

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

**CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE TOMATEIRO
CULTIVAR SANTA CLARA**

GLAUCIA DE FATIMA MOREIRA VIEIRA E SOUZA

ANA MARIA BONETTI
(Orientadora)

Monografia apresentada ao Curso de
Agronomia, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de
Engenheira Agrônoma.

Uberlândia – MG
Julho – 2003

**CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE TOMATEIRO
CULTIVAR SANTA CLARA**

APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA EM 25 / 07 / 2003

Prof.^a Dr.^a Ana Maria Bonetti
(Orientadora)

MSc. Alcione da Silva Arruda
(Co-orientadora)

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz
(Membro da Banca)

Dr. Cícero Donizete Pereira
(Membro da Banca)

Uberlândia – MG
Julho – 2003

AGRADECIMENTOS

A todos os meus amigos e colegas.

A todos os meus familiares, em especial: meus pais Aparecida de Fátima Moreira Vieira e José Inácio Vieira pelo apoio e confiança, meu marido Eduardo Lúcio Matos e Souza pelo amor, apoio, confiança, dedicação, por tudo, minha filha Gabriela e os meus irmãos Jardel, Gabriel e Flávia.

A Orientadora Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Bonetti, que permitiu meu trabalho no laboratório
A Co-orientadora MSc. Alcione da Silva Arruda, que me abriu as portas do laboratório, me incentivou, apoiou, aconselhou e socorreu nas horas necessárias.

Ao Instituto de Genética e Bioquímica.

Ao Instituto de Ciências Agrárias e Curso de Agronomia pela minha formação acadêmica

Aos colaboradores diretos:

Prof.: José Magno Queiroz Luz, que me aceitou como bolsista além de me socorrer nas horas das dúvidas e angústias.

Prof^ª.: Denise Garcia Santana, que me auxiliou no momento que precisei, além de me auxiliar na vida, como pessoa.

Ao Dr. Cícero Donizete Pereira, que auxiliou quando preciso.

As estagiárias do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, que foram mais que isso, foram verdadeiras amigas:

Mariana da Costa Teixeira;

Luciana Londe;

Adelaide S. Silva;

Elisângela R. Figueira.

ÍNDICE

RESUMO.....	04
1. INTRODUÇÃO.....	05
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	07
2.1 A Cultura do Tomate.....	07
2.2 O Uso da Cultura de Tecidos no Melhoramento.....	12
2.2.1 Micropropagação.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Fase Laboratorial.....	17
3.1.1 Fonte de explantes.....	17
3.1.2 Tipos de explante	19
3.1.3 Repicagens	19
3.1.4 Meios de Cultura.....	19
3.1.5 Enraizamento	20
3.1.6 Características avaliadas	20
3.1.7 Análise estatística	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5. CONCLUSÕES.....	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

RESUMO

A cultivar de tomateiro Santa Clara foi avaliada quanto seu potencial de regeneração *in vitro*, a partir de três tipos de explantes e três meios de cultura seguida de três repicagens. Os explantes foram: cotilédone decapitado, cotilédone fendido e cotilédone aparado nas extremidades. Os meios de cultura foram: MI: macro e micronutrientes do MS (100%), vitaminas B5 de Gamborg *et al.*(1968), suplementado com 30 g/L de sacarose e de 8 g/L de ágar, pH 5,8; MII: meio MI suplementado com 1 mg/L de BAP, e 30 g/L de glicose; MIII: meio MI suplementado com 2,5 mg/L de BAP e 0,2 mg/L de AIA. Para as repicagens foi utilizado o meio MI suplementado com 0,5 mg/L, 0,8 mg/L e 1,0 mg/L de BAP para a primeira, segunda e terceira repicagens, respectivamente. Para o enraizamento foi usado o meio MI suplementado com 0,5 mg/L de AIA. As plântulas enraizadas foram transferidas para substrato comercial Plantimax esterilizado e aclimatadas em laboratório. A maior indução de regeneração tanto de calos quanto de brotos foi observada nos métodos cotilédone fendido e cotilédone aparado quando colocados no meio MIII, no entanto a

indução de regeneração foi mais rápida quando usado cotilédone decapitado indicando um alto potencial de organogênese espontânea, onde o meio MI foi o melhor. O número de brotos alongados aumentou já na primeira repicagem. Os resultados obtidos com as diferentes concentrações de BAP nos três ciclos de repicagem não diferiram entre si. 82% das plantas enraizadas aclimataram-se com sucesso.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum*, melhoramento do tomateiro, cultura de tecidos.

1. INTRODUÇÃO

O tomate, dentre as hortaliças mais cultivadas no Brasil, é a mais importante, considerando-se os aspectos sócio-econômicos. O Brasil é o 8º maior produtor mundial e o 11º em termos de produtividade (Silva & Giordano, 2000).

