

REGENERAÇÃO *IN VITRO* DO TOMATEIRO 'ALAMBRA' F₁

TORRES, Francisco José Brandão¹

SCHMILDT, Omar²

SCHMILDT, Edilson Romais²

GONTIJO, Andreia Barcelos Passos Lima²

OLIVEIRA, Vinicius de Souza²

COELHO, Ruimário Inácio¹

AMARAL, José Augusto Teixeira do¹

Recebido em: 2020.01.12

Aprovado em: 2020.06.24

ISSUE DOI: 10.3738/1982.2278.3735

RESUMO: Objetivou-se com este trabalho estudar a regeneração *in vitro* do tomateiro 'Alambra' F₁ usando como explantes segmentos apicais, segmentos nodais, hipocótilos e folhas cotiledonares inteiras. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio em meio de estabelecimento MS e recultivados duas vezes para mesmo tipo de meio e então recultivados para meio de indução e regeneração, contendo meio MS acrescido de 1 mg L⁻¹ de cinetina. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e oito repetições. Após 30 dias procedeu-se as avaliações e brotos com 1,5 cm oriundos de explantes segmento apical e nodal foram individualizados e transferidos para meio MS acrescentando-se 1,0 mg L⁻¹ de ANA para rizogênese, onde permaneceram, também, por 30 dias. A utilização dos explantes segmentos apicais, via organogênese direta apresenta melhores respostas para a regeneração morfológica na formação de plântulas de tomate 'Alambra' F₁.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum*. Micropropagação. Organogênese.

IN VITRO REGENERATION OF TOMATO 'ALAMBRA' F₁

SUMMARY: The objective of this work was to study the *in vitro* regeneration of tomato 'Alambra' F₁ using explants apices, nodal segments, hypocotyls and cotyledons. The explants were inoculated in test tubes on MS medium setting and recultivate twice to the same media type and then to recultivate and regeneration induction medium containing MS medium supplemented with 1 mg L⁻¹ kinetin. The experiment was a completely randomized design with four treatments and eight repetitions. After 30 days, the evaluations were conducted and buds with 1.5 cm from the apical segment and nodal explants were separately transferred to MS medium added with 1.0 mg L⁻¹ NAA for rooting, where they stayed, too, for 30 days. The use of explants apical segments, via direct organogenesis, presents better responses for morphogenic regeneration in the formation of tomato seedlings 'Alambra' F₁.

Keywords: *Lycopersicon esculentum*. Micropropagation. Organogenesis.

INTRODUÇÃO

O Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) no ano de 2018 alcançou uma produção mundial de mais de 182 milhões de toneladas, tendo o Brasil contribuído com 2,25%, correspondendo ao décimo lugar no ranking mundial (FAOSTAT, 2018).

A propagação de tomateiro é via sexuada, utilizando-se, principalmente, sementes híbridas de alta qualidade, o que determina uma elevação dos custos de implementação da cultura. Uma alternativa para diminuir os custos de produção é utilizar a propagação assexuada (NADAI *et al.*, 2015).

¹ Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, UFES, Alegre, ES, Brasil.

² Centro Universitário Norte do Espírito Santo, UFES, São Mateus, ES, Brasil.

A propagação assexuada traz ainda como vantagens, a multiplicação de genótipos superiores e obtenção de indivíduos geneticamente idênticos à planta-matriz, contribuindo com a uniformidade de populações e precocidade na produção (HARTMANN *et al.*, 2011). Com isto, nas últimas duas décadas muitas abordagens biotecnológicas têm sido direcionadas para o melhoramento na cultura do tomate utilizando-se a cultura de tecidos (SHEEJA; MANDAL, 2003). Desta forma, a capacidade de regeneração *in vitro* de várias cultivares foram testados (PRATTA *et al.*, 1997; COSTA *et al.*, 2000; FÁRI *et al.*, 2000; BORGES *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2006; KALYANI; RAO, 2014; EL-SHAFFEY *et al.*, 2017).

