

Título do Trabalho: Micropropagação *in vitro* do tomate (*Lycopersicon Esculentum* L.) utilizando gema apical.

Autor (es): Carla Cíntia Paranhos Silva, Edio Vicente de Jesus, João Paulo Lemos, Alisson Jose Eufrásio de Carvalho e Guilherme Augusto Rodrigues de Souza.

Palavras-chave: Desenvolvimento; Micropropagação; Planta-matriz; 6-benzilaminopurina.

Campus: São João Evangelista – MG.

Área do Conhecimento (CNPq): Agronomia/Fitotecnia/Produção de mudas.

RESUMO

Diante da importância da cultura do tomate no Brasil e da necessidade contínua de agregar maior eficiência ao seu sistema produtivo, objetivou-se micropropagar plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) utilizando gema apical. Em uma primeira etapa foi realizada a produção de plantas matrizes *in vitro* livres de patógenos visando a retirada de explantes da gema apical para realização da etapa de multiplicação. Na etapa de multiplicação, os explantes retirados das plantas-matrizes foram inoculados em meio MS Força total, com diferentes concentrações de BAP. Utilizou-se o Delineamento experimental Inteiramente Casualizado (DIC) com seis tratamentos (T1 0,0; T2 1,0; T3 2,0; T4 3,0, T5 4,0 e T6 5,0 mg.L⁻¹ de BAP), cinco repetições e 10 amostras por repetição, formando um rol amostral com 300 plantas. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do IFMG - Campus São João Evangelista e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade no programa estatístico SISVAR. Houve diferenças significativas entre as dosagens utilizadas para os parâmetros medidos: comprimento de caule, comprimento de raiz, número de folhas e número de brotações. Para o comprimento de caule, os tratamentos 3, 4 e 5 apresentaram os melhores resultados, não diferindo estatisticamente entre si, porém o T4 apresentou-se superior. Para o comprimento de raiz, os tratamentos 4 e 5 foram superiores e não diferindo entre si. Para o número de brotações, o tratamento 4 foi superior aos demais tratamentos. Para o número de folhas, os tratamentos 3, 4, 5 e 6 foram superiores e diferiram entre si, porém o tratamento 4 apresentou-se superior aos demais. Diante dos resultados observados, conclui-se que a produção da planta matriz de *Lycopersicum esculentum* L. para a excisão de explantes foram satisfatórias e que a utilização de 6 - benzilaminopurina (BAP) promove aumento na taxa de multiplicação da cultura na concentração de 3,0 mg L⁻¹ de BAP, porém considera-se que nas etapas de alongamento e enraizamento não houve o desenvolvimento esperado, demonstrando assim a inviabilidade da produção de tomate pelos protocolos utilizados no processo de micropropagação deste trabalho.

INTRODUÇÃO

O tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) é produzido e consumido em numerosos países, tanto na forma natural quanto industrializado. De acordo com os dados de Dossa e Fuchs (2017), a área brasileira no cultivo de tomate na safra 2015 foi 59,8 mil hectares, 7% menor que a de 2014. Mas para isso, a produção de mudas é uma das etapas mais importantes da implantação de uma cultura, pois sua qualidade influencia diretamente no desempenho final da planta no campo, na qualidade nutricional e no tempo do ciclo de vida da cultura (BRAUN, 2010). A produção de mudas do tomateiro geralmente é semínifera, o que favorece a dispersão e infestação de pragas e doenças, e que reduz a produtividade e a qualidade dos frutos. Assim sendo, faz-se necessário buscar alternativas de produção de mudas de maior produtividade, de melhor qualidade e conseqüentemente, de menor custo (SOUZA et al., 2009). As técnicas de cultura de tecidos têm apresentado vantagens em relação ao método convencional, como, por exemplo, a produção de mudas livres de fitopatógenos (SILVA et al., 2007).

As auxinas, citocininas e giberelinas são os reguladores vegetais mais utilizados em micropropagação *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998). Segundo Torres (2013), as auxinas em doses muito baixas, estimulam o alongamento celular e, induzem o crescimento e desenvolvimento das raízes, já as citocininas provocam a multiplicação celular e propicia a formação de ramos. Além de serem essenciais à citocinese, promovem mudanças na taxa metabólica, atividade enzimática, indução e formação de órgãos, quebra de dominância apical, mobilização de nutrientes orgânicos e inorgânicos e aumento da longevidade de tecidos e órgãos (SOARES, 2011).