A tomaticultura está associada a sérios problemas fitossanitários, sobretudo viroses, além do ataque de fungos, bactérias e insetos praga. Cria-se, com isto, a necessidade de se pesquisar novas alternativas ou obtenção de novos genótipos com resistência múltipla a doenças e pragas; entre essas , os estudos sobre regeneração e transformação genética (Fári *et al.*, 2000).

A engenharia genética abriu uma nova perspectiva para o melhoramento genético do tomateiro a partir do final da década de 80 (Wijbrandi & Both, 1993, citados por Fári *et al.* 2000) visando aumentar a produtividade e melhorar a qualidade por meio da obtenção de resistência a estresses bióticos e abióticos. A cultura de tecidos destaca-se durante o processo de realização das técnicas de transformação genética, pois é necessário induzir gemas vegetativas e, em seguida, regenerar brotos alongados e plantas completas a

partir de células ou tecidos geneticamente modificados.

A cultura de tecidos é um meio de desenvolver células ou tecidos vegetais sob condições controladas. Pode ser definida como a cultura de células vegetais isoladas, de um grupo de células, tecidos ou órgãos em ambiente artificial, sob condições assépticas. Nesse ambiente, as células, tecidos e órgãos se multiplicam e continuam a crescer de modo não organizado ou se regeneram numa planta inteira. Costuma-se empregar, associada com a cultura de tecidos, a expressão "in vitro", que significa "crescimento fora do corpo vivo, em ambiente artificial". A cultura de tecidos vegetais é, sem dúvida, uma grande instrumento de trabalho, podendo ser utilizada como técnica auxiliar ao melhoramento genético convencional, capaz de ampliar a variabilidade genética, reduzir o tempo para lançamento de novas cultivares, introduzir genes de interesse agrônômico, entre outras. Atualmente, esta técnica vem sendo amplamente utilizada como uma "ferramenta" biotecnológica para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades desejáveis, tais como resistência a pragas e acúmulo de substâncias ativas de interesse comercial (Silva, André Luis Coelho da).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de regeneração *in vitro* da cultivar Santa Clara, do grupo Santa Cruz, , a partir de diferentes tipos de explantes e meios de cultura, criando e otimizando protocolos para sua regeneração *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Cultura do Tomate

A utilização do tomateiro como de interesse agrícola é relativamente recente, remontando 1800. No mundo ocidental civilizado o tomate ocupa um lugar proeminente entre as hortaliças cultivadas, sendo considerada aquela de produção e utilização mais universal. No Brasil, foi introduzido por imigrantes europeus no final do século XIX (Anderlini, 1982).

A olericultura brasileira é uma das mais importantes no mundo, e o tomate tem um destaque todo especial, pois é de introdução recente e o seu crescimento, tanto em área quanto em produtividade, foi bastante regular. O tomate é um alimento altamente nutritivo e sadio, sendo fonte de diversas vitaminas e sais minerais, apresentando excelente palatabilidade. O baixo valor energético torna-o recomendável àqueles em dieta ou que precisam de um alimento de fácil digestão.

Dentro da olericultura o tomate pode ser classificado de duas formas, pela parte utilizada na alimentação humana e a comercialização e pelo parentesco botânico. Na primeira classificação o tomate está dentro de hortaliças-fruto e pelo parentesco

botânico ele está dentro da família *Solanacea* ao lado da batatinha, do fumo, do pimentão e da beringela. Pertence ao gênero *Lycopersicon* e a espécie cultivada, cosmopolita, é botanicamente denominada de *Lycopersicon esculentum* (Filgueira, 2000).

A flor do tomateiro é hermafrodita e a polinização ocorre por autofecundação. O tomateiro cultivado é uma planta herbácea, de caule redondo, piloso e macio quando a planta é nova, tornando-se anguloso e fibroso, quando a planta está desenvolvida, embora é flexível e incapaz de suportar o peso os frutos e manter-se na posição vertical. A forma natural lembra uma moita, com abundante ramificação lateral, sendo profundamente modificada pela poda. As flores em cachos, em geral do tipo simples (não ramificada), são pequenas e amarelas; o cálice possui 5 sépalas; o número de estames é de 5, as anteras curtas e largas; o fruto é carnoso, com 2 ou mais lóculos; as sementes são reniformes, pequenas, com pêlos bem curtos; os frutos podem ser vermelhos, amarelos ou cor-de-rosa, dependendo da variedade (Camargo, 1984). Embora sendo planta perene, a cultura é anual; da sementeira até a produção de novas sementes, o ciclo varia de quatro a sete meses, incluindo se de um a três meses de colheita. A floração e a frutificação ocorrem juntamente com o período vegetativo (Filgueira, 2000).