Na propagação por cultura de tecidos, a via organogênica tem sido a preferida (SOUZA *et al.*, 2006). No entanto, a organogênese em tecidos de tomate apresenta respostas muito variadas devido a vários fatores atuando individualmente ou em sinergia (SHEEJA *et al.*, 2004). Dentre estes fatores destaca-se a constituição dos meios nutritivos principalmente os reguladores de crescimento (CHAUDHRY *et al.*, 2004; BHATIA *et al.*, 2004; HARISH *et al.*, 2010; JAMOUS; ABU-QAOUD, 2015), o genótipo e tipo de explante (GUBIS *et al.*, 2003; JABEEN *et al.*, 2005; ISHAG *et al.*, 2009; EL-SHAFFEY *et al.*, 2017), ou a idade e nutrição da planta matriz (PERES, 2002).

Na organogênese a produção de plantas *in vitro* pode ocorrer direta ou indiretamente. Na primeira, tem-se a formação de órgãos diretamente, sem a passagem por fases intermediárias, enquanto que, na segunda, passa-se obrigatoriamente pela fase de calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os tipos de explantes mais usados para organogênese são cotilédones, pecíolo foliar, hipocótilo, pedúnculo, folha, caule e inflorescência, contudo o grau de resposta morfogênica dos genótipos de tomateiros difere entre os autores (GUBIS *et al.*, 2003; JABEEN *et al.*, 2005; MOHAMED *et al.*, 2010).

Poucos trabalhos relacionados à propagação assexuada de tomateiro ‘Alambra’ são encontrados na literatura, seja por estaquia (BRAUN *et al.*, 2010), cultura de tecidos (TORRES, 2013), ou por enxertia (GOMES *et al.*, 2017). Sendo assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de obtenção de plântulas do tomate ‘Alambra’ F₁, por meio da identificação do tipo de explante mais eficiente para regeneração morfogênica *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), localizado no município de Alegre/ES, latitude 20°45’ Sul, longitude 41°48’ Oeste e altitude de 150 m.

Para a obtenção de plantas matrizes foram utilizadas sementes certificadas de tomateiro longa vida (*Lycopersicon esculentum* Mill) cultivar Alambra F₁.

As sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo Laminar horizontal, com álcool etílico 70% (v/v), durante um minuto e em seguida com hipoclorito de sódio a 1% (v/v) durante 20 minutos. Após a desinfestação as sementes foram lavadas três vezes com água destilada e esterilizada (GRATTAPAGLIA; MACHADO,1998). Para obtenção das plântulas matrizes doadoras dos explantes, utilizou-se meio contendo sais do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e vitaminas B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 8 g L⁻¹ de agar como meio solidificante, tendo o pH ajustado em 5,8 conforme Fári *et al.* (2000). Foram usados 50 tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 20 ml de solução e uma semente em cada um dos tubos de ensaio, tampados com tampas de polipropileno e lacrados com filme PVC. O ambiente da sala de crescimento foi regulado para fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fótons luminosos através de lâmpada tipo luz-do-dia, e temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ \text{C}$, onde permaneceram por 21 dias.

Aos 21 dias após a germinação as plântulas foram retiradas dos tubos de ensaio, em câmara de fluxo laminar horizontal, para obtenção dos explantes, utilizando-se quatro tratamentos: segmentos apicais, segmentos nodais, folhas cotiledonares inteiras e hipocótilos.

Os explantes de cada tratamento foram inoculados em meio de estabelecimento, o mesmo usado para germinação de sementes. As condições de recipientes e sala de cultivo também foram as mesmas da fase de germinação. Utilizou-se um explante para cada tubo, com oito repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de um tubo de ensaio, num delineamento inteiramente casualizado. Os explantes foram recultivados por mais duas vezes a intervalos de 21 dias para mesmo tipo de meio.