Dentre as auxinas mais utilizadas, estão o ácido 3-indolacético (AIA) e o ácido naftaleno acético (ANA) (ERIG, 2004). Porém, para a micropropagação de tomate, segundo resultados obtidos por Torres (2013), o ANA apresenta maior estabilidade à temperatura de autoclavagem quando comparado com o AIA. De acordo com Soares (2011) as citocininas comercialmente disponíveis, a 6-benzilaminopurina (BAP) é a que, em geral, tem apresentado melhores resultados *in vitro* na promoção da multiplicação de diversas espécies, sendo utilizada em aproximadamente 60% dos meios de cultivo.

A propagação vegetativa *in vitro* é dividida em cinco etapas, que resumidamente se divide da seguinte forma: seleção e cultivo da planta matriz; estabelecimento da cultura isento de agentes contaminantes; fase da multiplicação, no qual deve ocorrer a divisão e a diferenciação celular; alongamento dos ramos e iniciação radicular e a última fase que se caracteriza pela aclimatização (TORRES, 2008).

O cultivo *in vitro* é feito com o uso do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sendo uma das primeiras formulações melhoradas e usadas em cultura de tecidos de plantas, que é constituído de macro e microelementos essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plântulas. À ele, são adicionados sais orgânicos, vitaminas, fonte de carbono e hormônios vegetais (TORRES, 2013).

A partir do exposto, de que, a produção seminífera favorece a dispersão e infestação de pragas e doenças, e que reduz a produtividade e a qualidade dos frutos, além do elevado custo na aquisição de sementes, objetivou-se avaliar os aspectos morfológicos na micropropagação *in vitro* do tomateiro sob diferentes dosagens do hormônio 6-benzilaminopurina (BAP) utilizando explantes oriundo da gema apical, bem como estabelecer um protocolo para a produção de mudas micropropagadas.

METODOLOGIA:

O projeto foi dividido em 5 fases, dentre elas estão: a preparativa, estabelecimento, multiplicação, alongamento e enraizamento. Utilizou-se a espécie de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) tipo salada. Com bases nas condições de cultivo do experimento, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado - DIC, com seis tratamentos e cinco repetições e cada repetição formada por dez amostras. O experimento foi conduzido em duplicata, e após a coleta dos dados, estes foram computados e descritos com base em testes estatísticos qualitativos e quantitativos.

Na fase de preparação, iniciou-se com o processo de aquisição de materiais e insumos para o desenvolvimento completo do trabalho. Após a aquisição dos insumos, conduziu-se a fase preparativa, iniciando pelo processo de assepsia das sementes para a produção das plantas matrizes, onde o objetivo era eliminar possíveis contaminações, de forma a controlar a infestação de parasitas e ou patógenos, desde

o processo de inoculação das sementes, até a produção da planta mãe de onde foram coletados os explantes.

Para a produção de mudas de *L. esculentum* L. *in vitro*, necessitou-se a realização de um teste de germinação em Meio MS, segundo o protocolo de Murashige e Skoog, com diferentes concentrações de hormônio, chamados de força total (100%), meio MS 75%, meio MS 50%, meio MS 25% e meio MS 0% de força. Foram preparados os meios individualizados, sendo 5 tratamentos respectivamente, com 6 repetições e 5 amostras por repetição. Todos os frascos foram devidamente lavados e ao adicionar o meio, autoclavados durante um tempo de 20 minutos a uma temperatura de 120 °C. Durante o processo de resfriamento, estes foram retirados e agitados, afim de torna-los homogêneos, devido à presença do antioxidante até a solidificação total e resfriamento. Utilizou-se sementes certificadas de *L. esculentum* L. híbridas, Serato F1, da Top Seed Premium, pertencente ao grupo salada. As sementes passaram pelo processo de assepsia em câmara de fluxo laminar, iniciando o processo de desinfestação. Realizou-se a desinfecção da câmara de fluxo e desinfestação das sementes com álcool etílico 70% (v/v) durante 30 segundos, em seguida, com hipoclorito de sódio a 2% (v/v) durante 10 minutos. Após a desinfestação, essas sementes foram lavadas três vezes com água destilada, deionizada e esterilizada, em seguida foram inoculadas 150 sementes, nos meios específicos e alocados em tubos de ensaio com capacidade de 150 mL de líquido, estes continham 20 mL de meio MS com aditivos de anti-oxidantes (carvão ativado) afim de aperfeiçoar o meio e viabilizar o desenvolvimento do processo germinativo. Após este processo deu-se início a inoculação na câmara de fluxo, onde os frascos foram devidamente fechados com papel alumínio e conduzidos a sala de crescimento. Foram avaliados diariamente, durante um período de 21 dias após a inoculação.