O tomateiro não tolera frio e nem calor excessivo. Em certas regiões podem ser cultivados quase o ano todo; em outras, devido às limitações da temperatura (geadas ou altas temperaturas), só parte do ano. A temperatura do solo, também, é muito importante por influenciar o crescimento das raízes. Temperaturas inferiores a 11°C prejudicam o sistema radicular, podendo ocasionar morte da planta, o mesmo ocorrendo para temperaturas muito elevadas (Minami & Haag, 1980). Quanto ao pH

os solos com melhores condições para essa cultura são os de reação neutra ou ligeiramente ácida (pH 5,8 – 7,0) (Filgueira, 1987). Numerosos outros fatores climáticos influenciam a tomaticultura, sendo a pluviosidade certamente o mais decisivo, em nossas condições. Chuvas prolongadas e excessivas prejudicam muito o desenvolvimento do tomateiro e a sua produtividade. Além dos efeitos diretos do excesso de água junto às raízes, há os indiretos, pois são favorecidas as doenças fúngicas e bacterianas que destroem a parte aérea da planta e reduzem a produção. Também a elevada umidade no ar favorece muitos patógenos. Há outros fenômenos climáticos negativos à tomaticultura assim, o granizo é altamente destrutivo e também as geadas que a tomateiro não é capaz de tolerar (Filgueira, 1982).

De acordo com Filgueira, (2000), a planta apresenta dois hábitos de crescimento distintos, que condicionam o tipo de cultura, assim, o hábito indeterminado é aquele que acontece na maioria das cultivares apropriadas para produção de frutos para mesa, que são tutoradas e podadas, com caule atingindo mais de 2,5 m de altura. O crescimento vegetativo da planta é vigoroso e contínuo, juntamente com a produção de flores e frutos. O hábito determinado ocorre nas cultivares criadas especialmente para a cultura rasteira, com finalidade agroindustrial. O tomate é produzido e consumido em numerosos países, *in natura* ou industrializado. A maior parte da colheita nacional destina-se à mesa; porém a produção destinada às agroindústrias vem crescendo, especialmente na região dos cerrados (Silva & Giordano, 2000).

No centro-sul, o tomateiro é propagado por meio da utilização de sementes. A semente é o veículo de transmissão das características genéticas de uma cultivar, tais como: produtividade, tipo de fruto, resistência a patógenos e adaptação a condições desfavoráveis

entre outras. No caso particular do tomateiro, também é veículo eficiente de diversos patógenos, tais como: a bactéria do cancro, o vírus do mosaico do fumo e o fungo da septoriose. Então, entende-se por boa semente aquela que, além de apresentar um potencial genético superior, também tem um elevado grau de sanidade (Filgueira, 1982).

A cultura do tomate pode ser implantada por cinco métodos: semeadura direta, semeadura em sementeira, semeadura e repicagem, semeadura em copinho e semeadura em bandeja. As mudas devem ser transplantadas para o plantio tão logo atinjam o ponto ideal de desenvolvimento; é preferível plantar mudas mais novas, que são mais adaptáveis às condições de campo.

A planta do tomate é indiferente ao fotoperiodismo. No centro-sul tem sido praticada a tomaticultura tutorada ao longo do ano, com melhores resultados em altitudes superiores a 800 m. Em regiões baixas e quentes, a época propícia se restringe aos meses de clima mais ameno, no outono-inverno. Também a cultura rasteira é semeada nesses meses, independente da altitude, já que a ocorrência de chuva durante a maturação prejudica a qualidade da matéria prima (Filgueira, 2000). Segundo o mesmo autor, a cultura comercial do tomateiro é altamente exigente quanto à fertilidade do solo, mais especificamente em relação ao teor de nutrientes, obviamente devido à elevada capacidade produtiva. Como a maioria dos solos do centro-sul não apresentam níveis de fertilidade requeridos, a prática da adubação é de vital importância. O tomateiro é adaptável em diversos tipos de solo; em várias regiões produtoras constata-se que melhores resultados são obtidos em solos de textura média, de preferência de alta fertilidade (ou adequadamente corrigidos e adubados). Um bom teor de matéria orgânica também é desejável, já que assegura boas propriedades físicas ao solo.

As cultivares atualmente plantadas podem ser didaticamente reunidas em cinco grupos: grupo Santa Cruz, grupo Salada, grupo Cereja, grupo Italiano, grupo Agroindustrial.

No presente trabalho foi utilizada uma cultivar do grupo Santa Cruz, sendo ela a cultivar Santa Clara. A cultivar Santa Cruz originou-se de um cruzamento natural entre as cultivares Rei Umberto e Chacareiro (Redondo Japonês), ocorrido em Suzano-SP, entre 1935 e 1940, sendo selecionada por um tomaticultor. Em 1940, implantou-se uma nova colônia de olericultores japoneses em Santa Cruz-RJ e houve a introdução dessa cultivar, que passou a ser conhecida pelo nome da localidade. Desde meados da década de 40, esse tipo de tomate vem dominando a produção e o mercado de frutos para mesa e novas cultivares similares vem sendo lançadas (Filgueira, 2000).