Ao final da fase de estabelecimento, os explantes foram recultivados para meio de indução e regeneração, que foi o mesmo da fase de estabelecimento, acrescido de 1 mg L⁻¹ de cinetina. As condições de sala de cultivo foram as mesmas da fase anterior. Ao final de 30 dias, avaliou-se número de brotos, comprimento de brotos (cm) e número de folhas por broto. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Após fase de regeneração, brotos oriundos de explantes segmento apical e segmento nodal foram separados individualmente e submetidos a meio de rizogênese conforme Fári *et al.* (2000), exceto para utilização da auxina ANA a 1,0 mg L⁻¹. Foram usados 20 brotos com tamanho padronizado em 1,5 cm para cada tratamento em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 20 ml de meio. Em seguida foram transferidos para sala de crescimento com as mesmas condições das fases anteriores e mantidas por 30 dias e procederam-se as avaliações: porcentagem de

enraizamento (%); comprimento dos brotos (cm); número de folhas; comprimento da maior raiz (cm); e massa fresca das raízes (g). Os dados das médias foram comparados pelo teste t.

Todas as análises dos dados do experimento foram feitas com auxílio do programa Genes (CRUZ, 2016).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância indicou que houve diferenças significativas entre os tipos de explantes utilizados para a reação morfogênica de tomate ‘Alambra’ geração F₁ (Tabela 1). A precisão experimental medida pelo coeficiente de variação (CV) está dentro do esperado para este tipo de trabalho com tomate cultivado *in vitro* (COUTINHO *et al.*, 2010). Werner *et al.* (2012) relatam em estudos de CV para cultura de tecidos, que cada variável é influenciada por diferentes fatores desconhecidos e não controlados, necessitando assim de faixas de classificação do CV específicas para inferir sobre a precisão experimental, sendo, portanto, diferentes daquela classificação de Pimentel-Gomes (2009) utilizada para culturas de campo.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), comprimento de brotos (CB) e número de folhas por broto (NFB), produzidos em quatro tipos de explantes de tomate ‘Alambra’ geração F₁, após 30 dias em meio de regeneração

FV	GL	Quadrados médios		
		NB	CB (cm)	NFB
Tipos de Explante	3	8,36*	19,99**	18,83**
Resíduo	28	2,54	0,52	0,46
CV _(%)		70,85	54,28	49,56

*, **Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

A melhor formação de brotos ocorreu nos explantes segmento apical e segmento nodal, por organogênese direta (Tabela 2). Quando se usou como explantes hipocótilo não houve produção de brotos. Outros autores encontraram resultados diferentes quando utilizaram outros genótipos, afirmando que os hipocótilos foram os explantes mais responsivos (GUBIS *et al.*, 2003; CHAUDHRY *et al.*, 2004; JABEEN *et al.*, 2005). Trabalhos realizados por Borges *et al.* (2005) encontraram diferentes resultados quando utilizaram tipos diferentes de explantes nas cultivares de tomate, Diva, Thomas e Carmem. Os autores obtiveram 61% de brotos regenerados para a cultivar Thomas, quando o hipocótilo foi utilizado como explante, enquanto que para as cultivares Diva e Carmem não foi verificado respostas morfogênicas para esse explante. Estes resultados corroboram com as afirmativas de Jabeen *et al.* (2005) e Chaudhry *et al.*, (2007) que

dizem haver em tomate, grande variação nas respostas morfogênicas entre diferentes genótipos e tipos de explantes.

Tabela 2. Número de brotos (NB), comprimento de brotos (CB) e número de folhas por broto (NFB), produzidos *in vitro* em quatro tipos de explante de tomate ‘Alambra’ geração F₁, após 30 dias em meio de regeneração

Tipo de explante	Variáveis ^{1/}		
	NB	CB (cm)	NFB
Segmento Apical	2,50 a	3,46 a	3,25 a
Segmento Nodal	1,88 a	1,59 b	2,00 b
Cotilédone	0,50 b	0,28 c	0,25 c
Hipocótilo	0,00 b	0,00 c	0,00 c

^{1/}Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Pratta *et al.* (1997) verificaram diferenças significativas na frequência de regeneração e no número de brotações por explante entre espécies e entre genótipos de uma mesma espécie de tomateiro. Segundo Koornneef *et al.* (1993), o componente genético associado com a regeneração determina a manutenção da competência morfogênica, e não somente a sensibilidade do tecido a reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura. Esta afirmativa de Koornneef *et al.* (1993) foi constatada por Nogueira *et al.* (2001) ao estudarem a regeneração *in vitro* de plantas de tomateiros ‘Santa Clara’ e seu mutante natural ‘Firme’ em 5 diferentes meios de indução de ramos.