Para a obtenção das plantas matrizes, foram utilizados a melhor concentração de meio MS testado no processo do germinativo descrito anteriormente. Assim, seguiu-se o mesmo protocolo de Murashige e Skoog, (1962), distribuindo 20 mL o meio de cultura em tubos de ensaio, sem tampa, em vidro neutro temperado com comprimento de 150mm, tamanho superior aos tubos do teste germinativo. Isso, devido ao tamanho que as plântulas deviam alcançar para a retirada dos explantes. Estes foram fechados com papel alumínio e autoclavados. Foram inoculadas 300 sementes, seguindo o mesmo processo de desinfestação utilizado no teste germinativo.

A cultura foi mantida em sala de crescimento, com temperatura controlada de 25 °C ± 2 °C, dispondo de intensidade luminosa de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de Fluxos de Fótons Fotossintéticos, fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia, e fotoperíodo de 16 horas de luz, até atingir o tamanho ideal.

Transcorridos 45 dias após a inoculação das sementes para a produção das plantas matrizes, iniciou-se a fase de estabelecimento, com a coleta de explantes das mesmas. A coleta dos explantes foi realizada nas plantas matrizes que obtiveram melhor desenvolvimento vegetativo alcançando um tamanho superior a 10cm, pois a produção de brotos novos e vigorosos proporcionam menor risco de contaminação e potencializam uma maior resposta ao cultivo *in vitro*, no qual a planta permanecerá com o balanço hormonal elevado nos tecidos novos, favorecendo assim, a multiplicação celular.

Em sequência, na fase de isolamento e cultivo dos explantes, os segmentos apicais foram coletados da planta-matriz com o auxílio de pinças, placas esterilizadas, lâminas de bisturis e bisturis, conduzidos à câmara de fluxo para obtenção de explantes com um tamanho de cinco centímetros (5cm) de comprimento.

Estes foram desinfestados superficialmente com fungicida Tween 20 e submetidos à técnica de excisão, promovendo sucessivas reduções dos explantes até atingirem um tamanho de 3 a 5 mm, considerado o tamanho ideal para o novo processo de indução à brotação.

A fase de multiplicação ocorreu com o aumento do número de propágulos vegetativos, obtendo uma elevada quantidade de gemas, possuindo qualidade e homogeneidade para alongamento e enraizamento. Após o estabelecimento da cultura, as plântulas foram subcultivadas duas vezes e recultivadas uma vez nas mesmas condições de luminosidade, fotoperíodo e temperatura. Posteriormente as estruturas dos explantes foram inoculadas em frasco de vidro de 250 ml, contendo 40 mL de meio MS - Força Total e com diferentes dosagens de hormônio 6-Benzilaminopurina (BAP) constituindo-se T1 0,0; T2 1,0; T3 2,0; T4 3,0, T5 4,0 e T6 5,0 mg.L⁻¹. Foram utilizados 300 frascos caracterizando o rol amostral. A manipulação dos explantes foi feita de forma a evitar a desidratação e contaminação dos mesmos. Em seguida, foram transferidos para a sala de crescimento. Após findar 53 dias da data de inoculação dos explantes, cessou o processo de propagação, onde as gemas apresentaram-se dormentes.

Nas fases de alongamento e enraizamento, as brotações foram individualizadas e transferidas para um meio novo, na qual constitui-se do meio MS suplementado, com doses de 0,01 mg.L⁻¹ da auxina ANA (Ácido Naftaleno Acético) e 1 mg.L⁻¹ de Cinetina de forma que puderam alongar e enraizar. Para a individualização dessas brotações retirou-se o excesso de tecido oxidado, quando houve. Os explantes que foram transferidos apresentaram brotações de 2 cm a 3 cm de altura de parte aérea. As condições da sala de crescimento foram as mesmas das fases anteriores. As mudas ficaram nessa fase durante um período 36 dias, quando as mudas atingiram um número de 4 a 6 folhas definitivas, tornando-as aptas para serem levadas para a aclimatização e posteriormente levadas para o campo. Ao final da fase de multiplicação, analisou-se o comprimento de caule e raiz, número de brotações e número de folhas.