De acordo com o autor, as razões do sucesso desse tomate é a notável resistência ao manuseio rude, à embalagem na tradicional caixa “K”, ao transporte pouco cuidadoso, bem como a sua elevada produtividade, obtida por meio de adubações, pulverizações e tratamentos culturais intensivos e excessivos, freqüentemente. A presença de 2 ou 3 lóculos e a compacidade são as características mais marcantes, o que explica a resistência dos frutos. A planta é de hábito de crescimento “indeterminado” e a haste principal ultrapassa 2 m de altura em cultivares tutoradas e podadas, conduzidas no campo. O tomate Santa Cruz primitivo não é mais plantado, tendo sido substituído por novas cultivares. Inclusive alguns híbridos, com características mais favoráveis, como a cultivar **Santa Clara**, criada em Campinas-SP, domina o mercado e da qual há algumas seleções diferenciadas. Ao longo da década de 90, houve a introdução de híbridos com a característica “longa vida” (característica que permite que os tomates sejam colhidos maduros e se conservem à

temperatura ambiente), sendo bons exemplos: Débora Max, Bruna FV e Ataque. Além de frutos maiores e de melhor qualidade, as novas cultivares apresentam resistência a algumas doenças como, murcha fusariana, murcha verticilar e pinta-de-estenfílio, inclusive certas viroses, em algumas dessas cultivares (Filgueira, 2000).

2.2. O Uso da Cultura de Tecidos no Melhoramento

Nos programas de melhoramento do tomateiro, os principais aspectos estudados são: o aumento da produção, a resistência a pragas e doenças e a melhoria da qualidade dos frutos (Júnior *et al.*, 2001). Variedades de tomate melhoradas podem ser obtidas também pelos métodos tradicionais de melhoramento. Porém, até o momento, não foi possível transferir o gene de plantas silvestres para a cultura sem que houvesse também a transferência de inúmeros caracteres indesejáveis. A engenharia genética tem sido usada como ferramenta auxiliar no melhoramento de espécies vegetais, por oferecer elevada precisão na transferência de um ou mais genes, oriundos da própria ou de outra espécie, sem que haja perda das características desejáveis da espécie transformada, obtendo-se assim o somatório de caracteres desejáveis (Binsfeld, 2000, modificado).

A engenharia genética é uma área fundamental para o conhecimento e para o desenvolvimento de animais e plantas. A aplicação dos princípios genéticos na obtenção de plantas com desempenho agrícola superior tem sido sistematicamente utilizada. Entretanto com os diversos métodos, verificou-se um progresso considerável com técnicas de cultivo *in vitro* de células e tecidos de plantas. As técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas. Em geral, essas técnicas são utilizadas em uma ou outra etapa do melhoramento,

não necessariamente no desenvolvimento direto de novas cultivares. Elas podem oferecer novas alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases e, muitas vezes, oferecem soluções únicas, por exemplo, com o emprego da cultura de embriões visando introgressão gênica por meio de cruzamentos entre indivíduos de espécies distantes; da mesma forma, a incorporação de genes via transformação genética, depende da cultura de células, tecidos ou órgãos para regeneração de plantas *in vitro*. Assim, as contribuições das técnicas da cultura de tecidos e células nos programas de melhoramento pode se dar em maior ou menor escala, de acordo com os objetivos do melhoramento e com as características biológicas da espécie alvo.

Em relação à cultura do tomate a regeneração de plantas foi estabelecida há, aproximadamente, 20 anos (Kut *et al.*, 1984; Sink & Reynolds, 1986, citados por Fári *et al.*, 2000) e métodos de regeneração têm sido citados por diversos autores (Tan, 1987; McCormick, 1991; REDENBAUGH *et al.*; Wijbrandi & Both, 1993; Asakura *et al.*; 1995; Fári *et al.*; 1995a; Rhim *et al.*; 1995, citados por Fári *et al.*). Em geral, o tomate representa um bom exemplo para a utilização das técnicas de regeneração *in vitro*; a partir do ano de 1995 foram publicados diversos métodos sobre transformação genética na cultura do tomate. O tomateiro é uma das primeiras espécies que já tiveram suas cultivares transgênicas comercializadas, principalmente no mercado americano (Redenbaugh *et al.*, 1992, citado por Fári *et al.*, 2000).

No Brasil, há poucos trabalhos na área de regeneração *in vitro* e de transformação genética de cultivares de tomateiro e pouco se conhece sobre a capacidade de regeneração das principais cultivares brasileiras (Fári *et al.*, 2000).