Com relação ao comprimento de brotos e número de folhas por broto, podem-se verificar na Tabela 2, que o melhor tratamento foi obtido quando se usou segmentos apicais. Banu *et al.* (2017), verificaram comportamento similar em estudo realizado com a cultivar BH-3, ao utilizar o segmento apical, obtendo brotos de 7,06 cm de comprimento, sendo superior aos 5,82 cm, quando da utilização de segmento nodal. Entretanto nas cultivares BH-4 e MH, embora os valores obtidos para segmentos apicais sejam superiores aos de segmentos nodais, estes não diferem estatisticamente. Já Chaudhry *et al.* (2004), Sheeja *et al.* (2004) observaram respostas diferentes de regeneração para os explantes, sendo os hipocótilos os melhores, no que refere-se ao comprimento e número de brotos.

A Tabela 3 refere-se aos dados obtidos em meio de enraizamento. Nota-se que houve diferenças significativas entre os tratamentos segmentos apicais e segmentos nodais, mostrando a supremacia do primeiro tratamento em relação ao segundo. Na análise de parte aérea verifica-se maior desenvolvimento do caule, bem como maior número de folhas quando foram utilizados como explantes, os segmentos apicais. Os resultados encontrados estão de acordo com TORRES *et al.* (1998), ao qual citam que os primórdios foliares em desenvolvimento são fontes de

substâncias orgânicas essenciais, que favorecem o crescimento dos ápices caulinares em cultura de tecidos. Quando ocorre baixa resposta morfogênica dos tecidos, como verificado nos segmentos nodais de tomate ‘Alambra’, enfatiza que deve-se inicialmente questionar o uso dos reguladores de crescimento, como apontado por Termignoni (2005). Vários autores reportam respostas muito variadas em tecidos de tomateiros, conforme a constituição dos meios nutritivos, principalmente os reguladores de crescimento (CHAUDHRY *et al.*, 2004; BHATIA *et al.*, 2004; HARISH *et al.*, 2010; JAMOUS; ABU-QAOUD, 2015).

Tabela 3. Enraizamento (E), comprimento de brotos (CB), número de folhas por broto (NFB), comprimento de raízes (CR) e massa fresca de raízes (MFR), produzidos *in vitro* em dois tipos de explante de tomate ‘Alambra’ geração F₁

Tipo de explante	Variáveis ^{1/}				
	E (%)	CB (cm)	NFB	CR (cm)	MFR (g)
Segmento Apical	90,0 a	8,16 a	7,75 a	14,94 a	0,81 a
Segmento Nodal	0,00 b	2,31 b	4,50 b	0,00 b	0,00 b

^{1/} Médias seguidas de letra diferente na vertical apresentam diferença estatística significativa a 5% pelo teste t.

Obteve-se também diferenças significativas para o sistema radicular nos dois tipos de explantes (Tabela 3). As plântulas oriundas de segmentos nodais não apresentaram raízes, enquanto aquelas provenientes de segmentos apicais produziram sistema radicular bem desenvolvido e boa porcentagem de enraizamento (90%). Essas raízes apresentaram-se bastante volumosas, ramificadas e compridas. Jamous e Abu-Qaoud (2015) também evidenciaram diferenças no enraizamento de tomate cultivar Baladi, ao estudarem diferentes tipos de explantes, constatando o não enraizamento nos explantes folhas, e 65,8% de enraizamento nos explantes hipocótilos.

A determinação celular é a capacidade que um tecido possui de canalizar o metabolismo para uma via de desenvolvimento específica (PERES, 2002). Geralmente no cultivo *in vitro*, quanto maior a determinação de um tecido para a formação de um órgão específico, menor será a sua competência para originar outros órgãos. (ROEKEL *et al.*, 1993; PERES, 2002; AMARAL, 2005; TORRES, 2013). Assim pode-se sugerir que os explantes oriundos de segmentos nodais de tomateiro ‘Alambra’ possuem determinação para formação de brotos, mas que perderam a competência para regenerar o sistema radicular. Peres (2002) e Lombardi (2008) relatam que explantes que falham em formar um determinado órgão *in vitro*, por estarem “determinados”, podem ter perdido a capacidade de expressão de “genes” mestre durante o processo de diferenciação ocorrido anteriormente.