Os dados foram analisados por meio de análise de variância, quando necessário foi feita análise através de regressão e as médias comparadas utilizando o teste de Tukey, adotando-se o nível de 5% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Conforme apresentado na Tabela 1, o Tratamento 1 (0,00 mg.L⁻¹ de BAP) apresentou o menor desenvolvimento de caule, com uma média de 5,4 mm, diferenciando-se dos demais tratamentos. Os tratamentos 2 e 6 (T2=1,0 e T6= T6 5,0 mg.L⁻¹), não diferenciaram-se estatisticamente, porém a média do T6 apresentou-se superior ao T2. Os tratamentos 3, 4 e 5 (3,0; 4,0 e 5,0 mg.L⁻¹, respectivamente), apresentaram os melhores resultados para o comprimento de caule, não diferindo entre si. Porém, observou-se que o tratamento 4 (4,0 mg.L⁻¹) apresentou uma média superior aos demais (51,8 mm).

TABELA 1: Efeito das concentrações de BAP sobre o comprimento das brotações de explantes de Tomate.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	5.412000	a
2	28.932800	b
6	35.763600	b
5	45.722600	c
3	49.093800	c
4	51.804400	c

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

No parâmetro de comprimento de raiz (tabela 2), o tratamento 01 (sem adição de BAP) apresentou uma menor média. Os tratamentos 2 e 6 não diferenciaram entre si, com o tratamento 6 apresentando uma maior média, quando comparado ao 2. Os tratamentos 3 e 5 também não se diferenciaram e comparando os tratamentos 4 e 5 estão também não se diferenciaram, porém apresentaram-se superiores ao T3.

Macêdo et al. 2003, testando diferentes dosagens de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro *L. Merrill (Ananas comosus)*, concluíram que a dosagem de 0,50 mg. L⁻¹ de BAP acrescidas de 0,25 mg. L⁻¹ de ANA proporcionaram uma maior taxa média no crescimento das raízes. Villa et al. (2010), ao testar diferentes dosagens de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta, obtiveram um maior comprimento de raiz nas dosagens compreendidas entre 0,5-2,0 mg. L⁻¹ adicionadas ao meio MS. Dosagens superiores a 2,0 mg. L⁻¹ tiveram como consequência uma diminuição no número e comprimento de raízes. Isso também pode ser explicado pela toxicidade do excesso deste fitohormônio. É possível que a concentração mais alta da citocinina tenha inibido a formação de raízes, assim como ocorreu no Tratamento 5 desta pesquisa, no qual a dosagem de 5 mg L⁻¹ ocasionou uma redução no comprimento das raízes.

TABELA 2: Efeito das concentrações de BAP, sobre o comprimento (mm) das raízes, de explantes de Tomate.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	6.022880	a
2	18.991800	b
6	19.058600	b
3	25.570200	c
5	28.550540	c d
4	32.234600	d

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

As doses de BAP fornecidas promoveram, de modo geral, um aumento na indução de brotações em *L. esculentum* L, cultivadas após 53 dias da data de inoculação dos explantes. O tratamento 4 correspondente a 3,0 mg L⁻¹, proporcionou o maior número de brotações, tendo alcançado 10.74 brotos em média por tratamento.

TABELA 3 - Efeito das concentrações de BAP, sobre o número de brotações por explantes de Tomate.

Tratamento	Médias	Resultados do teste
1	1.600000	a
2	4.240000	b
6	7.300000	c
5	7.860000	c d
3	9.080000	d
4	10.740000	e

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

Verificou-se que o tratamento 4 (concentração 3,0 mg.L⁻¹ de BAP) representado pela Tabela 3, foi o que promoveu o maior média de brotações, diferindo significativamente de todos os outros cinco tratamentos (T1 0,0; T2 1,0; T3 2,0; T5 4,0 e T6 5,0 mg.L⁻¹). Observou-se, ainda, que as maiores concentrações (4,0 e 5,0 mg.L⁻¹) exerceram efeito antagônico sobre o percentual de explantes com brotações. Provavelmente, estes níveis exógenos de BAP, interagindo com o nível endógeno (representados pelo T1, onde houve ausência de aplicação do fito hormônio) de citocinina, causaram efeito

fitotóxico no T5 e T6, o que evidencia que as concentrações mais elevadas dessa citocinina foram inibitórias para o processo de multiplicação. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Pasqual & Ando (1989a), no cultivo *in vitro* de gemas axilares de plântulas de *Poncirus trifoliata*, onde elevadas concentrações de BAP promoveram redução no percentual de explantes com brotações, sendo que a concentração ótima de BAP foi de 1 mg.L⁻¹, que é inferior à obtida neste trabalho (3,0 mg.L⁻¹). Isto deve-se, provavelmente, ao potencial morfogênico inerente a cada variedade.