2.2.1 Micropropagação

A técnica que foi utilizada no presente experimento é a micropropagação vegetativa, assim denominada por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e a de maior impacto. A primeira aplicação comercial da micropropagação foi feita por Morel (1960), citado por Torres *et al.* (1998), ao multiplicar orquídeas mediante a cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos, diminutas estruturas que se diferenciavam e davam origem a embriões. A sucessiva divisão desses protocormos acelera a propagação de orquídeas (Torres *et al.*, 1998).

Segundo os mesmos autores, a utilização da micropropagação em âmbito comercial já é realidade em diversos países do mundo, com destaque para os da Europa Ocidental e os Estados Unidos. Essa atividade comercial, hoje, se concentra principalmente na limpeza clonal e na multiplicação de espécies ornamentais e arbustivas. O Brasil, onde a micropropagação é relativamente recente, conta com diversos grupos trabalhando em instituições públicas de pesquisas e universidades, entretanto poucas são as empresas que atuam na área.

Na década de setenta, quando a micropropagação ganhou grande impulso, (Murashigue, 1974, citado por Torres *et al.*, 1998) apresentou o conceito de estágios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*. Esse esquema, padrão para sistemas de micropropagação, divide-se em:

Estágio I : seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas;

Estágio II : multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação;

Estágio III : transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para substrato ou solo.

Esse esquema permite alterações conforme as peculiaridades da cada espécie. Pode ser necessária, como foi utilizado no presente experimento, uma fase adicional de alongamento das partes aéreas, antes do enraizamento.

Conforme o explante utilizado e sua subsequente manipulação, a micropropagação pode ser conduzida por uma destas três maneiras:

- 1) multiplicação por meio da proliferação de gemas axilares;
- 2) multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta (passando pela fase de calo);
- 3) multiplicação via embriogênese somática.

Todos esses caminhos apresentam vantagens e problemas do ponto de vista do potencial de multiplicação e da fidelidade genética do material propagado (Torres *et al.*, 1998). No experimento conduzido, a micropropagação ocorreu por meio da organogênese direta e indireta. A organogênese indireta acontece quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo. A partir de células não-organizadas do calo, surgem gemas adventícias que crescem e se desenvolvem em novas partes aéreas. As multiplicações sucessivas podem dar-se pela divisão do calo e manutenção de um sistema adventício ou pela alteração do processo para proliferação axilar. Seja qual for a maneira, as partes aéreas produzidas são individualizadas, enraizadas e transplantadas (Torres *et al.*, 1998).

A micropropagação é a metodologia que mais tem se difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas. Deve-se ter sempre claro que a micropropagação

mantém a identidade genética do genótipo propagado, não introduzindo nenhuma variabilidade genética.

Sem dúvida, a grande aplicação prática das técnicas de micropropagação tem-se concentrado na produção comercial de plantas, possibilitando sua multiplicação rápida e em períodos e espaço físico reduzidos. Não só para plantas que normalmente se reproduzem vegetativamente, como também para outras espécies onde esse tipo de reprodução é difícil, a micropropagação tem sido usada com sucesso.

3. MATERIAL E MÉTODOS

No Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, foi avaliada a capacidade de regeneração *in vitro* do tomateiro, cultivar Santa Clara, usando três tipos de explantes e três meios de cultura, seguido de três repicagens. O experimento foi realizado em delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial (3x3) com três repetições. As plantas regeneradas foram enraizadas e aclimatadas em laboratório.

3.1 FASE LABORATORIAL

3.1.1 Fonte de explantes

Sementes comerciais das cultivar Santa Clara, cedidas pelo Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz, após serem desinfetadas por um minuto em álcool etílico a 96% e em hipoclorito de sódio comercial a 20% (v/v) com duas gotas de detergente comercial, durante 25 minutos, foram enxaguadas cinco vezes em água bidestilada esterilizada e inoculadas em meio MS 100% (Murashige & Skoog, 1962) (Tabela 1), solidificado com 7 gramas por litro de ágar, sem reguladores de crescimento. O meio foi distribuído em

recipientes de vidro estéreis utilizados para cultura de tecidos com 30 ml de meio MS. As sementes foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 2,0 lux ($2,0 \times 10^2$ cal.cm⁻².min⁻¹). As plântulas obtidas 14, 15 e 20 dias após a semeadura, foram usadas como fonte de explantes para os blocos 1, 2 e 3 respectivamente. Os explantes foram inoculados, de acordo com os métodos descritos a seguir, em placas de Petri devidamente esterilizadas e autoclavadas em número de 16 unidades por tipo de explante por meio de cultura utilizado. Cada 16 explantes constituiu uma parcela do experimento, sendo composta por duas placas de Petri, cada uma com 8 explantes.

TABELA 1. Composição do meio de cultura de Murashige & Skoog, (1962).