CONCLUSÃO

As melhores respostas para a regeneração morfogênica na formação de plântulas de tomate ‘Alambra’ F₁ são para explantes obtidos de segmentos apicais via organogênese direta.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, L. **Conservação e propagação *in vitro* de três cultivares híbridas de amarílis**. 2005. 119f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal). Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, SP. 2005.
- BANU, N.A.; ISLAM, S.; ISLAM, M.A; ALAM, M.K. *In vitro* propagation from shoot Tip and nodal segment in summer tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Plant Environment Development**, v.6, n.1, p.31-38, 2017.
- BHATIA, P.; ASHWATH, N.; SENARATNA, T.; MIDMORE, D. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.78, n.1, p.1-21, 2004.
<https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000020430.08558.6e>
- BORGES, N.S.S.; BENBADIS, A.K; MARCO, C.A. Respostas morfo genéticas de tomateiros cultivado *in vitro*. **Revista Ciência Agrônômica**, v.36, n.1, p.91-97, 2005.
- BRAUN, H.; CAVATTE, P.C.; AMARAL, J.A.T.; AMARAL, J.F.T.; REIS, E.F. Produção de mudas de tomateiro por estaquia: efeito do substrato e comprimento de estacas. **Idesia**, v.28, n.1, p.9-15, 2010.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292010000100002>
- CHAUDHRY, Z., AFROZ, A.; RASHID, H. Effect of variety and plant growth regulators on callus proliferation and regeneration response of three tomato cultivars (*Lycopersicon esculentum*). **Pakistan Journal of Botany**, v.39, n.3, p.857-869, 2007.
- CHAUDHRY, Z.; HABID, D.; RASHID, H.; QURESH, A.S. Regeneration from various explants of *in vitro* seedling of tomato (*Lycopersicon esculentum* L., cv. Roma). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.7, n.2, p.269-272, 2004. <http://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2004.269.272>
- COSTA, M.G.; NOGUEIRA, F.T.S.; OTONI, W.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H. Regeneração *in vitro* de cultivares de tomateiro (*Lycopersicon sculentum* Mill.) industrial IPA-5 e IPA-6. **Ciências e Agrotecnologia**, v.24, n.3, p.671-678, 2000.
- COUTINHO, O.L.; REGO, M.M.; REGO, E.R.; KITAMURA, M.C.; MARQUES, L.F.; FARIAS FILHO, L.P. Desenvolvimento de protocolo para microenxertia do tomateiro *Lycopersicon esculentum* Mill. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.32, n.1, p.87-92, 2010.
<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v32i1.968>
- CRUZ, C.D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.38, n.4, p.547-552, 2016.
<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v38i4.32629>

EL-SHAFFEY, N.M.; HASSAN, N.; KHODARY, S.E.D.A.; BADR, A. Differential *in vitro* direct regeneration of tomato genotypes on various combinations of growth regulators.

Biotechnology, v.16, n.4-6, p.155-164, 2017. <https://doi.org/10.3923/biotech.2017.155.164>

FAOSTAT. **Crops Visualize Data**. 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>, Acessado em: 21/05/2020.

FÁRI, M.; RESENDE, G.M.; MELO, N.F. Avaliação da capacidade de regeneração *in vitro* em tomateiro industrial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.8, p.1523-1529, 2000. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2000000800004>

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, n.1, p.151-158, 1968.

GOMES, R.F; CASTOLDI, R.; MELO, D.M.; BRAZ, L.T.; SANTOS, D.M.M. Porta-enxertos para tomateiro conduzido com quatro hastes. *Revista Ceres*, v. 64, n.2, p. 186-191, 2017.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.183-260.

GUBIS J.; LAJCHOVA Z.; FARAGO J.; JUREKOVA, Z. Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *in vitro*. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v.39, n.1, p.9-14, 2003.

