tomateiro sob diferentes condições de ambiente. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Embrapa, 37(1):81-88.
- Guerra, M.P.; Nodari, R. O. *Material didático de apoio à disciplina 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 Outubro. 2012.

- Harish, M.C.; Rajeevkumar, S.; Sathishkumar, R. (2010) Efficient *in vitro* callus induction and regeneration of different tomato cultivars of India. *Asian Journal of Biotechnology*, 2(3):178-184.
- Hartmann, H.T.; Kerster, D.E. (1975) *Plant propagation, principles and practices*. 3.ed., New Jersey Prentice-Hall. 662p.
- Hazakira, B.N. (2006). Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 108(1):105-120.
- IBGE/LSPA. (2011) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. *Pesquisa mensal de acompanhamento das safras agrícolas no ano civil*, Rio de Janeiro, 11 (24):1-82.
- Jabeen, N.; Chaudhry, Z.; Rashid, H.; Mirza, B. (2005) Effect of genotype and explants type on *in vitro* shoots regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Pak. J. Bot*, 37: 899-903.
- Jo, E.; Tewari, E.R.K.; Hahn, E.E.; Paek, E.K. (2009) *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96:307-315.
- Kiernan, J.M.; Hendrix, J.W.; Stoltz, L.P.; Maronek, D.M. (1984) Characterization of strawberry plants produced by tissue culture and infected with specific mycorrhizal fungi. *HortScience* 19(6): 883-885
- Lambers, H.; Chapin III, F.S.; Pons, T.L. (1998) *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag, Berlin. 540p.
- Lamhanedi, M.; Chamberland, H.; Tremblay, F.M. (2003) Epidermal transpiration, ultrastructural characteristics and net photosynthesis of white spruce somatic seedlings in response to *in vitro* acclimatization. *Physiologia Plantarum*, 118:554-561.
- Larkins, B.A.; Vasil, I.K. (2000) Cellular and molecular biology of plant seed development. In: Kaminer, M. *Biologia Plantarum*, 43(2):238.

- Lirdhist, P.C. (2006). Introducing the cell concept by both animal and plant cells: a historical and didactic approach. *Science & Education*, 35 (5.): 423-440.
- Lopes, J.C.; Peixoto, C.M. (2008). Germinação de sementes de couve chinesa sob influência do teor de água, substrato. *Revista Brasileira de Sementes*, 30 (3):79-85.
- Maas, E.V.; Hoffman, G.J. (1977) Crop salt tolerance: current assessment. *Journal of Irrigation and Drainage Division*, 103(2):115-134.
- Marenco, R.A.; Lopes, N.F. (2009) *Fisiologia Vegetal: Fotossíntese, respiração, relações hídricas, nutrição mineral*, 3 ed., UFV, Viçosa, 486p.
- Marschner, H. (1955) *Mineral nutrition of higher plants*. 2.ed. San Diego: Academic Press. 889p.
- Mccormick, S. (1981) Plant Tissue Culture Manual. Transformation of tomato with *Agro bacterium tumefaciens*. NEW York. Kluwer, 1-9.
- Milanese-Gutierrez, M.A.; Mello, J.C.P.; Delaport, E.R.H. (2003) Efeito da intensidade luminosa sobre a morfo-anatomia foliar de *Bouche fluminensis* (Vell.) Mold. (Verbenaceae) e sua importância no controle de qualidade da droga vegetal. *Revista Brasileira Farm.*, 13(1):23-33.
- Minami, R.; Haag, H. P. O tomateiro. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, (1989).
- Minamo, L.N.; Macharia, C.M.; Wassilwa, L.A. (2010) Micropropagation a used tool for rapid multiplication of oil palm (*Elaeis guionensis*) hybrids in Kenya. In: KAR I BIENAL SCIENTIFIC CONFERENCE, Kenya. Anais, Kenya.
- Mohamed, A.A.N.; Ismail, M.R.; Rahman, M.H. (2010) *In vitro* response from cotyledon and hypocotyls explants in tomato by inducing 6-benzylaminopurine. *African Journal of Biotechnology*, 9(30):4802-4807.
- Moreira, M.A. (2001) *Produção e aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro Ananas comosus (L) Merril cv. Pérola*. Tese de doutorado apresentada a Universidade federal de Lavras. MG. 81p.
- Murashige, J.R.; Skoog, F.A. (1962) Revised medium for rapid growth and bioassay swith tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15:473-497.