CONSTITUINTES	QUANTIDADE em mg/L
INORGÂNICOS	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ 2 H ₂ O	440
MgSO ₄ 7 H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ 4 H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,025
CoCl ₂ 6 H ₂ O	0,025
FeSO ₄ 7 H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA 2 H ₂ O	37,3
ORGÂNICOS	
INOSITOL	100
TIAMINA HCl	0,5
ÁCIDO NICOTÍNICO	0,1
PIRIDOXINA HCl	0,5
GLICINA	2,0
SACAROSE	30000
ÁGAR	8000

3.1.2 Tipos de explantes

A - que consistiu na decapitação de plântulas, realizado conforme o protocolo descrito por Fári *et al.* (1995 a), citado por Fári *et al.* (2000). A decapitação ocorreu diretamente abaixo do nó do cotilédone.

B - método de cotilédones fendidos, os cotilédones foram fendidos ao longo da nervura central, da extremidade até sua metade, de acordo com o protocolo de Fári *et al.* (2000).

C - onde os cotilédones foram aparados e seguiu o protocolo descrito por Redenbaugh *et al.* (1992), citado por Fári *et al.* (2000). Os cotilédones aparados nas extremidades distal e proximal (ápice e pecíolo), foram inoculados com a face abaxial em contato com o meio.

3.1.3 Repicagens

Foram realizadas três repicagens para alongar os brotos. Cerca de 30 dias após a inoculação dos explantes foi realizada a primeira repicagem. Os intervalos entre as repicagens foram em torno de 5 semanas.

3.1.4 Meios de Cultura

Os tratamentos consistiram na inoculação dos três tipos de explantes descritos nos três meios de cultura abaixo, com três repetições por tratamento.

Meio **MI**: macro e micronutrientes de Murashige & Skoog (1962), vitaminas B5 de Gamborg *et al.*(1968) (Tabela 2), suplementado com 30 g/L de sacarose e de 8 g/L de ágar-ágar, pH 5,8; meio **MII**: meio de cultura MI suplementado com 1 mg/L de zeatina, e 30 g/L

de glicose, conforme McCormick, (1991), citado por Fári *et al.*(2000); meio **MIII**: meio de cultura MI suplementado com 2,5 mg/L de BAP e 0,2 mg/L de AIA, segundo Rhim *et al.* (1995), citado por Fári *et al.* (2000).

TABELA 2. Vitaminas B5 de Gamborg *et al.* (1968).

VITAMINAS	QUANTIDADE em mg/L
Ácido nicotínico	1
Tiamina . HCl	10
Piridoxina . HCl	1
m-Inositol	100

Para as repicagens foi utilizado o meio **MI** suplementado com 0,5 mg/L, 0,8 mg/L e 1,0 mg/L de BAP para a primeira, segunda e terceira repicagens, respectivamente.

Para enraizamento foi usado o meio **MI** suplementado com 0,5 mg/L de AIA. As plântulas enraizadas foram transferidas para substrato comercial Plantimax esterilizado e aclimatadas em laboratório.

3.1.5 Enraizamento

Os brotos com 2 cm de comprimento eram transferidos para o meio de enraizamento citado e permaneciam nesse meio durante 15 dias. Após esse período os brotos eram transplantados para substrato comercial Plantimax autoclavado, eram irrigadas com água de uma a duas vezes por dia até que se aclimassem.

3.1.6 Características avaliadas

Foram avaliados a indução de regeneração, o alongamento de brotos e o enraizamento e aclimação das plantas regeneradas.

3.1.7 Análise estatística

Os dados de contagem foram transformados segundo raiz ($x + 0,5$). As análises de normalidade e homogeneidade foram realizadas pelo software Prophet. Os dados estatísticos foram analisados pelo software SANEST (Zonta & Machado, 1989) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para cotilédone decapitado foi notado desenvolvimento celular por volta de 10 dias após inoculação e o surgimento de brotos ocorreu cerca de 12 dias depois da inoculação. A indução de regeneração foi mais rápida quando usado esse tipo de explante, indicando um alto potencial de organogênese espontânea, onde o meio MI foi o melhor para a indução e regeneração de brotos.

No cotilédone fendido o desenvolvimento celular foi notado cerca de 10 dias após inoculação, por volta de 18 dias depois da inoculação iniciou-se o surgimento de brotos e já existiam calos formados. Para esse tipo de explante nos meios MI e MII ocorreram apenas a formação de calos sem brotos em uma pequena frequência, enquanto no meio MIII ocorreu a formação de calos e calos com brotos, sendo a frequência de brotos alta, desse modo a utilização de cotilédones fendidos e cotilédones aparados produziram uma regeneração alta. Supõe-se que a maior superfície de corte tenha influência significativa sobre esse fenômeno, onde, a maior superfície de corte do cotilédone resulta em maior capacidade de regeneração.

