

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/8691
IB/81225

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1987

MONIQUE INÊS SEGEREN FONSECA

Este exemplar corresponde a redação
final da tese defendida pela candi-
dita Monique Inês Segeren Fonseca e
aprovada pela Comissão Julgadora

Rolf Dieter Ellp

Campinas, 16 de setembro de 1987

CULTURA DE EMBRIOES IMATUROS PARA OBTENÇÃO
DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS
EM TOMATEIRO

Classif.	-1
Autor	F 4330
Z.	Ex
Compt. BC	8691
10	/741

10/ 81225

BC/ 8691

MONIQUE INÊS SEGEREN FONSECA

CULTURA DE EMBRIÕES IMATUROS PARA
OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS
EM TOMATEIRO

Orientador: Prof. PhD. Maro Ran-ir Söndalh

*Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas na área de Genética.*

CAMPINAS

- 1987 -

Dedico aos meus pais,
ao meu esposo, José e
aos meus filhos Aline
e Guilherme.

AGRADECIMENTOS

- . Ao Prof. PhD Maro Ran-ir Söndahl, pelo trabalho de orientação da tese, e valiosos ensinamentos em culturas de tecidos;
- . Ao Pesquisador Científico Walter José Siqueira, pela co-orientação prestada durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa;
- . Ao Pesquisador Científico Dr. Alfredo Usberti Filho, pelas sugestões apresentadas e apoio durante a execução deste trabalho;
- . Ao Pesquisador Científico Herculano P. Medina Filho, pela orientação na realização das análises científicas de eletroforese;
- . Aos Pesquisadores Drs. Hiroshi Nagai e Dr. André L. Lourenção pela orientação na condução dos testes de resistência à "vira-cabeça" e à traça;
- . Aos Drs. Rolf Dieter Illg, Dr. Paulo Arruda, Dr. Antonio C. N. de Magalhães e Linda S. Caldas pela leitura criteriosa do manuscrito, sugestões e eventuais correções;
- . Ao Instituto Agronômico de Campinas - IAC e à Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP, pelos recursos materiais e humanos;

- . Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão de bolsas de aperfeiçoamento e Mestrado, respectivamente.
- . Um agradecimento especial ao meu esposo José C. Fonseca Neto, pela compreensão e estímulo;
- . Finalmente, a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

Página

I.	APRESENTAÇÃO	09
II.	INTRODUÇÃO	11
	1. Dados econômicos.....	11
	2. Principais moléstias do tomateiro.....	14
III.	REVISÃO DE LITERATURA	
	1. A espécie <i>L. peruvianum</i> como fonte de transferência de características desejáveis.....	19
	2. Relações de compatibilidade entre algumas espécies de tomateiro.....	21
	3. Origem da barreira interespecífica no cruzamento entre <i>L. peruvianum</i> x <i>L. esculentum</i>	23
	4. Sistema de incompatibilidade no <i>L. peruvianum</i> ...	23
	4.1. Cruzamento unilateral.....	25
	4.2. Herança da autoincompatibilidade em <i>L. peruvianum</i>	27
	5. Manipulação genético ambiental para redução da incompatibilidade interespecífica, obtenção de híbridos F_1 , obtenção de retrocruzamento.....	28
IV.	MATERIAIS E MÉTODOS	
	1. Cruzamento e tentativas de auxiliar o pegamento	34
	1.1. Observação sobre o desenvolvimento das sementes híbridas.....	37
	1.2. Testes de viabilidade das sementes híbridas	39
	1.3. Estudo histológico de sementes híbridas em diferentes estádios de desenvolvimento.....	39

2. Cultura "in vitro" de embriões imaturos.....	41
2.1. Metodologia utilizada na extração de se- mentes imaturas dos frutos e remoção da mucilagem presente nas sementes.....	41
2.2. Meios e condições de cultura.....	42
2.3. Cultura de sementes imaturas de frutos de autofecundação da var. Angela Gigante em diferentes estádios de desenvolvimen- to.....	43
2.4. Testes preliminares quanto à resposta de sementes imaturas de <i>L. esculentum</i> var. Angela Gigante e reguladores de cresci- mento.....	45
2.5. Cultura de embriões do cruzamento <i>L. es- culentum</i> (var. Angela Gigante) x <i>L. peru- vianum</i> (PI 126928, PI 126930, PI 126944, PI 126946, PI 128657 e PI 129146).....	45
2.6. Cultura de embriões híbridos do cruzamen- to <i>L. esculentum</i> (var. Angela Gigante) x <i>L. peruvianum</i> (LA 462, LA 471 e LA 444/1)	46
3. Regeneração e adaptação de plantas híbridas a partir de calo.....	52
4. Caracterização morfológica e isoenzimática de híbridos obtidos na fase intermediária de co- lo.....	55
5. População Segregante.....	59
5.1. Obtenção.....	59
5.2. Avaliação morfológica e isoenzimática...	60
5.3. Avaliação de híbridos F_1 , e das popula- ções segregantes F_2 e F_3 quanto à resis- tência ao vírus causador do "vira-cabeça".	61
5.4. Avaliação de resistência de híbridos F_1 in- terespecíficos e de populações segragan- tes à tração do tomate (<i>Scrobipalpus absoluta</i>)	62

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Cruzamento e tentativa de auxiliar o pegamento.	64
1.1. Observações sobre desenvolvimento das sementes híbridas.....	66
1.2. Teste de viabilidade das sementes híbridas.	66
1.3. Estudo histológico de sementes híbridas em diferentes estádios de desenvolvimento....	70
2. Cultura "in vitro" de embriões imaturos.....	78
2.1. Metodologia utilizada na extração de sementes imaturas dos frutos e remoção da mucilagem presente nas sementes.....	78
2.2. Cultura de sementes imaturas de frutos de autofecundação da variedade Angela Gigante em diferentes estádios de desenvolvimento.	81
2.3. Testes preliminares quanto à resposta de sementes imaturas de <i>L. esculentum</i> var. <i>Angela Gigante</i> à reguladores de crescimento.	84
2.4. Cultura de sementes imaturas do cruzamento <i>L. esculentum</i> var. <i>Angela Gigante</i> x <i>L. peruvianum</i> (PI 126928, PI 126930, PI 126944, PI 126946, PI 128657 e PI 129146).....	84
2.5. Cultura de sementes híbridas do cruzamento <i>L. esculentum</i> (var. <i>Angela Gigante</i>) x <i>L. peruvianum</i> (LA 371, LA 462, LA 444/1).....	86
3. Regeneração e adaptação de plantas híbridas a partir de calo.....	92
4. Caracterização morfológica e isoenzimática dos híbridos obtidos.....	107
5. População Segregante.....	119
5.1. Obtenção.....	119
5.2. Avaliação morfológica e isoenzimática.....	130

5.3. Teste das populações segregantes, ao vírus causador da moléstia "vira-cabeça", em tomateiro	136
5.4. Teste de resistência do híbrido interespecífico (CN-01) e populações segregantes à traça do tomate (<i>Scrobipalpula absoluta</i>)..	136
VI. CONCLUSÕES	139
VII. RESUMO	143
VIII. ABSTRACT	146
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148

I- APRESENTAÇÃO

A hibridação interespecífica no gênero *Lycopersicon* é considerado como método eficiente de melhoramento genético de *L. esculentum*, para a transferência de genes de resistência a diversas pragas e patógenos e as condições adversas do meio ambiente, para o aprimoramento das características tecnológicas.

Dentro das espécies selvagens, *L. peruvianum* constitui-se numa importante reserva gênica para o melhoramento do tomate cultivado. Entre outras, é fonte de resistência ao vírus causador da moléstia "vira-cabeça" e à traça (*Scro bipalpula absoluta* Meyrick) e aos nematóides formados de galha *Meloidogyne* spp.

Para utilização desse valioso germoplasma torna-se necessário a obtenção de híbridos F_1 entre essas duas espécies e a realização de retrocruzamentos sucessivos para a espécie comercial *L. esculentum*. Essas hibridações, através das técnicas tradicionais, são impossibilitadas devido a existência de mecanismos de incompatibilidade pré ou pós-zigóticas, resultando em ausência de fertilização e aborto do embrião híbrido, respectivamente. Porém, o método mais eficiente para contornar a incompatibilidade pós-zigótica é através da técnica de cultura "in vitro" de embriões imaturos.

O presente trabalho são relatados esforços no sentido de se desenvolver metodologia de cultivo "in vitro" de embriões de *L. esculentum* x *L. peruvianum*, até a completa

obtenção de plantas híbridas.

O presente trabalho envolve o desenvolvimento e otimização da cultura "in vitro" de embriões imaturos de *L. esculentum* x *L. peruvianum*, com posterior formação de calos e regeneração de plântulas híbridas.

II. INTRODUÇÃO

1. Dados Econômicos

Atualmente existem dois sistemas de produção de tomate em nossas condições. No primeiro, o produto destina-se ao consumo "in natura", exigente em cuidados especializados (tratos culturais, colheita e embalagem executados manualmente). No segundo a produção é destinada à industrialização, onde toda a cultura pode ser conduzida mecanicamente, inclusive a colheita. O sistema que se destina ao mercado "in natura" desenvolveu-se, inicialmente, a partir das regiões próximas de grandes centros populacionais (Rio de Janeiro e São Paulo), podendo hoje ser encontrado praticamente em todo o país, mesmo em locais longínquos dos centros onde o tomate é comercializado ou consumido. Por outro lado, a produção de tomate para a indústria, iniciada pioneiramente há mais de 40 anos pelas Indústrias Alimentícias Carlos de Brito (PEIXE) em Pesqueira-PE, e pela Indústria Francisco Matarazzo em Santa Adélia-SP, ocupa extensas áreas localizadas em regiões mais afastadas dos grandes centros consumidores, onde as terras são mais baratas e há maior disponibilidade de mão-de-obra (MAKISHIMA, 1978).

A produção nacional de tomate (mesa e indústria), de 1980 a 1983, esteve em média ao redor de 1,5 milhões de toneladas anuais, concentradas em poucos Estados (Fundação IBGE). Em 1982, das 1,7 milhões de toneladas produzidas, São Paulo participou com quase metade (47,5%), seguido de Pernambuco (12,4%), Minas Gerais (9,2%), Bahia (5,5%) e Rio de Janeiro (5,3%). Juntos, portanto, esses cinco Estados responderam por

cerca de 80% da produção nacional. Em 1983 a produção de tomate foi de 1,547 milhões de toneladas, 10,9% menor do que a obtida em 1982. A região Centro-Sul (Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo) somou 1,063 milhões de toneladas, correspondentes à 59% da produção total, com redução de 5,0% em relação ao ano anterior (Anuário Estatístico do Brasil, 1983).

Essa queda na produção deveu-se à seca do Nordeste e excesso de chuvas no Centro-Sul, acontecendo então modificações na ordem de importância dos principais Estados produtores.

O volume de tomate comercializado "in natura" na região Centro-Sul apresentou, nos últimos cinco anos, incremento médio anual de 2,5 mil toneladas, insuficiente para atender o crescimento demográfico do País. Os maiores estados produtores do Centro-Sul (São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro) apresentaram tendência de crescimento de 5,6% ao ano, correspondendo ao aumento médio anual de 2,4 mil toneladas.

Em contraste, parece haver uma tendência de diminuição de produção de tomate nos principais países produtores. Em 1978 houve nos EUA, por exemplo, uma redução de 13,1% na área cultivada e de 18% na produção de tomate industrial, segundo o Departamento de Agricultura dos EUA (MAKISHIMA, 1978). Esta redução mundial da produção de tomate pode abrir importantes mercados no exterior para o Brasil.

A participação brasileira no comércio internacional de tomate "in natura" e industrializado é muito pequena e sofre grandes oscilações. Até 1970 o Brasil exportava pequena quantidade de tomate "in natura" para a Argentina e Uruguai.

Em 1978, segundo a CACEX, foram exportados pelo porto de Santos 5 mil toneladas de extrato de tomate, quantidade esta 53% inferior àquela do ano de 1977. As exportações brasileiras de tomate são bastante prejudicadas pela irregularidade do fornecimento de matéria-prima para as indústrias de processamento, causada principalmente pela ocorrência de doenças. Somente a requeima, causada pelo fungo *Phytophthora infestans*, acarretou danos da ordem de 38% na produção paulista de tomate em 1976 (Inst. Econ. Agric., 1976).

Os níveis de produção de tomate nos trópicos são muito menores do que aqueles das zonas temperadas. Esse fato é devido à vários fatores tais como variedades comerciais não adaptadas às condições tropicais e subtropicais, alta incidência de doenças e pragas, emprego de tecnologia inadequada e outros (VILLAREAL, 1979).

Variedades selecionadas para climas temperados são, geralmente, as únicas disponíveis aos agricultores em países tropicais. O potencial produtivo dessas variedades é usualmente menor, e às vezes errático, principalmente quando o cultivo coincide com os meses de verão. Por esse motivo, os mercados tropicais caracterizam-se por flutuações estacionais típicas no preço e suprimento de tomate fresco ao mercado consumidor.

Além do emprego de variedades não adaptadas (VILLAREAL, 1979), existem barreiras mais críticas, especialmente durante a estação úmida, tais como a rápida multiplicação das pragas e insetos, doenças e ervas daninhas, altas temperaturas e chuvas pesadas, acarretando problemas fisiológicos como rachaduras de frutos, podridão estilar, etc.

Assim, a obtenção de novos cultivares de tomate com maior amplitude de adaptação às nossas condições climáticas e também com maior tolerância às principais doenças e pragas, torna-se de fundamental importância para a ampliação do mercado interno e colocação dos excedentes em mercados internacionais.