Maior número de folhas foi observado no tratamento 4 cuja dosagem foi de 3,0 mg L⁻¹ de BAP, representados na tabela 4. Embora não diferiu dos tratamentos (T3 2,0; T5 4,0 e T6 5,0 mg.L⁻¹), houve maior ganho de folhas por explante (4.66 folhas), representada pela tabela 8, tendo maior média entre as dosagens testadas, e mesmo não diferindo estatisticamente, é o mais viável dentre os tratamentos.

TABELA 4 - Efeito das concentrações de BAP, sobre o número de folhas por explantes de *L. esculentum* L. sob diferentes dosagens de BAP

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	0.900000	a
2	2.640000	b
5	3.760000	c
6	3.880000	c
3	4.400000	c
4	4.660000	c

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

Com o aumento dos níveis de BAP, pode-se constatar também que houve decréscimo no número de folhas. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira (1994), trabalhando com crisântemo, que observou queda no número de folhas com aumento das concentrações de BAP. Isso pode ser atribuído ao fato de o regulador de crescimento BAP estimular a formação de maior número de brotos, porém, de tamanho reduzido, apresentando menor número de segmentos nodais e folhas.

Com relação às etapas de alongamento e enraizamento, após as brotações terem sido transferidas para um meio novo, constituindo-se do meio MS suplementado, com doses de 0,01 mg.L⁻¹ da auxina ANA (Ácido Naftaleno Acético) e 1 mg.L⁻¹ de Cinetina. Foram conduzidas nas mesmas condições da sala de crescimento das fases anteriores, por um período de 36 dias apresentando 4 a 6 folhas definitivas. Portanto, não houve o desenvolvimento esperado pela pesquisa, como consequência de sucessivas contaminações e formação de calos, demonstrando assim a inviabilidade da produção de tomate pelo processo avaliado neste trabalho de micropropagação.

CONCLUSÕES:

Pelos resultados obtidos no experimento pode-se concluir que a produção da planta matriz de *Lycopersicon esculentum* L. para a excisão de explantes foram satisfatórias.

A utilização de 6 - benzilaminopurina (BAP) promove aumento na taxa de multiplicação da cultura na concentração de 3,0 mg L⁻¹ de BAP.

Contudo, para a produção em larga escala, não é viável a micropropagação do tomate devido ao baixo índice de brotação e sucessivos índices de contaminação na fase final do experimento

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BRAUN, H. **Produção de Mudanças de Tomateiro por estaquia: Efeito do Substrato e comprimento de estacas.** *Idesia* [online]. 2010, vol.28, n.1.

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.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W., **Enraizamento *in vitro* de marmeleiro cv. MC como porta-enxerto para a pereira e aclimatização das microestacas enraizadas.** *Cienc. Rural* [online]. 2004, vol.34, n.5, pp. 1443-1449. ISSN 1678-4596.

FUCHS, Felipe; Dossa, Derli. **Tomate: Análise Técnico-econômica e os principais indicadores da produção nos mercados mundial, brasileiro e Paranaense.** Boletim Técnico 03. TOMATE: Agosto de 2017.

MACEDO, CRISTIANE ELIZABETH COSTA DE et al. **Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*.** *Rev. Bras. Frutic.* [Online]. 2003, vol.25, n.3, pp.501-504.

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

OLIVEIRA, P. D. **Propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzlev.) cv. Orange Reagen.** 1994. 116 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1994.

PASQUAL, M.; ANDO, A. Micropropagação de 'Trifoliata' através da cultura de gemas axilares *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** Brasília, v. 24, n. 2, p. 217-220, 1989a.

SOARES, F P., **Tax.a de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes.** *Ciênc. agrotec.* [online]. 2011, vol.35, n.1, pp. 152-157. ISSN 1413-7054.

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.

TORRES, F. J. B. **Micropropagação e aclimatização do tomateiro híbrido "Alambra" / Francisco José Brandão Torres.** – 2013. 60 f. : il.

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.14p.