No cotilédone aparado com cerca de 10 dias após inoculação foi notado

desenvolvimento celular, e 20 dias depois da inoculação ocorreu o surgimento de brotos e já existiam calos formados. Para esse tipo de explante nos meios MI, MII e MIII ocorreram a formações de calos, no entanto apenas no meio MIII ocorreu a formação de calos com brotos e em alta frequência (Tabela 1).

TABELA 1. Frequência de indução de regeneração *in vitro* da cultivar Santa Clara do grupo Santa Cruz. Uberlândia, UFU, 2001.

VARIÁVEIS	MEIOS	TIPOS DE EXPLANTES		
		Cotilédone decapitado (A)	Cotilédone fendido (B)	Cotilédone aparado (C)
Nº de explantes com calos	I	3,96 Aa	0,50 Ca	1,42 bA
	II	0,00 bB	6,32 bA	6,72 aA
	III	0,00 bB	15,99 aA	5,97 abB
Nº de explantes com brotos	I	10,95 aA	0,00 bB	0,00bB
	II	0,50 bA	0,00 bA	0,00 bA
	III	1,30 bB	12,17 aA	8,50 aA
Nº total de calos	I	3,96 aA	0,50 cA	1,69 bA
	II	0,00 bB	6,32 bA	6,45 bA
	III	0,00 bB	36,30 aA	26,55 aA
Nº total de brotos	I	18,50 aA	0,00 bB	0,00 bB
	II	0,50 bA	0,00 bA	0,00 bA
	III	1,30 bB	27,60 aA	29,34 aA
Nº de explantes*	I	48	32	40
	II	32	40	32
	III	24	40	48
Total de explantes		104	112	120

Dados seguidos de mesma letra nas colunas (a,b,c) e nas linhas (A,B) não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

*A diferença entre o nº de explantes de um método para outro é devida a parcelas (ou parte delas) perdidas.

Nos três ciclos de repicagens a capacidade de alongamento e enraizamento dos brotos foram aparentemente iguais, indicando que as concentrações de BAP não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 2).

TABELA 2. Capacidade de alongamento e enraizamento de brotos da cultivar Santa Clara, durante os três ciclos de repicagem. Uberlândia, UFU, 2001.

MÉTODOS	M1 + 0,5 mg/l BAP		M1 + 0,8 mg/l BAP		M1 + 1,0 mg/l BAP		M1+ 0,5 mg/l AIA	Nº total de plantas aclimatadas	Nº total geral de brotos
	REPICAGEM 1		REPICAGEM 2		REPICAGEM 3				
	Nº total de brotos	Nº de brotos alongados	Nº total de brotos	Nº de brotos alongados	Nº total de brotos	Nº de brotos alongados	Nº total de plântulas enraizadas		
A	31,17bA	8,99 aA	36,84 bA	8,66 aA	31,74 bA	8,1 Aa	80	67	181
B	53,6 Aa	4,66 bA	62,44 aA	6,33 aA	51,58 aA	4,50 bA	41	33	163
C	35,27bA	4,00 bA	43,68 bA	5,66 aA	39,28 bA	3,12 bA	43	35	205
TOTAL							164	135	549

Dados seguidos de mesma letra nas colunas (a,b) e nas linhas (A,B) não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As plantas após serem enraizadas, foram transferidas para aclimação, obtendo-se 82% de plantas aclimatadas. Cerca de 20 dias após transplante para o substrato as plantas já estavam aclimatadas.

Após a terceira repicagem ainda existiam cerca de 334 brotos para serem novamente repicados e 51 brotos prontos para serem enraizados, perfazendo um total geral de 549 brotos conseguidos até a fase estudada.

Para o tipo de explante cotilédone decapitado, foram conseguidos um total de 181 brotos, desse modo foram conseguidos 1,74 brotos por explante; para o explante cotilédone fendido o número de brotos por explante foi igual a 1,45 e para o cotilédone aparado, foram conseguidos 1,70 brotos por explante.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos conseguidos por Fári *et al.* (2000) onde concluiu que a utilização de cotilédones fendidos e cotilédones aparados produziram uma regeneração alta, onde a maior indução foi conseguida utilizando-se um meio igual ao MIII utilizado nesse experimento. A indução de regeneração também foi mais rápida quando usado cotilédone decapitado indicando um alto potencial de organogênese espontânea. Fári *et al.* (2000). A cultivar Santa Clara mostrou-se mais eficiente na formação de brotos alongados onde já na primeira repicagem foram obtidos brotos alongados enquanto que as cultivares utilizadas por Fári *et al.* (2000), IPA-5 e IPA-6, precisaram de duas repicagens para o alongamento dos brotos, no entanto a cultivar IPA-5 mostrou-se mais eficiente na produção de brotos por explante. Fári *et al.* (2000) utilizou zeatina durante os três ciclos de repicagem enquanto nesse experimento foi utilizado BAP.