2. Principais Moléstias do Tomateiro

Um dos aspectos mais críticos no cultivo do tomateiro no Brasil é, realmente, a alta incidência de um grande número de doenças infecciosas, causadas por fungos, bactérias e vírus, muitas das quais, dependendo das circunstâncias, podem se constituir em fatores limitantes da cultura. Em muitos casos, mesmo com a adoção de medidas de controle químico, estas doenças determinam o caráter itinerante da cultura do tomateiro.

Existem inúmeras viroses que atacam o tomateiro, entre as quais destacam-se o vira-cabeça, mosaico do fumo, amarelo baixeiro e topo amarelo. Já existe fonte de resistência ao mosaico do fumo (var. Angela). O amarelo baixeiro e o topo amarelo, em geral, ocorrem em culturas mal conduzidas e no final do ciclo. A produção fica reduzida mas o prejuízo não é total.

O vira-cabeça incide em qualquer fase do ciclo da cultura, determinando um prejuízo total quando a infecção ocorre nos primeiros 40 dias da cultura. As infestações posteriores também irão causar reduções na produção final. O vira-cabeça é considerado a principal virose do tomateiro, sendo

transmitida pelo trips *Frankliniella schulzei*, aumentando a incidência nos meses mais quentes. Não existe nenhuma fonte de resistência adequada às condições brasileiras, dentre os cultivares comerciais cultivados no Brasil.

A espécie selvagem do tomateiro *L. peruvianum* apresenta-se como excelente fonte de resistência para a virose do vira-cabeça. Entre as diversas introduções de *L. peruvianum*, existem reações de resistência desde moderada até a imunidade. O *L. peruvianum*, além de apresentar diversos genes de resistência à várias moléstias e pragas, é também importante fonte de variação morfológica (TAYLOR & AL-KUMMER, 1982). A incompatibilidade entre plantas de *L. esculentum* e *L. peruvianum* tem dificultado, até agora, o melhoramento do tomate comercial através da introdução de genes que condicionam resistência às doenças, presentes no tomate selvagem (RICK & SMITH, 1953; Mc GUIRE & RICK, 1954; RICK & BUTLER, 1956). Apenas em poucos casos, relatados a seguir, e em grande dificuldade, a hidratação foi bem sucedida, empregando-se a técnica da cultura de embrião, descrita inicialmente por SKIRM (1942): resistência ao vírus do mosaico do fumo (ALEXANDER, 1963), à nematóides (RICK, 1967) e ao *Cladosporium* (KERR & BARLEY, 1964). Neste trabalho, apenas um gene para resistência foi transferido ao tomate comercial. Pesquisas realizadas por FINLAY, 1952, indicam que possivelmente a resistência ao vírus causador do vira-cabeça e às suas várias estirpes é proporcionada por dois genes dominantes e três genes recessivos.

Em resumo, tanto o abastecimento interno como a colocação de excedentes nos mercados internacionais, dependem, em grande parte, do aumento significativo da produtividade e qualidade do produto final (UENO, 1979), que podem ser parcial

mente equacionadas pelo controle efetivo das principais doenças.

O melhoramento genético do tomate, visando tolerância às doenças limitantes à cultura, poderia reduzir os prejuízos causados à produtividade, através de liberações de novas variedades resistentes aos principais patógenos. O plantio de novos cultivares bem adaptados às nossas condições e com boa tolerância e doenças resultaria no aumento significativo da receita da cultura, sem ônus adicionais aos produtores, resultando em estabilidade de produção durante o ano.

A maioria das fontes conhecidas de resistência a doenças, em tomate, localiza-se em tipos selvagens. Através de cruzamentos artificiais é possível a introdução de genes presentes nos tomates selvagens nos tipos comerciais. Entretanto, devido às barreiras interespecíficas existentes, o processo só pode ser executado através da cultura de tecidos.

O objetivo principal da presente pesquisa é o da obtenção de híbridos entre o tomateiro selvagem (*L. peruvianum*) e o comercial (*L. esculentum*). A estratégia inicialmente adotada nos cruzamentos foi a de mistura de pólen de diversas introduções de *L. peruvianum*, contendo alto nível de resistência ao vira-cabeça. Procedeu-se, sem seguida, à cultura "in vitro" dos embriões imaturos, extraídos de frutos com idades de 14 a 40 dias, após polinização artificial unidirecional, tendo como progenitor feminino o *L. esculentum*. Devido à mistura de pólen de diferentes introduções de *L. peruvianum* utilizadas nos cruzamentos, pretendeu-se obter híbridos F_1 diferentes, de constituição genética desconhecida, ampliando-se desta forma a diversidade gamética pré-existente.

Subsequentemente, foram obtidas as gerações segregantes, através de cruzamentos das diferentes plantas híbridas

F_1 , de constituição genética desconhecida, devido à mistura de pólen de diferentes introduções de *L. peruvianum*. Estas populações, denominadas de $SibF_2$ e $SibF_3$ provavelmente apresentarão combinações gênicas altamente desejáveis, reunindo resistência à diversas doenças e pragas, que juntamente com as plantas híbridas F_1 , poderão ser utilizadas em retrocruzamento sucessivos com cultivares comerciais de *L. esculentum*, adaptadas às condições do Brasil, esperando-se assim associar as características de alta produção e qualidade de fruto presente no referido cultivar com tolerância ao vírus do vira-cabeça introduzida do tomate selvagem.

III. REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Lycopersicon* é originário de uma estreita área da costa do Pacífico, estendendo-se do Equador (0º latitude) até a parte norte do Chile (30º latitude sul). Exclui-se da qui o *L. cheesmanii*, que ocorre somente nas ilhas Galápagos e o *L. pimpinellifolium*, que está confinado ao Perù, Equador e Ilhas Galápagos (CURRENCE, 1963). Esta região se constitui no centro de maior diversidade genética desse gênero e provavelmente, a fonte de origem do tomateiro cultivado (*L. esculentum* Mill).

As espécies desse gênero, classificadas nos subgêneros *Eulycopersicon* e *Eriopersicon*, possuem 12 pares de cromossomos, os quais são essencialmente homólogos (RICK, 1973). O tomateiro comercial pertence à espécie *Lycopersicon esculentum* e é uma das hortaliças de maior importância econômica no Brasil e em outros países. Essa olerícola tem sido objeto de melhoramento para várias características agronômicas, onde a exploração de germoplasma de espécies selvagens reveste-se de capital importância. Também do ponto de vista citogenético se constitui em material dos mais estudados, com cerca de mil genes já catalogados, cinquenta dos quais estão sendo intensamente utilizados no melhoramento (CLAYBERT et al., 1966; RICK & FORBES, 1975). A utilização da hibridação interespecífica em tomateiro tem, desta forma, grande importância, podendo-se enumerar, dentre os muitos trabalhos de hibridação deste tipo, o controle com sucesso de diversas doenças, tais como fusariose, estenfílio e outras (RICK, 1973). Desta maneira, também é possível introduzir-se melhores características agronômicas nas variedades comerciais, tais como porte determinado, fru

tos maiores e com maior firmeza, maior número de flores por inflorescência, alta porcentagem de sólidos solúveis, esterilidade masculina, etc.

O *L. peruvianum* é uma das espécies selvagens que tem várias das características acima descritas e que podem ser incorporadas ao *L. esculentum*. No entanto, esta espécie apresenta reações de incompatibilidade quando cruzada com *L. esculentum* limitando seu aproveitamento em programas de melhoramento.

Nesta revisão são apresentados aspectos sobre barreiras de incompatibilidade entre estas duas espécies, bem como as estratégias propostas para a efetivação dos cruzamentos e obtenção de híbridos.

1. A espécie *L. peruvianum* como fonte de transferência de características desejáveis

RICK (1973) evidencia a importância das hibridações no melhoramento. Segundo ele, o gênero *Lycopersicon* é um ótimo exemplo na qual a espécie cultivada está sendo melhorada por este método. RICK & LAMM (1963b) caracterizaram a enorme variação encontrada nas diferentes raças de *L. peruvianum*, encontrado naturalmente no norte do Chile e numa estreita região montanhosa da costa do Peru. Esta grande variabilidade faz do *L. peruvianum* uma espécie altamente visada para servir de doadora de características desejáveis a serem introduzidas no tomateiro comercial.

YEAGER & OURINTON, já em 1946, conseguiram aumentar o conteúdo de ácido ascórbico dos frutos do tomateiro, através

do cruzamento entre *L. esculentum* ("Michigan State Forcing"), como progenitor, feminino e *L. peruvianum*.

ALEXANDER et al (1944) descreveram que o *L. peruvia*num tem diferentes graus de resistência à "Curly top", resistência à nematóides, resistência à mancha bacteriana e ao mosaico. PORTE (1945) relatou que o *L. peruvianum* foi consideravelmente resistente à enfermidades foliares. Através de alguns cruzamentos naturais desta espécie selvagem com alguns cultivares de ele obteve alguns híbridos. Um híbrido foi cruzado com os cultivares Pan América e Rutgers, e sua descendência mostrou um amplo espectro de variações morfológicas na progênie segregante, inclusive para resistência e algumas moléstias.

A resistência à nematóides em *L. esculentum* foi incorporada a partir do cruzamento com *L. peruvianum* e subsequente cultura de embriões imaturos (SMITH, 1944; Mc FARLENE et al, 1946). Alguns cultivares desenvolvidos no Brasil, tais como Ipa-1, Ipa-2 e Jubileu-75, apresentam resistência à nematóides. A fonte original de resistência foi aproveitada de plantas de *L. esculentum* derivadas das hibridações interespecíficas acima mencionadas. Outros trabalhos em que se conseguiu resistência à doenças foram: à *Alternaria solani* (KIKU, 1980), *Phytophthora in*festans e *Meloidogyne incognita* (KIKU et al. 1979b) e ao vírus mosáico do fumo - TMV (ALEXANDER, 1963).

Através de cruzamentos entre *L. esculentum* var. moneymaker e *L. glandulosum*, SZTEYN (1962) obteve sementes que originaram três plantas normais e duas triplóides. Através da técnica de cultura de embrião imaturo foi obtida outra planta normal e uma triplóide, resistente à "Corky-root" e ao *Cladosporium fulvum*, características estas também observadas nas

duas triplóides citadas acima (SZTEYN, 1962). Nos retrocruzamentos houve aparecimento de sementes apenas quando o híbrido polinizou a var. Moneymaker ou quando foi polinizado por *L. glandulosum*, sendo este último cruzamento mais promissor do que a autofertilização do híbrido F_1 ou o retrocruzamento para o tomateiro comercial.

2. Relações de compatibilidade entre algumas espécies de tomateiro

Em um estudo realizado por RICK & LAMM (1963a) a espécie selvagem foi considerada como amplamente diversificada morfológicamente e as diversas raças testadas, cerca de vinte e cinco, mostraram-se autoincompatíveis.

HOGENBOOM (1972 a, b, c, d, e) realizou estudos sobre os cruzamentos entre as espécies dos subgêneros *Eulycopersicon* e *Eriopersicon*. A Tabela 1 mostra os resultados deste estudo.

Não existe barreira entre *L. pimpinellifolium* e *L. esculentum*. Aliás, Mc ARTHUR & CHIASSON (1974) consideraram a fertilidade entre essas duas espécies tão perfeita que é difícil mantê-las como espécies distintas, com base em critérios genéticos. Muitos desses cruzamentos são difíceis ou impraticáveis: o *L. minutum*, *L. hirsutum*, *L. chilense* e *L. peruvianum* mostram incompatibilidade unilateral com *L. esculentum* sendo que nas duas últimas espécies ocorre forma muito drástica de auto-incompatibilidade, enquanto nos cruzamentos inversos ocorre aborto precoce de embrião.

Tabela 1. Relações de compatibilidade no gênero *Lycopersicon*.

	<u>L.escu</u> -*	<u>L.pimpinell</u> -*	<u>L.minu</u> -**	<u>L.hir</u> -**	<u>L.chi</u> -**	<u>L.peru</u> **
	<u>lentum</u>	<u>lifolium</u>	<u>tum</u>	<u>sutum</u>	<u>lense</u>	<u>vianum</u>
<u>L.esculentum</u>	+	+	+	+	AE	AE
<u>L.pimpinelli</u>	+	+	+	+	AE	AE
<u>L.minutum</u>	+,IU,AE	+,IU	+	AE	AE	AE
<u>L.hirsutum</u>	+,IU	+,IU	+,IU	+,AI,IU	?	AE
<u>L.chilense</u>	IU	IU	IU	?	AI	AE
<u>L. peruvianum</u>	IU	IU	IU	IU	AE	AI

(Hogenboon, 1972).

+ = sem barreira séria; AI = auto-incompatibilidade; IU = incompatibilidade unilateral; AE = aborto do embrião, ? = sem resultados conhecidos.

* = *Eripersicon*, ** = *Eulycopersicon*.

3. Origem da barreira interespecífica entre *L. peruvianum* e *L. esculentum*

Barreiras pós-zigóticas como, por exemplo, as existentes entre *L. peruvianum* e outras espécies de *Lycopersicon*, que impedem a introgressão de genes, geralmente são devidas ao aborto do embrião, esterilidade do híbrido ou viabilidade reduzida do híbrido. Este isolamento de espécies deve ser complexo, pois há muita dificuldade para se quebrar estas barreiras. Do ponto de vista evolutivo, deve ter sido causado por barreiras etológicas e isolamento geográfico (RICK, 1979). estas barreiras de incompatibilidade teriam sido adquiridas no decorrer do processo de diferenciação de raças e não resultantes de seleção direta para prevenção de intercruzamento, parecendo ser um caráter multigênico (SAWANT, 1958).

4. Sistema de incompatibilidade na espécie *L. peruvianum*

No estudo conduzido por MACARTHUR & CHIASSON (1947), a incompatibilidade observada em determinados cruzamentos foi atribuída à diferenças gênicas que provocam a esterilidade do híbrido. Por outro lado, MCGUIRE & RICK (1954) discordam dessa idéia e citam um sistema de alelos, semelhante ao encontrado em *Nicotiana tabacum*, como a explicação para esta ocorrência.