HARISH, M.C., RAJEEVKUMAR, S.; SATHISHKUMAR, R. Efficient *in vitro* callus induction and regeneration of different tomato cultivars of India. **Asian Journal of Biotechnology**, v.2, n.3, p.178-184, 2010.

<http://dx.doi.org/10.3923/ajblcr.2010.178.184>

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 915p.

ISHAG, S.; OSMAN, M.G.; KHALAFALLA, M.M. Effects of growth regulators, explant and genotype on shoot regeneration In tomato (*Lycopersicon esculentum* c.v. Omdurman), **International Journal of Sustainable Crop Production**, v.4, n.6, p.7-13, 2009.

JABEEN, N.; CHAUDHRY, Z.; RASHID, H.; MIRZA, B. Effect of genotype and explants type on *in vitro* shoots regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Pakistan Journal of Botany**, v.37, n.4, p.899-903, 2005.

JAMOUS, F.; ABU-QAOUUD, H. *In vitro* regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, v.16, n.3&4, p.181-190, 2015.

KALYANI, B.G.; RAO, S. Zeatin induced direct plant regeneration from cotyledon explants of cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**. v.3, n.7, p.1034-1040, 2014.

KOORNNEEF, M.; BADE, J.; HANHART, C.; HORSMAN, K.; SCHEL, J.; SOPPE, W.; VERKERK, R.; ZABEL, P. Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. **The Plant Journal**, v.3, p.131-141, 1993.

- LOMBARDI, S.P. **Estudo funcional de um locus de regeneração (*Rg1*) vindo de *Solanum peruvianum*, uma espécie selvagem relacionada ao tomateiro**. 2008. 83f. Tese (Doutorado em Ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP. Piracicaba, SP. 2008.
- MOHAMED, A.N.; ISMAIL, M.R.; RAHMAN, M.H. *In vitro* response from cotyledon and hypocotyls explants in tomato by inducing 6-benzylaminopurine. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.30, p.4802-4807, 2010.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- NADAI, F.B.; MENEZES, J.B.C.; CATÃO, THAÍS ADVÍNCULA, H.C.R.M.; COSTA, C.A. Produção de mudas de tomateiro em função de diferentes formas de propagação e substratos. **Revista Agro@mbiente On-line**, v.9, n.3, p.261-267, 2015. <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v9i3.2348>
- NOGUEIRA, F.T.S.; COSTA, M.G.; FIGUEIRA, M.L.; OTONI, W.C.; FINGER, F.L. Regeneração *in vitro* de plantas de tomateiros ‘Santa Clara’ e seu mutante natural ‘Firme’. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.1, p.63-71, 2001.
- PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biociência e Desenvolvimento**, Brasília, n.25, p.44-48, 2002.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15. ed. Piracicaba: Fealq. 2009. 451p.
- PRATTA, G.; ZORGOLI, R.; PICARDI, L.A. Intra and interspecific variability of *in vitro* culture response in *Lycopersicon* (tomatoes). **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, n.1, p.75-78, 1997. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84551997000100014>
- ROEKEL, J.S.C.V.; DAMM, B.; MELCHERS, L.S.; HOEKEMA, A. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Cell Reports**, v.12, n.11, p.644-647, 1993.
- SHEEJA, T.E.; MANDAL, A.B. *In vitro* flowering and fruiting in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v.11, n.11, p.37-42, 2003.
- SHEEJA, T.E.; MANDAL, A.B.; RATHORE, R.K.S. Efficient Plantlet Regeneration in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Plant Tissue Culture**, v.14, n.1, p.45-53, 2004.
- 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. Capacidade de regeneração *in vitro* de tomateiro cultivar Santa Clara. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.2, n.2, p.88-93, 2006.
- TERMIGNONI, R.R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 2005. 182p.
- TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S.L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPQ, 1998. v.1. p.133-145.

TORRES, F.J.B. **Micropropagação e aclimatização do tomateiro híbrido ‘alambra’**. 2013. 60f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. 2013.

WERNER, E.T.; MOTTA, L.B.; MARTINS, M.Q.; LIMA, A.B.P.; SCHMILDT, E.R. Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.8, n.1-2, p.27-36, 2012.