Os resultados também foram semelhantes com os de Fári *et al.* (1995b), que trabalhando com transformação genética da berinjela (*Solanum melongena*) observaram

que a maior superfície de corte do cotilédone resulta em maior capacidade de regeneração.

A professora pesquisadora da Universidade de Passo Fundo MSc. Magali Ferrari Grando *et al.*, trabalhando com segmentos de caule da cultivar Santa Clara produzidos *in vitro* e cultivados em meio MS com BAP e ANA, chegaram também a uma alta formação de calos, no entanto apenas cerca da metade dos melhores calos regeneraram plantas quando cultivados em meio MS com BAP e ANA (projeto em andamento no Laboratório de Biotecnologia da UPF).

Borges, *et al.* (2002), trabalhando com cultivares híbridas de tomateiro, concluiu, em ensaio preliminar, que a zona responsável pela máxima produção de calos foi o hipocótilo, onde na cultivar Carmen o hipocótilo regenerou brotos.

5- CONCLUSÕES

A maior indução de regeneração tanto de calos quanto de brotos foi observada nos métodos cotilédone fendido e cotilédone aparado quando colocados no meio com BAP (2,5 mg/L) e AIA (0,2 mg/L)(MIII). A maior regeneração de brotos alongados ocorreu com o método cotilédone decapitado, no entanto o maior número de regeneração de brotos totais ocorreu no método cotilédone fendido. Para o tipo de explante cotilédone decapitado foram conseguidos um total de 181 brotos, desse modo foram conseguidos 1,74 brotos por explante; para o explante cotilédone fendido o número de brotos por explante foi igual a 1,45 e para o cotilédone aparado foram conseguidos 1,70 brotos por explante.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERLINI, Roberto. **A cultura do tomate**. 2.ed. Portugal: Biblioteca Agrícola Litexa, 1982. 164p.
2. BINSFELD, Pedro Canisio. Análise Diagnóstica de um Produto Transgênico - O Caso do Tomate Flavr Savr. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Ano 2, Número 12 - Janeiro/Fevereiro 2000.
3. BORGES, N.S.S.; MARCO, C.A.; LACERDA, A.S.; CORDEIRO, E.R.; BENBADIS, A.K. Avaliação do potencial morfogênético de vários tipos de explantes em três cultivares de tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v.20,n.2, julho 2002. Suplemento.
4. CAMARGO, Leocádio de Souza. **As hortaliças e seu cultivo**. 2.ed. São Paulo: Fundação Cargill, 1984. 448p.
5. FÁRI, M.; NAGY, I.; CSÁNY, M.; MITYKÓ, J.; ANDRÁSFALVY, A. *Agrobacterium* mediated genetic transformation and plant regeneration via

- organogenesis and somatic embryogenesis from cotyledon leaves in eggplant (*Solanum melongena* cv. Kecskeméti lila). **Plant Cell Reports, Berlin**, v.15, n.1, p.82-86, 1995b.
6. FÁRI, M.; RESENDE, G. M.; MELO, N. F. Avaliação da capacidade de regeneração *in vitro* em tomateiro industrial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.8, p.1523-1529, ago. 2000.
 7. FILGUEIRA, Fernando Antônio Reis. **Manual de Olericultura: cultura e comercialização de hortaliças**. 2.ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1982. v.2. 357p.
 8. FILGUEIRA, Fernando Antônio Reis. **ABC da Olericultura: Guia da pequena horta**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1987. 164p.
 9. FILGUEIRA, Fernando Antônio Reis. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2000. 402p.
 10. GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, San Diego, v.50, n.1, p.151 – 158, 1968.
 11. GRANDO, Magali Ferrari; CALVETE, E. O.; AUGUSTIN, L. Laboratório de Biotecnologia Vegetal. Projetos de Pesquisa. **Indução de Variação Somaclonal em Tomate**. <[http:// upf.tche.br/~winckler/tomate.html](http://upf.tche.br/~winckler/tomate.html) > 30 agosto 2003.
 12. JÚNIOR, V. C. A.; MALUF, W. R.; AZEVEDO, S. M.; GOMES, L. A. A.; FARIA,

M. V. Avaliação do Potencial Agronômico e da Firmeza Pós-Colheita de Frutos em Híbridos de Tomateiro. **Ciência Agrotécnica.**, Lavras, v.25, n.3, p.489-502, maio/jun., 2001.

13. MINAMI, K.; HAAG, H. P. **O Tomateiro**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1980. 397p.
14. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.5, p.473 – 497, 1962.
15. SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B. **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa, 2000. 168p.
16. SILVA, André Luiz Coelho da Silva. **Cultura de Tecidos de Plantas**. < <http://geocities.yahoo.com.br/alccoelho/calogenese.html>> 30 agosto 2003.
17. TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa, 1999. v.1. 509p.
18. ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST – Sistema de análise estatística**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1989.