Em geral os sistemas de incompatibilidade podem ser heteromórficos e homomórficos. Nos sistemas heteromórficos existem diferenças morfológicas associadas com autoincompatibilidade que não ocorrem em um sistema homomórfico. No sistema homomórfico, a autoincompatibilidade pode ser esporofítica

ogametofítica. No sistema esporofítico, a reação de incompatibilidade é determinada pelo genótipo da planta receptora (ALLARD, 1960). Em um sistema gametofítico, a autoincompatibilidade é determinada por séries de alelos do tipo S, presentes no pólen.

Em *L. peruvianum* a autoincompatibilidade é gametofítica homomórfica e também mostra cruzamento unilateral (McGUIRE & RICK, 1954). Este é um fenômeno que ocorre quando o pólen de uma planta (*L. peruvianum*) germina no estigma de outra planta (*L. esculentum*) mas o cruzamento recíproco não pode ser obtido. McGUIRE & RICK (1954) autofecundaram várias coleções de *L. peruvianum* e em todas encontraram autoincompatibilidade. Esta autoincompatibilidade era causada por uma série de alelos múltiplos. Portanto o progenitor feminino com genótipo $S_{10}S_{11}$ pode somente ser polinizado por pólen com um genótipo não encontrado no progenitor feminino. Em outras palavras, o progenitor masculino deve diferir do progenitor feminino em pelo menos um alelo, porque com um mesmo alelo S_{10} ou S_{11} no caso deste exemplo, não é possível obter frutos e sementes. NETTANCOURT et al (1974a) verificaram que todos os tubos polínicos de origem híbrida (*L. esculentum* X *L. peruvianum*), inibidos em estiletes de *L. peruvianum*, continham o alelo S_1 . Os resultados obtidos confirmam os de McGUIRE & RICK, 1954, já discutidos, em que os dois tipos de barreiras do cruzamento interespecífico são a inibição do desenvolvimento dos tubos polínicos no estilete e a não fertilização ou aborto precoce do embrião. O primeiro pode ser causado por alelos S, no caso do tubo polínico e o estilete conterem o mesmo alelo, ou por um fator existente em *L. esculentum* e transmitido ao híbrido, enquanto o segundo depende do "background" genético. Já MARTIM (1961) não conseguiu dados que pudessem deixar bem

estabelecidas as relações entre os sistemas gênicos que controlam a autoincompatibilidade e a hibridação unilateral.

Estudando as barreiras do crescimento - interespecífico com *L. peruvianum*, RICK (1979) concluiu que estas são altamente complexas em aspectos embriológicos e genéticos, confirmando os resultados alcançados anteriormente.

4.1. Cruzamento unilateral

MCGUIRE & RICK (1954), definiram cruzamento unilateral como a restrição da hibridação entre duas espécies para um dos cruzamentos recíprocos. Os autores referidos cruzaram *L. esculentum* var. Pearson com *L. peruvianum* e produziram frutos mas não sementes, pois estas abortaram em um estágio imaturo. Nestes casos, frequentemente, a espécie autocompatível é utilizada como receptora de pólen para se obter sucesso no cruzamento.

HOGENBOOM (1972 a e e) conseguiu a hibridação recíproca do cruzamento entre *L. esculentum* e *L. peruvianum* através da utilização de duas populações autocompatíveis de *L. peruvianum*, que foram utilizadas como receptores de pólen do cultivar Money maker de *L. esculentum*. Observando-se o crescimento dos tubos polínicos verificou-se que:

a) O tubo polínico cessa o crescimento quando alcança dois terços da distância da base do estilete;

b) No estilete, o grupo de tubos polínicos formam um padrão cônico, pois um certo número de tubos polínicos crescem pouco e somente alguns alcançam a base do pistilo. Baseado nesta observação, o autor concluiu que existe realmente uma barreira no estilete que cessa o crescimento do tubo polínico da espécie *L. esculentum*. Em algumas plantas o

crescimento do tubo polínico se deteve justamente antes da entrada do ovário. Estes resultados mostraram correspondência numérica com a obtenção de sementes. Outro resultado importante foi que o alelo para incompatibilidade (S) é proveniente de *L. peruvianum* e as plantas autocompatíveis dessa mesma espécie não mostraram nenhuma reação adversa ao crescimento de pólen proveniente de *L. esculentum*.

Em seu último trabalho, HOGENBOOM estudou a quebra da barreira existente no cruzamento de *L. esculentum* e *L. peruvianum* (HOGENBOOM, 1972 e), descrevendo a herança da incompatibilidade unilateral. Estudando a progênie de 32 plantas de *L. peruvianum* autocompatíveis, classificou o crescimento do tubo polínico em três categorias: (1) Parada do crescimento do tubo polínico a 2/3 da base do estilete; (2) Parada do crescimento do tubo polínico na base do estilete; (3) Não inibição do crescimento do tubo polínico. Com os resultados de seus experimentos, ele chegou às seguintes conclusões:

a) A inibição do crescimento do tubo polínico de *L. esculentum* no estilete de *L. peruvianum* é controlado por mais de um gene dominante e cada um, provavelmente, governando processos distintos;

b) A inibição do crescimento dos tubos polínicos de *L. esculentum* no ovário de *L. peruvianum* é causada por um gene que expressa um grau de dominância parcial, diferente portanto da inibição do tubo polínico no estilete de *L. peruvianum*, e também diferente da ação dos alelos S;

c) O meio ambiente teve um efeito na viabilidade do pólen de *L. esculentum*. Esta última conclusão foi baseada em observações de que no início e no final do ciclo de vida do tomateiro, as reações de incompatibilidade não foram as mesmas.

4.2. Herança da autoincompatibilidade em *L. peruvianum*

Através da autofecundação de plantas *L. peruvianum* com pólen submetido à irradiação de 400R a 500R, HOGENBOOM (1972c) observou o seguinte:

a) A autoincompatibilidade encontrada em certas plantas tratadas aumentava com alta temperatura;

b) Os efeitos de incompatibilidade são causados por um alelo S localizado em um fragmento extra de um cromossomo;

c) Vários alelos recessivos produzem um efeito que contribuem para uma reação incipiente de autoincompatibilidade. Isto foi concluído através da autofecundação, em três gerações, de uma planta espontânea e por observação de vários graus de autocompatibilidade na progênie. Em plantas de geração F_1 , obtidos de cruzamento entre plantas autoincompatíveis e autocompatíveis, houve, aproximadamente, segregação de 1:1.

Baseado nestes resultados, inferiu-se que a autocompatibilidade é causada por vários genes recessivos modificadores, que atuam para debilitar a reação de autoincompatibilidade. Outra hipótese foi que existe uma mutação em um gen regulatório ou genes regulatórios que atuam ao nível de estilete.

NETTANCOURT et al (1973 a) investigaram a natureza do mecanismo de autoincompatibilidade através da observação de mudanças ultraestruturais, para a qual utilizaram o microscópio eletrônico e a técnica de fluorescência. Ao contrário do trabalho de HOGENBOOM (1972 d), eles mostraram que a inibição não deteve simplesmente o crescimento dos tubos polínicos mas causa uma degradação da parede interna do tubo polínico, ao nível de estilete. Portanto, sugeriu-se que o sítio de rea

ção no sistema de autocompatibilidade localiza-se na parede do tubo polínico.

NETTANCOURT (1973 b) investigou as diferenças entre autoimpatibilidade e incompatibilidade unilateral entre *L. esculentum* e *L. peruvianum*. Foi encontrado que os dois fenômenos são controlados por um locus gametofítico e que ambos os loci estão ligados e muito próximos. Esta hipótese está em desacordo com a hipótese de HOGENBOOM (1972 b), que propõe que o cruzamento unilateral e a autoincompatibilidade são dois processos diferentes, controlados por diferentes séries de genes dominantes e codominantes, respectivamente.

5. Manipulação genético-ambiental para redução da incompatibilidade interespecífica; obtenção de híbridos F_1 e retrocruzamentos.

A quebra das barreiras de incompatibilidade do *L. peruvianum* com o *L. esculentum* se constitui num dos aspectos mais importantes para o melhorista. As sementes híbridas entre estas duas espécies não são viáveis devido, comumente, às barreiras pós-zigóticas (aborto do embrião e/ou deficiência do endosperma).

Foi feito um estudo por BARBANO & TOPOLESKI em 1981 que determinou a sequência de eventos que levam à degeneração do endosperma e embriões híbridos. Estes estudos foram realizados com auxílio de cortes histológicos de sementes em diferentes idades, provenientes de *Lycopersicon esculentum* autofecundado e em embriões provenientes do cruzamento interespecífico *Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum*. Este estudo revelou que a fertilização ocorre em óvulos de *L. esculentum*

com três dias após a polinização, tanto por pólen de *L. esculentum* como por pólen de *L. peruvianum*. Aos sete dias, sementes híbridas não mostram sinais de anormalidades no endosperma nem no seu zigoto, que nesta ocasião é unicelular. Conforme estes autores, a degeneração do endosperma é a primeira indicação de falhas anatômicas. A partir do 10º dia o endosperma se degenera e o embrião não segue estádios normais de desenvolvimento, mas se divide anormalmente, e com 17 dias o saco embrionário é preenchido por uma massa de células indiferenciadas denominada de endotêlio. A morte do embrião geralmente ocorre até o 24º dia após a polinização, devido a distúrbios no desenvolvimento do endosperma e que prejudicam a nutrição do embrião. Estes distúrbios são anormalidades mitóticas do endosperma híbrido e também do zigoto, ocasionadas por deleções e inversões em cromossomos e com a formação de pontes durante a anáfase. Pelos estudos dos autores citados acima a degeneração do embrião ocorre presumivelmente em torno do 10º e 17º dia após polinização e a cultura de embrião deve ser realizada entre estas idades, ao contrário da idade de 30 a 40 dias sugerida por SMITH, 1944.

THOMAS & PRATT (1981) produziram 12% de calos provenientes de embriões do cruzamento *L. esculentum* var. VFNT cherry com *L. peruvianum* LA 1283-4, e destes calos 90% regeneraram plantas. O fato de se obter uma porcentagem grande de embriões híbridos recuperados em meio de cultura é mais uma evidência de que deve ocorrer uma falha no sistema nutricional ou hormonal que atrapalha o seu desenvolvimento (BARBANO & TOPOLESKI, 1984). Entretanto, a maioria dos trabalhos cita que estes embriões foram retirados de sementes de tamanho normal, semelhantes a sementes de *L. esculentum*, mas de aspecto enrugado (SMITH, 1944 e ALEXANDER, 1956). Parece haver graus

de compatibilidade entre estas duas espécies, conforme as variedades ou introduções utilizadas. RICK, 1973, encontrou uma raça "Chamaya-cuvita", com características morfológicas semelhantes às do *L. peruvianum* que, quando cruzada com *L. esculentum*, desenvolve frutos que apresentaram, ocasionalmente, algumas sementes completamente desenvolvidas e produziram plantas sem técnicas artificiais. A frequência de aparecimento destas sementes foi de, aproximadamente, uma, em cinco frutos. O híbrido F_1 apresentou fenótipo típico de planta híbrida, com grande vigor e fertilidade gamética reduzida à cerca de 25% do normal. Este híbrido também apresentou autoincompatibilidade, e não se cruza facilmente com *L. esculentum*, mas esta barreira não é tão severa quanto outros híbridos com *L. esculentum*. Já em outros cruzamentos interespecíficos os embriões degeneraram sem terem formado cotilédones (BARBANO & TOPLESKI, 1984).

Para tentar quebrar a incompatibilidade entre *L. esculentum* e *L. peruvianum*, pesquisadores tem se utilizado de algumas técnicas, tais como a aplicação de raios gama, sob a forma de irradiação crônica (fonte de Co^{60} , 70 R/dia, durante 20 dias) na época da floração. Os cruzamentos realizados com as plantas irradiadas permitiram a obtenção de um número limitado de plantas férteis. No entanto, as plantas derivadas por este processo apresentaram anomalias morfológicas indesejáveis (NAGAI, 1978).

MCGUIRE & RICK (1954) citam a polinização em botão como outro artifício do qual se pode lançar mão para se contornar a incompatibilidade. TORRES, 1984, estabeleceu metodologia de cultura de ovários imaturos para o *L. esculentum* e *L. peruvianum* e sugeriu que esta técnica pode ser utilizada para obter sementes viáveis do cruzamento entre estas duas espécies.

SZETEYN (1965) e BOHN (1948) empregaram a tetraploidia para a quebra dessa barreira, tendo cruzado o tomateiro tetraplóide (pai pistilado), com o *L. peruvianum* embora, neste caso, o problema seja transferido à próxima geração. Trabalho semelhante foi realizado por KIRKHAM & HALLORAN (1982a), onde foram obtidas sementes maiores (2,5 mm). O desenvolvimento de híbridos destas sementes parece depender do pareamento e do balanço cromossômico ser favorável, o que depende dos tipos de gametas que originaram estas sementes.

A porcentagem de pegamento de frutos no tetraplóide não diferiu do conseguido no diplóide, mas a produção de sementes foi muito maior. As sementes menores também germinaram, apesar de mais lentamente (KIRKHAN & HALLORAN, 1982 b).

Além desses meios de quebra de barreiras de incompatibilidade em cruzamentos interespecíficos, RICK (1967) indica o uso de quimeras, enxertia ou então a mistura de pólen de várias plantas, com finalidade de se obter maior diversidade gamética. Para melhorar o pegamento de flores polinizadas e formação de sementes híbridas, KIKU et al (1979 a) propuseram o método de aplicar uma solução com tiamina, piridoxina e ácido ascórbico no estigma do progenitor feminino, antes da polinização.