- Murashige, T. (1974) Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 25:135-66.
- Murashige, T. (1977) Clonal crops through tissue culture. In: Barz, W.; Reinhard, D.E.; Zenk, M.H. (eds). *Tissue Culture and its bio-technological application*. p. 392-403. Springer-Verlag. Berlin.
- Oliveira F.R.; Campostrini. E. (2008) Trocas gasosas e eficiência fotoquímica potencial em mamoeiro do grupo "Formosa" cultivados em condições de campo. *Bragantia*, 67 (4):815-822.
- Pasqual, M. (2001) Textos acadêmicos: Meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA. 127p.
- Pasqual, M.; Soares, J.D.R.; Rodrigues, F.A.; Araujo A.G.; Santos R.R. (2011) Influência da qualidade de luz e silício no crescimento *in vitro* de orquídeas nativas e híbridas. *Horticultura Brasileira*, 29:324-329.
- Peralta, I.; Knapp, S.; Spooner, D.M. (2005) New species of wild tomatoes (*Solanum lycopersicon*: Solanaceae) from northern Peru, *Syst. Bot.* 30:424-434.
- Peralta, I.; Spooner. D.M. (2001) GBSSI gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*) *American Journal of Botany*, 88:1888-1902.
- Peres L.E.P.; Morgante, P.G.; Vicchi, C.; Kraus, J.E.; van Sluys, M.A. (2001) Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species. *Plant Cell Tissue and Culture*, 65:37-44.
- Peres, L.E.P. (2002) Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. *Biotecnologia e Desenvolvimento*, Brasília, (25):44-48.
- Peres, L.E.P.; Morgante, P.G.; Vicchi, J.E.; Van, S.M.F. (2001). Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of different tomato cultivars and wild related species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 65(1):37-44.
- Perez, S.C.J.G.; Moraes, J.A.P.V. (1994) Estresse salino no processo germinativo de algarobeira e atenuação de seus efeitos pelo uso de reguladores de crescimento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, 29(3):389-396.

- Pospsilová, J.; Háisel, D.; Synkova, H.; Catski, J.; Wilhelmová, N.; Plzáková, S. Prochárkopvá, D.; Sramek, F. (2000) Photosynthetic pigments and gas Exchange during *ex vitro* acclimation of tobacco plants as affected by CO² supply and abscisic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 61: 125-133.
- Schackel, K.A.; Novello, V.; Sutter, E.G. (1990) Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 5(3):468-472.
- Schmildt, E.R. (1994) *Enraizamento in vitro e ex vitro de ramos de mamoeiro (Carica papaya L.)*. Dissertação. (Mestrado em Fitotecnia) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 76p.
- Schmildt, O. (2010) *Cultivo in vitro e estaquia dos mamoeiros 'Golden' e 'UENF/CALIMAN 01'*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)-Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 116p
- Sheeja, T.E.; Mandal, A.B. (2003) *In vitro* flowering and fruiting in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 11(1):37-42.
- Sheeja, T.E.; Mandal, A.B.; Rathore, R.K.S. (2004) Efficient Plantlet Regeneration in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Tissue Culture*, 14(1):45-53.
- Síntese (2011). *Manual de Agricultura de Santa Catarina*. Sc.
- Souza, F.V.D.; Cabral, J.R.S; Souza, E.H.; Ferreira, F.R.; Nepomuceno, O.S.; Silva, M.J. (2009) Evaluation of F1 hybrids between *Ananas comosus* var. ananassoides and *Ananas comosus* var. erectifolius. *Acta Horticulturae*, 822:79-84.
- Souza, F.V.D.; Costa, M.A.P.C.; Silva Neto, H.P. (2006) Aclimatização. In: Souza, A. da S.; Junhans, T.G. (Org.). *Introdução a micropropagação de plantas*. Cruz das Almas: EMBRAPA, 1:131-140.
- Souza, G.F.M.V.; Luz, J.M.Q.; Arruda, A.S.; Santana, D.G.; Teixeira, M.S.S.C.; Londe, L.; Silva, A.S.; Figueira, E.R. (2006) Capacidade de regeneração *in vitro*

- de tomateiro cultivar Santa Clara. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, Lavras, 2(2):88-93.
- Sutter, E.G.; Novello, V.; Shackel, K. (1988) Physiological and anatomical aspects of water stress of cultured plants. *Acta Horticulturae*, Wageningen, (230):113-119.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2009) *Fisiologia Vegetal*. 5ª .ed. São Paulo. Artmed. 848p.
- Tavares, C.A.M. (2003) Ataque dos vírus. (2003) *Cultivar: Frutas e Hortaliças*, Pelotas, (20):26-28,
- Taveira, J.A.M. (2010) Novas tecnologias na aclimatização, formação e manejo de mudas. In: Gerald, L.T.S. (Org.) *Biofábrica de plantas: Produção industrial de plantas in vitro*. Antiqua, São Paulo. 246-269.
- Thorpe, T.A. (1980) Organogenesis in vitro: structural, physiological, and biochemical aspects. In: Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. Vasil, I.K. (ed.). 71-111. Academic Press. New York.
- Torres, A.C.; Teixeira, S.L.; Pozzer, L. (1998) 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, 133-145.
- Torres, F.J.B. (2008) *Organogênese in vitro do tomateiro Longa Vida híbrido "Alambra"*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal. Alegre. ES. Universidade Federal do Estado do Espírito Santo. UFES. 50p.
- Torres, S.B. (2007) Germinação e desenvolvimento de plântulas de melancia em função da salinidade. *Revista Brasileira de Sementes*, 29(3):68-72.
- Torres, S.B.; Vieira, E.L.; Marcos-Filho, J. (2000) Salinidade na germinação e no desenvolvimento de plântulas de pepino. *Revista Brasileira de Sementes*, 22(2):34-49.
- Zimmerman, R.H. (1988) Micropropagation of woody plants: post tissue culture aspects. *Acta Horticulturae*, Wageningen, 120:217-222.