Entre todos estes métodos, a cultura "in vitro" de embriões imaturos tem sido recomendada como o método mais apropriado para este cruzamento interespecífico. Esta técnica foi primeiramente utilizada por SMITH (1944), que efetuou o cruzamento entre *L. esculentum* var. Michigan State Forcing com *L. peruvianum* PI 128657. RICK (1953) também utilizou esta técnica para híbridos entre *L. esculentum* var. Pearson e *L. peruvianum* var. dentatum (*L. chilense*).

Quando a cultura do embrião imaturo passa por uma

fase de calo e posterior organogênese, há formação de inúmeras plantas poliplóides (THOMAS & PRATT, 1968 e PRINKHOD'KO, 1979). Às vezes são utilizadas outras espécies tais como o *L. chilense* ou *L. pimpinellifolium* como "pontes" para introduzir genes de *L. peruvianum* para o *L. esculentum*. O *L. peruvianum* var. *humifusum* foi cruzado inicialmente com o *L. chilense* e depois como o *L. esculentum*. Este híbrido mostrou compatibilidade com os três parentais, entretanto foi dada maior atenção ao cruzamento com o *L. esculentum*, devido às suas características agronômicas. Outro exemplo foi obtido por VULKOVA-ACHKOVA & STOEVA (1979), que conseguiram híbridos entre *L. peruvianum* (♂) e (*L. pimpinellifolium* X *L. esculentum* var. *cerasiforme*). HOGENBOOM (1972 d-e), obteve híbridos através desse processo, porém utilizando um *L. peruvianum* autocompatível como receptor de pólen. O aborto do embrião também ocorre neste caso em graus diferentes, porém em frequências menores que o cruzamento de *L. peruvianum* (♂) X *L. esculentum*. Neste último caso ocorre inibição dos tubos polínicos enquanto pelo sistema de autocompatibilidade de HOGENBOOM não ocorre. Outros exemplos de obtenção de híbridos interespecíficos em tomate foram conseguidos pelos seguintes autores: MCGUIRE & RICK, 1953; CHAUDHURY, 1955a, 1955b, 1955c; NETTANCOURT et al, 1974a e b; VOROB'EVA & PRINKHOD'KO, 1980; ANGORA et al, 1981 e TAYLOR & ALKUMMER, 1982. Os retrocruzamentos iniciais muitas vezes exigiram a cultura "in vitro" dos embriões imaturos, devido à persistência de deficiências do endosperma.

Retrocruzamentos de híbridos obtidos com a cultura de embriões de *L. esculentum* (♀) X *L. peruvianum*, foram obtidos por SACCARDO et al (1981), que retrocruzaram plantas híbridas F₁ com 15 cultivares diferentes de *L. esculentum*, três

das quais originaram frutos com sementes viáveis, porém somente quando o *L. esculentum* foi utilizado como progenitor feminino. Foram obtidas 12 plantas ($F_1 BC_1$) que produziram pólen em abundância e com fenótipos distintos. Eles apresentaram algumas características morfológicas de plantas híbridas e outras de *L. esculentum*. Entre as 12 plantas $F_1 BC_1$, dez apresentaram auto-compatibilidade e duas, autoincompatibilidade. O segundo retrocruzamento entre *L. esculentum* e $F_1 BC_1$ originaram em média 33 sementes normais por fruto.

Cumprе salientar que, em geral, plantas BC_1 obtidas por cultura de embrião são compatíveis com o cultivar comercial e, portanto, a partir deste estágio, segue-se a maneira convencional de melhoramento por retrocruzamento e semeadura direta em vasos.

As gerações segregantes F_2 , F_3 , BC_1 e BC_2 , etc., se constituem em populações altamente interessantes, pois possibilitam a liberação de ampla variabilidade, em decorrência do cruzamento interespecífico entre duas espécies bem distintas filogeneticamente.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Cruzamento e estratégias para auxiliar o pegamen
to.a) progenitores masculinos

Foram utilizados dois grupos de introduções de *L. pe*
ruvianum como doadores de pólen, a saber: .

a₁ - Mistura de pólen do grupo PI: PI 126928, PI 126930,
PI 126944, PI 126946, PI 128657 e PI 129146, com
comprovada resistência à várias moléstias importan
tes no tomateiro, introduzidos de IOWA (Tabela
2);

a₂ - Mistura de pólen do grupo LA: LA 371, LA 462 e
LA 444, que apresenta alto nível de resistência
ao vírus causador do "vira-cabeça" e à traça
(*Scrobipalpula absoluta*) em tomateiro. As intro
duções deste grupo foram testadas, anteriormen
te, na Seção de Hortaliças e Frutos do Instituto
Agronômico de Campinas, durante cinco anos,
e a reação foi praticamente de imunidade (NAGAI,
1975). Estas introduções foram introduzidas do
tomato Genetic Stock Center University of Califor
nia, USA.

b) progenitores femininos

Foram utilizados diversos germoplasmas de *L. es*
culentum, a saber: variedades comerciais Angela Gigante 5.000 ,
Alcobaça, Kada e Marglobo Supremo, e seleções recentes da Seção

Tabela 2 - Relação de resistência à diversas doenças de seis introduções de L. peruvianum utilizados nos cruzamentos.

Nome da doença	PI - 126928	126930	126944	126946	129146	128657
<u>Alternaria solani</u> (Pinta Preta)	+	-	-	-	+	+
Curly top vírus (Broto crespo)	+	+	+	+	-	+
<u>Fusarium oxysporum</u> (Murcha de fusarium) <u>rium P. Lycopersici</u> (Sacc.) (Raças 1 e 2)	+	+	+	-	+	+
<u>Cladosporium fulvum</u> Cke (Mofo cinzento)	+	+	+	+	+	+
<u>Pyrenochaeta lycopersici</u> (Diptero)	-	-	+	+	-	-
Root Knot nematodes (Galhas de raízes)						
raças: 1 <u>Meloidogyne</u> spp	+	+	+	+	+	+
2 <u>Meloidogyne incognita</u> (Kofoid and White)	+	+	+	+	+	+
3 <u>Meloidogyne incognita</u> acrita chitwood	+	-	+	-	-	+
4 <u>Meloidogyne javanica</u>	+	-	-	-	-	+
<u>Septoria lycopersici</u> (Pinta preta) pequena Speg	+	-	-	-	-	-
Spotted wilt vírus	+	+	+	+	+	+
<u>Stemphylium solani</u> (Queima de) Sryd & Hans, G.F. ponteiro Weber	+	-	+	-	-	-
Tobacco mosaic vírus (Mosaico)	+	+	+	+	+	+
<u>Verticillium albo-atrum</u> Reinke and Berth (Murcha de) verticilio	-	+	+	+	+	+

+ = resistência

- = sem resistência

de Hortaliças e Frutos do IAC, tais como Santa Clara I, Rio Grande e "Transamazônica" (*L. esculentum* var. *cerasiforme*), coletada em Altamira (AM).

Os materiais genéticos acima referidos foram cultivados em estufa e campo, seguindo as técnicas usuais desta cultura quanto à adubação e tratamentos fitossanitários.

Com auxílio de um aparelho vibrador foi coletado pólen de flores abertas das diversas introduções de *L. peruvianum*, em vidros de relógio de 10cm de diâmetro. O pólen coletado dos grupos PI e LA de *L. peruvianum* foi misturado, em partes iguais, dentro de cada grupo. Ocasionalmente, conservou-se o pólen coletado em cápsulas de gelatina, armazenadas em dessecador a 8-10°C, mas este foi utilizado por períodos não muito longos.

Influorescências prestes a se abrirem em cada uma das plantas dos germoplasmas de *L. esculentum*, foram emasculadas e os estigmas polinizados com misturas de pólen dos grupos acima. Este processo foi realizado com um tubo de alumínio fino, curvado na ponta, como se fosse um "cachimbo". Nesta parte curvada foi colocada a mistura de pólen, facilitando a imersão do estigma. Após a polinização, as inflorescências foram protegidas com sacos de papel. Finalmente, as inflorescências polinizadas foram marcadas com lãs de diferentes cores, para identificação das datas de polinização.

Além dos cruzamentos normais, foram empregadas algumas estratégias para auxiliar o pegamento.

- Mistura de pólen de *L. esculentum* com o pólen de *L. peruvianum*.

Utilizou-se a mistura de pólen de *L. esculentum* com

pólen das introduções de série LA de *L. peruvianum* na proporção de 10% e 90%, respectivamente. Esta técnica teve por finalidade estimular a germinação do tubo polínico ao nível estílo-estigma, e também a fertilização, visando assim obter maior número de híbridas viáveis.

- Enxertia recíproca entre *L. peruvianum* e *L. esculentum*.

Foram realizadas enxertias recíprocas tipo garfagem, utilizando as espécies *L. esculentum* ou *L. peruvianum* LA 371 como porta-enxerto. Esta técnica teve por objetivo diminuir a incompatibilidade entre as duas espécies (*L. esculentum* e *L. peruvianum*), na tentativa de se aumentar a afinidade estigma-pólen decorrente da enxertia cruzada.

- Cruzamento intermediário com a espécie *L. pimpinellifolium*.

Foi obtido um híbrido entre o *L. esculentum* Rio Grande e o *L. pimpinellifolium* NAV 1062 na Seção de Hortaliças e Frutos do IAC. O cruzamento acima é compatível e não necessita de técnicas artificiais para obtenção de híbridos. Este híbrido, por sua vez, foi cruzado com o *L. peruvianum* LA 444/1. Desta vez, entretanto, houve a necessidade de se fazer a cultura dos embriões "in vitro".

1.1. Observação sobre o desenvolvimento das sementes híbridas.

Frutos de *L. esculentum* var. Angela e frutos híbridos com o *L. peruvianum*, em diferentes estádios de desenvolvimento (Tabela 3), foram cortados transversalmente com o objetivo

Tabela 3 - Classificação em estádios de desenvolvimento de frutos imaturos híbridos provenientes do cruzamento interespecífico: *Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum* de acordo com o número de dias decorrido após a polinização. Os intervalos para os índices foram definidos pela multiplicação da medida da secção longitudinal pela secção transversal dos frutos.

Estádio	Idade em dias após polinização	Índice em cm ² para diferentes cultivares de <i>Lycopersicon esculentum</i> ***utilizados como progenitores femininos		
		Angela Gigante 5.100, Alcobaça, Kada, Marglobo Supremo e Santa Clara I 5.300	Rio Grande x NAV 1.062	Cerasiforme (transamazônica)
I	1 a 6	0 - 1	0 - 1	0 - 0,4
II	7 a 13	1 - 5	1 - 5	0,4 - 2
III	14 a 21	5 - 10	5 - 10	2 - 3
IV	22 a 30	10 - 20	10 - 20	3 - 6
V	31 a 40	20 - 30	20 - 25	6 - 8
VI	41 a 50	30 - 40		

*Avaliação nas três primeiras pencas de frutos e média de 30 frutos.

de se analisar o tamanho das sementes, sendo tomados trinta frutos de cada estágio com a finalidade de se representar melhor o tamanho da semente.

1.2. Teste de viabilidade das sementes híbridas

Parte dos frutos dos cruzamentos foram deixados nas plantas até amadurecerem (cerca de 70 dias de idade). As sementes com mucilagem, extraídas dos frutos, foram deixados em becker para fermentação. Após cerca de 3 dias, estas sementes foram colocadas em placas de petri, contendo papel de filtro embebido em água destilada, para teste de germinação. A temperatura foi mantida à $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e o fotoperíodo a 16 horas de luz (1.200 lux). Também foi testada a semeadura direta na terra, em condições de casa de vegetação.

1.3. Estudo histológico de sementes híbridas em diferentes estádios de desenvolvimento

Sementes não desenvolvidas, com diferentes idades, obtidas do cruzamento interespecífico *L. esculentum* X *L. peruvianum*, foram fixadas e em seguida submetidas à técnica histológica da parafina (JOHANSEN, 1940). Estas sementes imaturas são provenientes de cruzamentos *L. esculentum* X *L. peruvianum*, onde se utilizou uma mistura de pólen em partes iguais de diferentes introduções de espécies selvagens *L. peruvianum* (LA 444/1, LA 371, LA 462), que possuem resistência ao vírus causador da moléstia "vira-cabeça" e à traça (*Scrobipalpula absoluta*). Todas as sementes híbridas que se formaram eram pequenas, ou seja, menores ainda que sementes de *L. peruvianum*, não atingindo o desenvolvimento completo do embrião. Portanto, a

regeneração "in vitro" de plantas híbridas a partir dessas sementes tornou-se difícil, de acordo com os resultados obtidos por BARBANO & TOPOLESKI, 1984. Para tentar superar este obstáculo, sementes imaturas de cruzamentos *L. esculentum* X *L. peruvianum* foram analisadas aos 15, 20 e 25 dias após a polinização, correspondentes aos estádios III e IV de frutos. As sementes em desenvolvimento de um mesmo fruto também foram analisadas, tendo-se em vista os seguintes objetivos:

- a) Acompanhar o desenvolvimento dos embriões em formação, observando-se o período de maior ocorrência de aborto dos mesmos. Na análise histológica do saco embrionário após a fertilização, foram levados em conta o endosperma, endotélio e células embrionárias.
- b) Verificar a ocorrência ou não de gradientes de desenvolvimento dos embriões de um mesmo fruto.

As sementes foram fixadas em CARNOY (3:1 de álcool etílico e ácido acético), à temperatura ambiente. O material foi desidratado através de imersão em série em álcool butírico-terciário, sendo posteriormente incluído em bloco de parafina para os cortes em micrótomo. Foram realizados cortes seriados longitudinais e transversais de 10 a 12 μ m, os quais foram coloridos com safranina e verde-rápido (JAHANSEN, 1949). Com base em observações visuais dos cortes realizados, decidiu-se que os tempos de imersão, de 3 e 15 minutos em 5% de safranina, foram os mais satisfatórios para sementes imaturas (menores que 2mm) e grandes (2 a 3mm), respectivamente.

2. Cultura "in vitro" de embriões imaturos

2.1. Metodologia utilizada na extração de sementes imaturas dos frutos e remoção da mucilagem presente

Frutos imaturos foram lavados em água corrente e solução detergente à 1%. Os frutos foram depois imersos em hipoclorito de sódio à 2,5% (Qboa 50%) por 30 minutos e lavados 3 vezes com água estéril. Após esterilização, os frutos foram abertos com auxílio de bisturi e pinça, dentro da câmara asséptica, fazendo-se a remoção do mesocarpo e deixando-se expostas as sementes para facilitar a sua coleta. Estas sementes precisam ser esterelizadas pois dentro do fruto prevalecem condições estéreis.

Foram realizados vários experimentos para estudar o método de remoção de mucilagem das sementes de *L. esculentum* var. Angela:

- a) Hipoclorito 0,25%, com diferentes tempo de permanência nesta solução (5', 10', 20' e 30'). O tratamento controle constou de imersão em H₂O destilada por 10 minutos. Todos esses tratamentos foram agitados fortemente durante o tempo de imersão na solução de hipoclorito;
- b) Concentrações diferentes de hipoclorito, com tempo fixo de 10 minutos. As sementes de frutos imaturos foram submetidos à concentrações diferentes de hipoclorito (0,25; 0,50; 0,75 e 1,00%), durante 10 minutos. Todos os tratamentos foram agitados fortemente.

- c) Concentrações diferentes de HCl, com tempo de 10 minutos. Sementes de frutos imaturos foram submetidos à concentrações diferentes de HCl (0,1 ; 0,5; 1,0 e 25N de HCl) durante 10 minutos. Como controle usou-se H₂O por 10 minutos. Além disso foi realizado um teste utilizando-se hipoclorito a 1,0% ou H₂O por 10 minutos, para comparação do efeito do hipoclorito em ambos os progenitores utilizados;
- d) As sementes de frutos com 40 dias foram submetidas a diferentes pré-tratamentos antes da inoculação no meio de cultura, sendo estes pré-tratamentos os seguintes:
- i. Remoção da mucilagem com papel de filtro;
 - ii. Isolamento do embrião;
 - iii. Corte na base das sementes.

2.2. Meios e condições de cultura

Os meios de cultura e vidrarias foram esterilizados em autoclave à temperatura de 120°C, com pressão de uma atmosfera, durante 20 minutos. Os meios de cultura foram preparados com água destilada e desmineralizada, sendo as operações, em condições assépticas, sempre realizadas em câmara de fluxo laminar marca Veco, modelo HLFs-12. Frascos contendo o meio de cultura e explante (cerca de 4 por frasco), foram vedados com filme plástico de PVC (16,5µm de espessura) ou tampa de metal.

O meio de cultura básico empregado nos experimentos preliminares com os tipos parentais foi a solução salina de Mu

rashige & Skoog, 1962 (MS) (Tabela 4), vitaminas de acordo com Söndhal & Sharp, 1979, mio inositol (550 μ M, sacarose (30g/l) e agar (0,7%), no caso de meio sólido. Para a cultura de embriões híbridos, o meio foi enriquecido em 10mg/l de glutamina e com 100 mg/l de caseína HCl.

Os frascos, para a maioria dos experimentos, foram mantidos em sala de cultura, no escuro, por três dias e depois transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 14 horas de luz (1.200 lux), e temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$. O pH dos meios de cultura foram ajustados para 5,5, antes da adição de bacto-agar.

2.3. Cultura de sementes imaturas de frutos de autofecundação da var. Angela Gigante em diferentes estádios de desenvolvimento.

Sementes de frutos imaturos (estádios I a V) foram secas em papel de filtro e inoculadas em meio de cultura básico. Os índices de tamanho de fruto para os frutos híbridos são os mesmos que para os frutos de *L. esculentum* var. Angela. O objetivo deste teste seria o de se observar o potencial do meio de cultura utilizado para o desenvolvimento dos embriões imaturos e também observar a frequência de desenvolvimento de embriões de autofecundação nos vários estádios de desenvolvimento. A avaliação foi feita após 2 semanas de cultura, com observações quanto à influência do estágio de desenvolvimento do fruto na germinação e crescimento de plantas.

Tabela 4. Composição de sais inorgânicos de MS (Murashige & Skoog, 1962) e vitaminas de acordo com Söndahl & Sharp, 1979.

<u>Macronutrientes</u>	<u>mg/l</u>	<u>mM</u>
NH_4NO_3	1.650	20,6
KNO_3	1.900	18,79
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	2,99
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	1,50
KH_2PO_4	170	1,25
$\text{Na}_2\text{.EDTA}$	37,3	100,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	100,0
<u>Micronutrientes</u>	<u>mg/l</u>	<u>μM</u>
H_3BO_3	6,2	100,0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	100,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10,6	30,0
KI	0,83	5,0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	1,0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,1
<u>Vitaminas</u>		<u>μM</u>
Tiamina		15
Piridoxina		5
Ácido nicotínico		15

2.4. Testes preliminares quanto à resposta de sementes imaturas de *L. esculentum* var. Angela Gigante à reguladores de crescimento.

Sementes extraídas de frutos no estágio VI com aproximadamente 40 dias, foram colocadas em meio básico, adicionado de GA₃ (0,5 µM), 6-BA (5,0 µM) e NAA (0,1 µM), em diferentes combinações.

2.5. Cultura de embriões do cruzamento *L. esculentum* (var. Angela Gigante) X *L. peruvianum* (PI 126928, PI 126930, PI 126944, PI 126946, PI 128657 e PI 129146)

Frutos com idade de, aproximadamente, 14 a 21 dias (estádio III) foram utilizados nos experimentos com sementes híbridas do cruzamento *L. esculentum* série PI de *L. peruvianum*. A esterilização superficial dos frutos foi a mesma que a realizada com o *L. esculentum*, sendo que as sementes foram colocadas em frascos de 50ml de volume, contendo 10ml de meio de cultura.

As avaliações foram realizadas a cada 30 dias, sendo que, aos 70 dias, foram eliminados os materiais que não apresentaram crescimento. A seguir, são detalhados todos os experimentos realizados com estas sementes híbridas:

- a) Cerca de 260 sementes foram submetidas a um pré-tratamento com hipoclorito 0,25%, 30 minutos e colocadas em meio básico de MS;
- b) Cerca de 150 sementes foram prensadas entre duas lâminas autoclavadas com finalidade de, se romper as sementes e extrair os embriões (Técnica de Smith,

1944) e colocadas em meio básico de MS;

- c) Cerca de 960 sementes foram raspadas em papel de filtro para a remoção da mucilagem que envolve as sementes. Em seguida foram colocadas em meio enriquecido de MS, adicionado de deferentes combinações de fitorreguladores (Tabela 5).

2.6. Cultura de embriões híbridos do cruzamento *L. esculentum* (var. Angela Gigante) X *L. peruvianum* (LA 462, LA 371 e LA 444/1)

Frutos com idade entre 14 a 21 dias (estádio III) foram utilizados nos experimentos com as sementes híbridas do cruzamento de *L. esculentum* com a série LA de *L. peruvianum*.

Os frascos, com cerca de 5 sementes cada, foram colocadas diretamente em sala clara com fotoperíodo de 12 horas de luz e temperatura de 25±3°C. As avaliações foram realizadas a cada 30 dias e, aos 70 dias, foram eliminados os materiais que não apresentaram crescimento. A seguir são apresentados os experimentos realizados com as sementes híbridas citadas:

- a) Após remoção da mucilagem, 580 sementes híbridas provenientes de frutos nos estádios II, IV e V foram colocadas em meio MS enriquecido;
- b) Após remoção da mucilagem, 400 sementes híbridas provenientes de frutos nos estádios III e IV foram colocadas em meio MS enriquecido adicionado de 6-BA (5 µM) juntamente com algumas variações nas concentrações de 2,4-D(0; 1,0; 5,0 e 10 µM);

Tabela 5 - Esquema de tratamentos realizados empregando-se variações de fitorreguladores.

Tratamentos	Concentrações de fitorreguladores			em μM IAA
	GA_3	6-BA	NAA	
1	-	0,1	-	-
2	-	2,5	-	-
3	-	5,0	-	-
4	0,5	5,0	-	-
5	0,5	5,0	0,1	-
6	0,5	-	0,1	-
7	-	-	-	0,5
8	-	-	-	1,0
9	-	-	-	2,5
10	-	-	-	5,0
11	-	-	-	10,0
12	-	10,0	-	0,5
13	-	10,0	-	1,0
14	-	10,0	-	2,5*
15	-	10,0	-	5,0
16	-	10,0	-	10,0

*Calo C_{50}

Também foram colocadas 840 sementes híbridas de frutos nos estádios III, IV e V em meio básico, com 6-BA (10 μ M) e variações de IAA (0; 1,0; 2,5; 10 e 25 μ M);

c) Após remoção da mucilagem, 440 sementes híbridas extraídas de frutos nos estádios III e IV foram colocadas em meio de cultura básico de MS, adicionado dos seguintes tratamentos com extratos de constituição complexa:

- 100 g/l de extrato de batata
- 100 ml/l de água de coco
- extrato de 100 sementes imaturas de *L. esculentum*, maceradas em 3 ml de água destilada por litro de meio de cultura;

d) As tentativas de auxiliar o pegamento envolveram sempre a série LA de *L. peruvianum*. Foram inoculadas 580 sementes híbridas, extraídas de frutos de estádios variando de I a V, obtidos com a técnica de mistura de pólen de *L. esculentum* var. Angela com pólen das introduções de *L. peruvianum* (10:90%).

i. Foram inoculados 215 sementes imaturas extraídas de frutos do estágio IV provenientes de enxertia do *L. esculentum* var. Angela sobre o *L. peruvianum* LA 371. Foram também colocados 150 embriões da enxertia recíproca (*L. peruvianum* sobre *L. esculentum*).

ii. Foram inoculados cerca de 310 sementes das

seguintes variedades comerciais (*L. esculentum*) cruzados com o *L. peruvianum* LA 444/1: var. Angela, Kada, Alcobaça, Marglobo Supremo e seleções recentes da Seção de Horticultura do IAC, cedidas pelo Dr. Nagai, tais como: Santa Clara I, Rio Grande e "Transamazônica" (*L. esculentum* var. cerasiforme), coletado em Altamira (AM).

Estas sementes provenientes de frutos nos estádios III e IV foram inoculadas em diferentes meios (Tabela 6).

- iii. Após remoção da mucilagem, sementes provenientes do cruzamento (*L. esculentum* Rio Grande com *L. pimpinellifolium* NAV 1.062) X *L. peruvianum* LA 444/1 em meio de cultura rico de MS, com diferentes apresentações: sólido, líquido ou com ponte de papel de filtro. Além disso também se colocou sementes no meio "b" adicionado de 2,5 g/l de carvão ativado, 0,25 μM GA_3 e 0,50 μM de GA_3 (Tabela 7).

Tabela 6 - Cultura de embriões híbridos de diferentes variedades de tomate comercial com o *L.peruvianum* LA 444/1. Estádios de fruto III e IV.

meio de cultura	Progenitor feminino		
	Santa Clara I - 5300	Rio Grande	cerasiforme transamazônica
a/S	71	17	10
a/L	31	18	12
a/P	7	7	20
b/S	633	182	50
b/L	117	30	25
b/P	312	52	25
b + 0,25 μ M GA_3	248	114	25
b + 0,50 μ M GA_3	192	163	25
b + 1,00 μ M GA_3	117	155	29
b + 2,50 μ M GA_3	120	147	27
Total	1848	885	248

Obs: meio a: meio básico enriquecido de MS

b: meio básico enriquecido de MS, adicionado de 2,5 μ M de IAA e 10 μ M de 6-BA

S - meio sólido

L - meio líquido com agitação (60 r.p.m.)

P - meio líquido com ponte de papel de filtro

Tabela 7. Cultura de sementes imaturas provenientes do cruzamento entre o híbrido (*L. esculentum* Rio Grande com *L. pimpinellifolium* NAV 1.062) X *L. peruvianum* LA 444/1, em diferentes meios de cultura.

Meio de Cultura	Número de Sementes Inoculadas
a/S	37
a/P	21
b/S	201
b/L	57
b/P	32
b/S com carvão ativado (2,5 g/L)	33
b/S + 0,25 μM GA ₃	104
b/S + 0,50 μM GA ₃	99
Total	584

Obs: meio a: meio básico enriquecido de MS

meio b: meio básico enriquecido de MS adicionado de 2,5 μM de IAA e 10 μM de 6-BA.

3. Regeneração e adaptação de plantas híbridas a partir de calo

Da cultura "in vitro" de sementes imaturas provenientes do cruzamento entre *L. esculentum* var. Angela Gigante com uma mistura de pólen de seis introduções de *L. peruvianum* (PI 126928, PI 126930, PI 126944, PI 126946, PI 128657 e PI 129146) foi obtido uma linha de calos denominado C₅₀ a qual foi submetido à várias fragmentações e subculturas, cada 30 dias no seguinte meio de cultura: composição de sais minerais e vitaminas baseados no meio de Murashige e Skoog, 1962, sacarose 3%, 2,5 µM de IAA, 10 µM de 6-BA, em pH 5,5. As condições ambientais para manutenção desses calos foram em fotoperíodo de 12 hs de luz a 600 lux e temperatura de 25±3°C. Apesar de apresentarem aspecto friável e coloração verde clara, as gemas adventícias originadas pela morfogênese somática, se tornaram raras após algumas subculturas (10 a 12 vezes) nesse mesmo meio de cultura. Com a finalidade de induzir novas gemas adventícias, foi realizado um experimento em dialético (5 x 5) variando-se as concentrações de fitorreguladores (auxina x citocinina). Os componentes inorgânicos foram baseados no meio de Murashige & Skoog (1962) adicionado de sacarose (3%) e agar (0,8%), acertando-se o pH a 5,5. Baseado nos resultados desse experimento, foi realizado outro dialético (3 x 3) em que se repetiram as melhores combinações dos diferentes fitorreguladores para obtenção de gemas adventícias. Modificaram-se as condições de cultura dos calos para casa de vegetação sob luz natural à cerca de 2.000 lux em temperatura mínima, variando de 12-16°C e máxima de 26-36°C no período do

experimento (julho de 1983). A insolação medida através de heliógrafo foi de 70 a 100 horas.

As diferentes combinações no dialélico (5 x 5) foram: 0; 0,5; 2,5; 5,0 e 10 M de IAA e 2,5; 5,0; 10; 25 e 50 μ M de 6-BA, totalizando 25 tratamentos.

No dialélico (3 x 3) combinaram-se, respectivamente o IAA e 6-BA nas concentrações de 0; 0,5 e 2,5 μ M x 10; 25 e 50 μ M. Colocou-se nos dois experimentos para cada frasco, um calo, com cerca de 0,5 cm³, subdivididos em câmara asséptica.

Foram avaliadas as contaminações e oxidações decorrentes da transferência dos calos nos frascos de cultura, sendo portanto, variável o número de frascos com material viável para as avaliações de crescimento e regeneração dos calos.

Avaliou-se o desenvolvimento dos calos, atribuindo-se uma escala de notas de 1 a 5, após 30 dias de cultura relacionados com o peso fresco médio da seguinte maneira: de 0,20; 0,90; 1,60; 2,30 e 3,00 g respectivamente (Figura 1). Esses valores foram obtidos através da média de 10 calos. Observou-se também o número e tamanho (em cm) de gemas adventícias.

As gemas adventícias obtidas foram destacadas dos calos e colocadas em meio de cultura para enraizamento e posterior adaptação das plantas híbridas para transplante definitivo em casa de vegetação.

Esses experimentos visam desenvolver a metodologia para regeneração de plantas híbridas em alta frequência através de calos da 10^a a 12^a repicagens que perderam ou diminuíram a capacidade morfogênética. Esses calos foram obtidos pela prolongada cultura "in vitro", provenientes de embriões imaturos do cruzamento interespecífico entre *L. esculentum*

var. Angela Gigante AG 1.500 e a espécie selvagem *L. peruvianum* da série PI.

A aclimação das plantas foi feita sob condições de laboratório, utilizando-se um substrato preparado com partes iguais de vermiculita e solo arenoso. Nesta fase, as plantas ainda estão sob condições assépticas e permanecem assim por aproximadamente 20 dias. Quando as plantas apresentaram-se vigorosas, fez-se a remoção gradativa do filme de PVC e após 5 dias foram levadas para a estufa.

Como estratégia as plantas híbridas obtidas, foram rotineiramente propagadas através dos brotos laterais, para manutenção de "estoques" dos genótipos híbridos em condições para realização de cruzamentos entre híbridos e retrocruzamentos, além da identificação de possíveis F_1 's auto-compatíveis. As sementes de frutos provenientes dessas plantas irão constituir a população segregante.

4. Caracterização morfológica e isoenzimática dos híbridos F_1 obtidos

As plantas foram caracterizadas quanto à morfologia de folha, flor e fruto. Os frutos colhidos das plantas híbridas F_1 , cujas sementes dão origem às populações segregantes F_2 e F_3 , foram classificados em tamanho e estágio de desenvolvimento, de acordo com medidas tomadas da secção longitudinal e perímetro do eixo longitudinal. Esta classificação foi utilizada para caracterizar cada híbrido. A idade do fruto em cada estágio varia para os diferentes híbridos, de modo que foi considerado apenas o tamanho do fruto (Tabela 8).

A análise de isoenzimas através da técnica da eletroforese horizontal em gel de amido hidrolizado de batata foi realizada com intuito de se caracterizar bioquimicamente, por comparação com os tipos parentais, a natureza híbrida das plantas obtidas por cultura "in vitro" de embrião.

A técnica da eletroforese consiste no movimento de partículas carregadas, em um substrato, sob influência de um campo elétrico. Uma das importantes aplicações da eletroforese se refere ao estudo das proteínas, uma vez que essas são substâncias anfóteras, isto é, capazes de adquirir carga positiva ou negativa, de acordo com o pH da solução e com o tipo de tampão utilizado. Para cada proteína, existe um pH específico, denominado de ponto isoelétrico (PI), no qual sua carga elétrica é zero. No PI, a proteína, não tendo carga, não se movimenta quando submetida a um campo elétrico. Entretanto, a um pH acima do ponto isoelétrico ela migra como um ânion, ou seja, em direção ao ânodo ou polo positivo. Abaixo do PI, ela se comporta como um cátion.

Tabela 8. Classificação de frutos de híbridos F_1 , F_2 e F_3 (*L.peruvianum* X *L.esculentum*), de acordo com o seu tamanho e estágio de desenvolvimento.

ESTÁDIO	Medida da secção lon- gitudinal (mm)	Perímetro do eixo longitudinal (mm)
I	0,2	0,63
II	0,4	1,26
III	0,6	1,88
IV	0,8	2,51
VI	1,2	3,77
VII	1,4	4,40
VIII	1,6	5,02
IX	1,8	5,65
X	2,0	6,28
XI	2,2	6,91
XII	2,4	7,54
XIII	2,6	7,85
XIV	2,8	8,79

Variando-se então o pH do tampão, é possível fazer com que ocorra migração da proteína no gel do amido. Uma vez terminada a eletroforese, adiciona-se ao gel um substrato específico com o qual a proteína (enzima) reage, originando um produto. Adicionando-se então um sal (corante), também específico para cada enzima, ocorre a formação de um produto complexo colorido e insolúvel no gel. Dessa forma, pode-se visualizar, no gel, uma banda colorida, correspondente à posição de migração da enzima originalmente presente na amostra. Se a enzima for homogênea, apenas uma banda será vista no gel. No caso de a amostra analisada conter enzimas com diferentes tamanhos ou configurações espaciais, diversas frações são separadas, dando origem a diversas bandas coloridas no gel, correspondendo a várias isoenzimas. Essas formas multimoleculares de enzimas, visualizadas no gel sob forma de bandas múltiplas, é muito bem conhecida em tomate para o sistema enzimático da fosfatase ácida (APS) (MEDINA FILHO, 1980). As formas multimoleculares das enzimas (isoenzimas) são produtos de alêlos, situados em locos que codificam para enzimas específicas. Portanto, com a técnica da eletroforese pode-se relacionar diretamente a variação fenotípica (bandas) com a variação genética do material analisado. Além do mais, a grande maioria dos locos isoenzimáticos apresenta segregação mendeliana simples e interage de forma co-dominante. As bandas conhecidas e específicas aos tipos parentais são de grande auxílio na caracterização dos híbridos interespecíficos.

Foram utilizadas técnicas padronizadas (SHAW & PRASAD, 1970) com algumas modificações, sendo o equipamento utilizado aquele descrito por TANKSLEY (1979). Extratos de material vegetal foram obtidos por maceração de folíolos com bas-

tões de plástico acrílico em bandejas do mesmo material. Adicionou-se antes da maceração, 1% de glutatiamina tamponada (pH 7,5) para evitar a denaturação de enzimas, principalmente foglucoisomerase (PGI).

Após a maceração o extrato obtido foi absorvido em papel de filtro (Beckman) de 5 x 9 μ de espessura inserido no gel de amido a 12%. O gel foi submetido à uma corrente inicial de 300 volts em 25 mA e temperatura de 2 a 6°C por 20 a 39 minutos e, em seguida, a 400 volts com 30 mA por cerca de 4 horas, nas mesmas condições de temperatura. A corrente foi posteriormente interrompida e o gel foi cortado transversalmente em 4 camadas de 0,5mm, individualmente colocadas em bandejas especiais contendo as soluções de revelação para diferentes sistemas enzimáticos.

O gel de amido foi preparado com tampão triscitrato pH 8,2 e amido hidrolizado de batata na concentração de 12%.

Foram empregadas soluções de revelação com as seguintes especificações:

- APS - Black K. salr 50 mg; B-naftil ácido fosfato 1,5 ml de uma solução à 1% em 50% de água e acetona; 50 ml de tampão acetato 0,1 μ M pH 5,5.
- PGI - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 1 mg; frutose-6-fosfato 40 mg; dimetil thiazol di fenil tetrazolito bromato 10 mg; fenazina metasulfato 1 mg; glucose-6-fosfato desidrogenase 15 unidades; 50 ml de tampão tris 0,1 μ M pH 7,5.

5. Populações segregantes

5.1. Obtenção

As plantas híbridas F_1 florescem abundantemente e isso atrai muitos insetos polinizadores, principalmente abelhas. Com a finalidade de se reduzirem ao máximo intercruzamentos indesejáveis com outras plantas de tomate porventura existentes nas proximidades, os híbridos F_1 foram cultivados em local isolado, de modo que ocorressem apenas cruzamentos entre eles (cruzamento em sib). Portanto, as populações, assim obtidas, que constituem as gerações F_2 e F_3 , são de polinização aberta. Com este tipo de cruzamento, há a chance de aparecerem combinações genéticas favoráveis para resistência múltipla a diversas doenças e demais características agrônômicas, pois os híbridos F_1 são provavelmente de genótipos distintos que ocorrem nas introduções da espécie selvagem *L. peruvianum* (populações panmíticas).

Para a obtenção da geração F_2 , as sementes completamente desenvolvidas dos híbridos F_1 (de tamanho grande e médio) foram semeadas diretamente em caixas plásticas com mistura de solo arenoso, composto orgânico (1:1) e adubo mineral enquanto as sementes imaturas foram cultivadas "in vitro" no meio básico de Murashige & Skoog (1962), suplementada de 2,5 μ M IAA e 10 μ M 6BA.

Para obtenção da geração F_3 , procedeu-se da mesma maneira acima citada (plantio de híbridos F_2 em campos isolados) e colheita de frutos, separação de sementes e posterior semeadura em caixas de germinação. Neste caso, entretanto, apenas foram semeadas as sementes plenamente desenvolvidas (tamanhos grande e médio).

5.2. Avaliação morfológica e isoenzimática de híbridos nas gerações F_2 e F_3

Diversas características morfológicas foram analisadas em híbridos interespecíficos nas gerações segregantes F_2 e F_3 , tais como tamanho, formato e coloração de folha; presença ou ausência de pilosidade em folha e haste; extrusão de estigma; coloração de flor; formato, tamanho, coloração de fruto e quantidade de semente/fruto, etc.

Para detectar a natureza híbrida das plantas F_1 , utilizamos as enzimas APS e PGI. Para a verificação da segregação alélica das populações F_2 e F_3 , derivadas do cruzamento envolvendo as três introduções LA e *L. peruvianum* com o *L. esculentum* var. Angela, empregou-se apenas a enzima APS.

Na análise da eletroforese foram estudados três híbridos F_1 interespecíficos *L. esculentum* X *L. peruvianum* (F_1 17, F_1 131 e F_1 133), obtidos através de plantas, e suas respectivas gerações F_2 e F_3 .

O híbrido F_1 17, proveniente do calo C 273, deu origem a nove indivíduos na geração F_2 , sendo estudados isoenzymaticamente apenas sete deles (F_2 107, F_2 214, F_2 224, F_2 225, F_2 231, F_2 233 e F_2 235). O híbrido F_2 107 originou dez indivíduos na geração F_3 , dos quais apenas quatro foram caracterizados por eletroforese (F_3 10, F_3 11, F_3 12 e F_3 15).

Por outro lado, os híbridos F_1 131 e F_1 133, ambos provenientes do calo C 294, deram origem a quatro e três híbridos F_2 respectivamente (F_2 204, F_2 205, F_2 206 e F_2 207; F_2 200, F_2 201 e F_2 202). Todos os híbridos F_2 obtidos, neste caso, foram submetidos à análise de eletroforese. Não foi analisada a geração F_3 , no caso.

5.3. Avaliação dos híbridos F_1 e das populações segregantes F_2 e F_3 quanto à resistência ao vírus causador do "vira-cabeça".

Os híbridos F_1 obtidos, através de regeneração de calos, foram multiplicados vegetativamente. Para isso, ramos ou brotos laterais de plantas individuais foram enraizados em laminados plásticos contendo uma mistura de terra, areia e composto orgânico. As mudas, devidamente identificadas, foram submetidas à inoculação do vírus do "vira-cabeça". Por outro lado, os híbridos F_2 e F_3 foram avaliados *per se*.

Utilizaram-se, como fontes de inóculo, tecidos de folha de fumo ou de tomate do ponteiro de plantas infectadas, apresentando sintomas necróticos e com autocianina, típicos da doença.

A maceração dos tecidos infectados foi realizada com adição de solução tampão, em almofariz imerso em recipiente contendo cubos de gelo, para se manter a temperatura baixa, evitando-se assim a oxidação do substrato.

Foi utilizada 1 grama de tecido foliar para cada 10ml da solução tampão. Esta foi constituída de 39ml da solução A + 61ml da solução B, completando-se o volume para 200ml e ajustando-se o pH da solução resultante para 7,0 (solução A = $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2M; solução B = $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2M).

A inoculação foi feita empregando-se uma escova de dentes macia, umedecida com o extrato do vírus, na superfície dorsal das duas folhas mais novas de plântulas em teste. Utilizou-se limalha de ferro (carborundum) como agente abrasivo para melhor penetração do inóculo.

Para melhor avaliação da resistência, as plantas que ainda não apresentavam sintomas da doença, após 7 dias da inoculação, foram reinoculadas. Aos 20 dias, aproximadamente, observou-se a manifestação dos sintomas necróticos em forma de anel e, poucos dias depois, os sintomas de origem sistêmica (curvamento do ponteiro, sinais de antocianina em folhas, pontos necróticos e cloróticos em hastes e folhas, etc.).

Cerca de 4 híbridos F_1 , provenientes do cruzamento *L. esculentum* X *L. peruvianum*, utilizando-se o *L. pimpinelli*-*folium* como ponte, foram avaliados em casa de vegetação e no campo quanto à tolerância ao vírus do "vira-cabeça". Em casa de vegetação promoveu-se a inoculação mecânica, conforme descrito acima, enquanto no campo as plantas foram expostas naturalmente aos vetores (trips, principalmente), em época de elevada incidência da doença. Quarenta e duas plantas F_2 e 382 plantas F_3 foram testadas, através de inoculação mecânica, em casa de vegetação. Por outro lado 188 plantas F_2 e 39 plantas F_3 foram avaliadas em condições de campo.

5.4. Avaliação de resistência de híbridos F_1 interespecíficos e de populações segregantes à traça do tomate (*Scrobipalpula absoluta*)

No verão 84/85 foram avaliadas diversas introduções de tomate selvagem (*L. hirsutum* e *L. peruvianum*), variedades comerciais de tomate (*L. esculentum*), híbridos F_1 interespecíficos e gerações segregantes F_2 e F_3 , quanto ao ataque da traça (*Scrobipalpula absoluta*).

Para isso, sementes dos germoplasmas disponíveis fo

ram plantadas em vasos grandes de alumínio, em casa de vegetação e, após a germinação, procedeu-se ao desbaste, deixando-se duas plantas por vaso. Outros vasos contendo plantas de tomateiro (*L. esculentum*) altamente infectados pela traça (*Schobipalpula absoluta*), foram colocados entre as plantas a serem testadas, para servirem de foco de infecção. Desta maneira possibilitou-se a formação de ambiente propício para que os adultos (mariposas) da traça infectassem as demais plantas em testes.

Quando as plantas atingiram o pleno florescimento, foi feita avaliação visual, estimando-se a porcentagem de área foliar consumida pelo inseto.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Cruzamentos e tentativas de auxiliar pegamento

O frutos híbridos obtidos tiveram um desenvolvimento normal (Figura 2), semelhantes aos frutos das plantas-mãe. O pegamento das polinizações realizados em plantas sadias foi entre 30-40%, sendo muito prejudicado pela presença da traça (*Scrobipalpula absoluta*). Este inseto ataca preferencialmente o botão floral. O controle deste inseto é feito com inseticidas, mas tem ocorrido um alto grau de tolerância do mesmo, à maioria dos inseticidas recomendados.

Na tabela 9, são apresentados os dados referentes a número de frutos, de sementes híbridas e de sementes/fruto nos diversos cruzamentos realizados. Observa-se que houve um maior número de sementes utilizáveis por frutos nos cruzamentos envolvendo a série LA. Possivelmente em decorrência de um maior nível de compatibilidade presentes neste grupo de introduções.

Entre as tentativas de polinização, para auxiliar a obtenção de híbridos interespecíficos temos:

- Mistura de pólen de *L. esculentum* com pólen de *L. peruvianum*

Produziu-se num mesmo fruto, sementes semelhantes ao tipo parental autofecundado (*L. esculentum*) e outras menores idênticas aos padrões obtidos de cruzamento interespecífico, demonstrando incompatibilidade. A proporção de ocorrência dessas sementes foi de 11:1 para o tipo cruzamento e tipo parental respectivamente.

Tabela 9. Relação de números de frutos e sementes híbridas utilizadas para cultura "in vitro", obtidos nos diversos períodos de polinização em campo e estufa.

Período Polinização	Série de <i>L. peruv.</i> utilizado	Local de Plantio	nº fruto	nº sem. híbrida inocul.	nº sem. híbrida / fruto
20/06/81 a 21/07/81	PI	estufa	44	410	9,3
19/08/81 a 01/09/81	PI	estufa	60	660	11,0
18/05/82 a 07/07/82	LA	estufa	62	1972	31,8
24/01/83* a 01/03/83	LA	estufa	29	560+ 50 grdes	19,3
23/03/83** a 13/05/83	LA	campo	44	1240	28,2
29/06/83 a 10/07/83	LA	estufa	16	440	27,5
11/08/83 a 10/01/84	LA	campo	10	215	21,5
11/03/83 a 10/05/83	PI 1283	campo	10	220	22,0
01/08/83 a 30/09/83**	LA 444-1	estufa	142	3565	25,1
Total			417	9277	22,25

* mistura de pólen de *L. esculentum* var. Angela (10%) ao pólen dos LA.

** utilização de diferentes variedades comerciais.

Tanto na enxertia recíproca entre *L. peruvianum* e *L. esculentum* como com utilização de porte de *L. pimpinellifolium* as sementes apresentaram o mesmo tamanho que as sementes híbridas por cruzamento convencional.

1.1. Observações sobre desenvolvimento das sementes híbridas

Cortes transversais de fruto de cruzamento e fruto de *L. esculentum* autofecundado, ambos no estágio IV, mostram comparativamente diferenças de tamanho entre as sementes (Figura 3).

Comparando-se o desenvolvimento de sementes híbridas e sementes de frutos de *L. esculentum* (planta essencialmente autógama) (Figura 4) pode-se observar que as sementes do cruzamento interespecífico cessaram o seu desenvolvimento quando o fruto atingiu aproximadamente o estágio II (7 a 13 dias após a polinização). Este esquema apresenta os diferentes estádios de frutos, contendo o tamanho de sementes mais frequentemente encontradas (média de 30 frutos).

A parada no desenvolvimento da semente híbrida, provavelmente ocorre por uma deficiência de um sistema nutricional e/ou hormonal. O emprego de um meio artificial que propicie melhores condições para a sobrevivência do embrião pode suplantar este obstáculo (SMITH, 1944).

1.2. Teste da viabilidade das sementes híbridas

Sementes híbridas apresentam tamanho anormal (1mm de comprimento), provavelmente não apresentam embrião completamente formado, conseqüentemente não se conseguiu obter plan

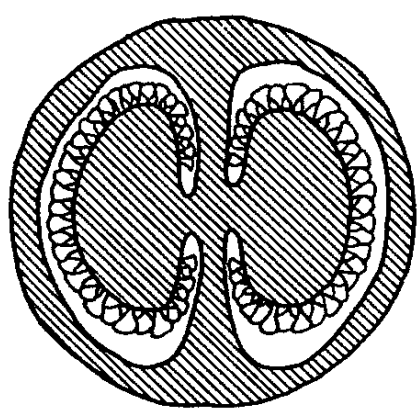
Figura 1. Caracterização de crescimento de calos. Avaliação visual por volume de calos com notas variando de 1 a 5, representando em peso médio (em gramas) de 0,20; 0,90; 1,60; 2,30 e 3,00g, respectivamente.

Figura 2. Detalhe de desenvolvimento de frutos híbridos ainda em fase imatura, onde o *L. esculentum* var. Angela foi atualizado como receptora da mistura de pólen de LA 444-1; LA 371 e LA 462.

Figura 3. Cortes transversais de fruto híbrido (A) e fruto de *L. esculentum* var. Angela autofecundado (B). Nota-se que as sementes do fruto híbrido pararam de crescer (setas). Ambos os frutos estão no IV estágio de desenvolvimento.

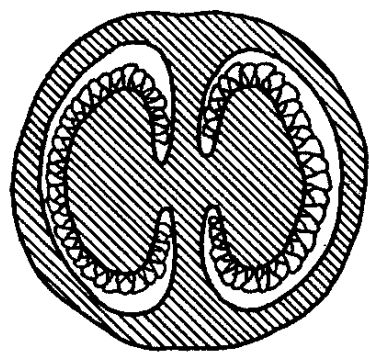


FRUTOS VAR. ÂNGELA - CORTE TRANSVERSAL



VI

54,5mm



V

47,3mm



IV

38,2mm



III

27,3mm



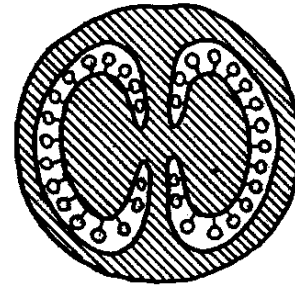
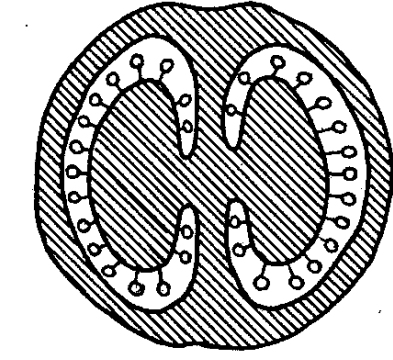
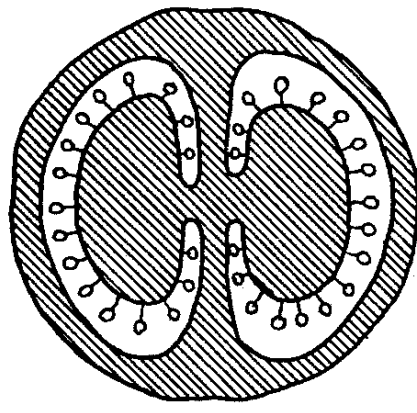
II

16,4mm



I

5,5mm



FRUTOS HÍBRIDOS

I-6

7-13

14-21

22-30

31-40

41-50

DIAS APÓS POLINIZAÇÃO

FIGURA 4. Diagrama de estádios de frutos e sementes de *L. esculentum* var. Ângela e os frutos de cruzamento

tas por nenhum dos métodos de semeadura direta utilizados.

1.3. Estudo histológico de sementes híbridas em diferentes estádios de desenvolvimento

Como consequência da fecundação e não havendo problemas de incompatibilidade que afete o desenvolvimento dos tubos polínicos, ocorre a divisão do núcleo generativo em dois, sendo que um deles se funde com a oosfera, formando o zigoto ($2n$) e o outro funde-se com os dois núcleos polares, resultando na formação do endosperma ($3n$), tecido que nutre o embrião. Em geral, o núcleo do endosperma se divide primeiro e mais rapidamente, enquanto que o núcleo do zigoto se divide mais tardiamente, logo após a primeira divisão do endosperma.

BARBANO & TOPOLESKI (1984) acompanharam o desenvolvimento de embriões normais de sementes autofecundadas de *L. esculentum* (E x E) e embriões de sementes híbridas entre *L. esculentum* var. Vendor X *L. peruvianum* PI 126944. Segundo o autor, em ambas as polinizações houve a fertilização após 3 dias, tendo ocorrido impedimento do desenvolvimento do zigoto até a maturidade apenas no embrião de origem híbrida. Portanto, de uma maneira geral, a barreira na produção dos híbridos interespecíficos, isto é, ocorre uma degeneração do embrião, antes da diferenciação dos cotilédones. (COOPER & BRINK, 1940; SACHET, 1948; WEAVER, 1957; RAPPAPORT, 1965). Apesar de se conhecer através da literatura, a existência de barreiras a nível de iniciação da germinação do pólen no estigma, ou interrupção do desenvolvimento do tubo polínico no estilete em vários níveis (NETTANCOURT et al., 1974a e b), nos cruzamentos interespecíficos *L. esculentum* X *L. peruvianum* realizados,

notou-se que a maioria das sementes híbridas apresentavam células embrionárias ou embriões em formação. Esse fato sugere que ocorre a fertilização em frequência razoável, provavelmente pela diversidade gamética utilizada, ao se utilizar mistura de pólen de várias plantas de diferentes introduções de *L. peruvianum*, sendo que a falta de desenvolvimento completo do embrião, aparentemente deve-se a problemas de incompatibilidade pós-zigótica, como citado por ALLARD, 1960. Provavelmente os mesmos mecanismos de incompatibilidade permanecem no primeiro retrocruzamento do híbrido (F_1) para a espécie *L. esculentum* (ALEXANDER, 1963; THOMAS & PRATT, 1981).

Cortes histológicos de sementes imaturas aos 7 dias após a polinização, mostraram um zigoto unicelular e endosperma já formado, conforme resultados obtidos por BARBANO & TOPOLESKI, 1984. As anormalidades começam a ocorrer, em geral, a partir dos 10 dias de polinização nos cruzamentos envolvendo *L. esculentum* X *L. peruvianum* (E x P), para os progenitores em questão. Enquanto o embrião E x E se encontra no estágio globular, o embrião E x P apresenta uma forma alongada (claviforme), não progredindo no seu desenvolvimento normal.

A morte do embrião em cruzamentos interespecíficos começa, normalmente, em função da distribuição anormal dos nutrientes do tecido maternal para o endosperma, como já foi descrito por COOPER & BRINK (1940), em *Nicotiana*. O endosperma deficiente, talvez pela singamia incompleta (fusão dupla e não tripla de núcleos) é uma característica evidente em muitos cruzamentos interespecíficos e o endotélio (camada mais interna do integumento) prolifera para formar um tecido tumoral (RAPPAPORT, 1965; KAPIL & TINARI, 1978). Entretanto, não

se acredita que apenas a proliferação do endotélio seja o fator causal da degeneração e reabsorção do endosperma no cruzamento interespecífico *L. esculentum* X *L. peruvianum* (BARBANO & TOPOLESKI, 1984). A causa primária do colapso do endosperma e consequentemente do embrião não é conhecida, mas o fator provável parece ser mais um desbalanceamento nos reguladores de crescimento e no metabolismo das células, criando condições desfavoráveis para as células embrionárias.

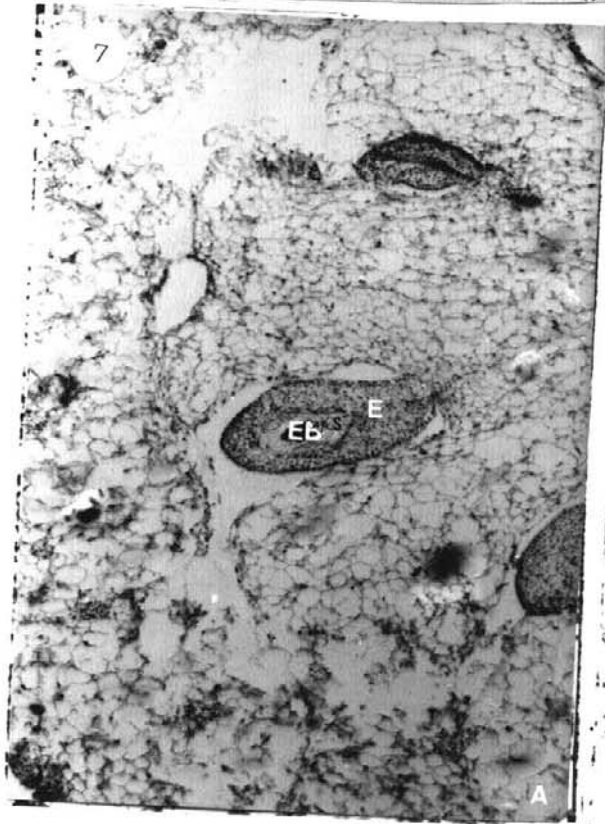
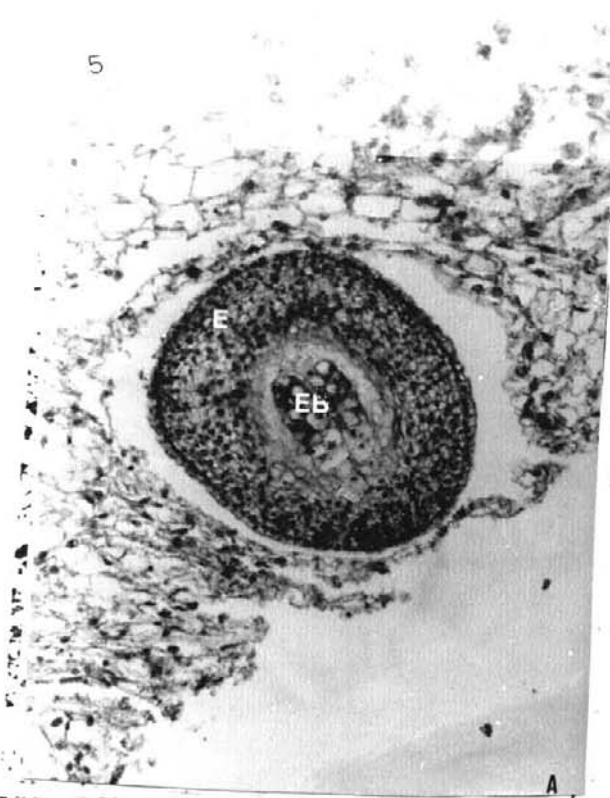
SCHULZ & JENSEN, 1969; NEWCOMB & FOWKE, 1974; YEUNG & SUSSEX, 1979; YEUNG, 1980, constataram que o suspensor está envolvido ativamente na absorção e transporte de nutrientes do endosperma para o embrião. Por outro lado, essa estrutura, também deve estar envolvida no fornecimento e troca de metabólitos específicos requeridos para os estádios iniciais de desenvolvimento do embrião (SATINA & RIESTSEMA, 1959; PRITCHARD, 1964; CORSI, 1974; CIONINI et al., 1976). Estudos histológicos de HAG et al. (1973) mostraram claramente que a morte do embrião imaturo em híbridos interespecíficos de *Phaseolus* é devido à anormalidades nas funções do suspensor.

Observações realizadas, na presente pesquisa, em cortes seriados de sementes híbridas com 15 dias após a polinização, apresentam no seu interior uma massa de células, sem forma definida, cujas paredes são delgadas e os núcleos bem visíveis, tratando-se provavelmente, de células embrionárias em divisão (Figura 5 e 6).

Algumas sementes, com 20 dias após a polinização, já apresentavam uma degeneração do embrião (Figura 7 e 8). Nota-se que o espaço vazio do saco embrionário foi preenchido pelo en

Figura 5.6. Fotomicrografias de secção transversal de semente híbrida em desenvolvimento do cruzamento interespecífico de *L. esculentum* x *L. peruvianum* com 15 dias após a polinização. Notam-se células embrionárias no seu interior, formando uma massa de células sem forma definida provavelmente em função de divisões desordenadas. O espaço vazio, entre o endosperma (E) e as células embrionárias (Eb), sugerem divisões celulares lentas, por insuficiência nutricional e/ou hormonal, não preenchendo a totalidade do saco embrionário (5=157 x 6=628X) .

Figura 7.8. Fotomicrografias de secção longitudinal de semente híbrida em desenvolvimento com 20 dias após a polinização. As células embrionárias apresentam-se em degeneração, mas notam-se ainda algumas células intactas (setas). Supõe-se que a degeneração do embrião em formação seja consequência do "colapso" das células do endosperma (E) próximo ao suspensor (s). Nesse espaço forma-se tecido endotelial (7 = 62,8; 8 = 157X).



dotélio, mas ainda ocorrem algumas células embrionárias remanescentes (setas). Supõe-se que a degeneração do embrião em formação, seja consequência do "colapso" das células do endosperma próximo ao suspensor (s), formando em seguida tecido endotelial ou tumoral. Normalmente, o embrião seria nutrido pelo endosperma, via suspensor, no decorrer de seu desenvolvimento ocupando o espaço do saco embrionário, consumindo parcialmente ou totalmente o endosperma conforme a espécie.

O aborto precoce do embrião, além da falta dos cotilédones, são algumas das causas que tornam a cultura "in vitro" muito difícil (RAGHAVAN, 1966).

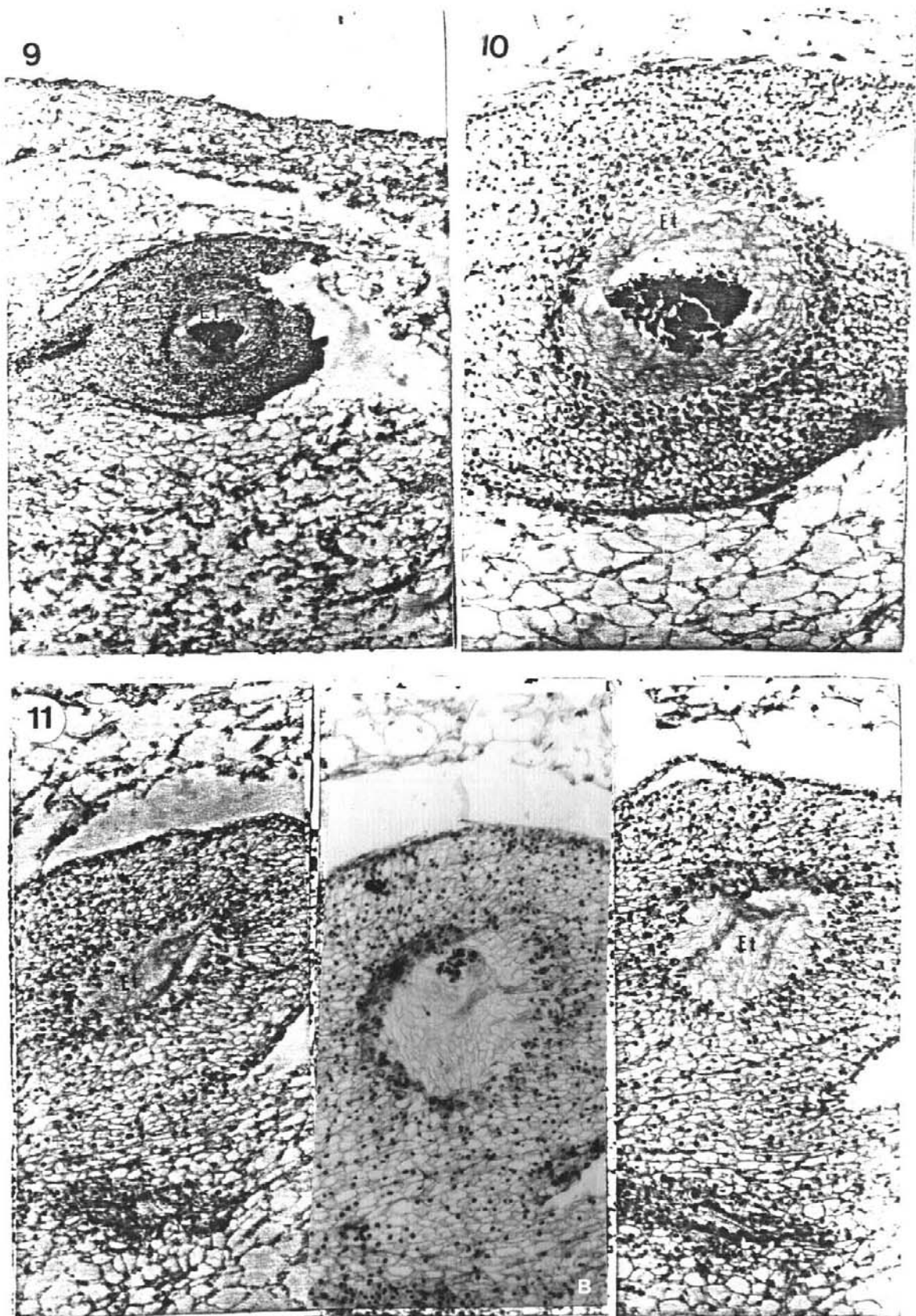
Em cortes de sementes após 25 dias da polinização, verificou-se o "colapso" total do endosperma, assim como dos embriões (Figuras 9, 10 e 11).

SMITH, 1944; CHOUNDHURY, 1955 a, b e c, encontraram sementes de tamanho grande, semelhante às sementes autofecundadas de *L. esculentum* (de 2mm a 3mm de comprimento), em frutos de origem híbrida, sendo apenas estas cultivadas com sucesso. Esses autores ainda descrevem que as sementes grandes são encontradas somente quando a planta é cultivada em condições ótimas de crescimento.

Em nosso trabalho apenas se formaram sementes híbridas E x P menores quando comparadas à espécie comercial (ExE) e o estágio de desenvolvimento dos embriões também num estágio muito precoce, talvez em virtude da maior incompatibilidade presente nos materiais genéticos utilizados. A indução de plantas híbridas "in vitro" diretamente destas sementes de tamanho pequeno é muito difícil. Por isso optou-se para a indu-

Figura 9.10. Secção longitudinal de semente híbrida em desenvolvimento com 25 dias após a polinização. Nota-se degeneração das células do embrião, concomitante às células do endosperma. Detalhe de células endoteliais (Et) proliferadas ao redor do embrião (E) em formação ($9 = 62,8 \times 10 = 157X$).

Figura 11. Cortes em série (A, B e C) de semente híbrida em desenvolvimento com 25 dias após a polinização. Nota-se ausência de células embrionárias nos dois extremos, e ao centro poucas células remanescentes denotando estágio avançado de degeneração do embrião (Eb). Nota-se espaço vazio do saco embrionário, preenchido por tecido endotelial ($A = B = C = 157X$).



ção inicial de calos das células embrionárias, de onde posteriormente são regeneradas as plantas híbridas.

O fato de se ter conseguido obter plantas híbridas a partir da cultura "in vitro" de sementes imaturas, e mesmo após 30 dias da polinização, é uma evidência de que, em certos casos, as células embrionárias permanecem viáveis por algum tempo, mesmo após a degeneração do endosperma.

Conforme NETTANCOURT et al, 1974 a, podem ocorrer diversos graus de incompatibilidade, conforme a constituição genética do pólen e óvulo. Analisando-se diferentes sementes em desenvolvimento num mesmo fruto, observamos com frequência embriões em estádios diferentes, sugerindo a ocorrência de um certo "gradiente" de tempo para fertilização dos óvulos em desenvolvimento no interior do ovário

É importante lembrar que a melhor idade para inoculação dos embriões híbridos dos progenitores por nós utilizados, ou seja, *L. esculentum* cv Angela Gigante e *L. peruviana* (LA 444/1, LA 371 e LA 462) é entre 15 a 20 dias após a polinização.

2. Cultura "in vitro" de embriões imaturos

2.1. Remoção da mucilagem presente nas sementes e metodologia utilizada na extração de sementes imaturas dos frutos

A mucilagem das sementes devem ser removidos para não interferência dos inibidores de germinação dos testes para adequação de meios de cultura e das condições ambientais de manutenção dos tecidos vegetais em desenvolvimento.

O desenvolvimento de metodologia, realizada com sementes de autofecundação da var. Angela Gigante, visou posterior aplicação para as sementes de origem híbrida.

Assim, são comentados sucintamente os resultados dentro de cada experimento realizado:

a) Hipoclorito 0,25% (Qboa a 5%) com diferentes tempos de permanência nesta solução: Sementes de *L. esculentum* var. Angela, submetida a um pré-tratamento com Hipoclorito, apresentam uma boa germinação, e aumenta conforme o tempo de contato com esta solução (Tabela 10). O Hipoclorito 0,25% por 20 minutos, promove boa germinação (68%) e ótimo crescimento ($\bar{X}=1,82\text{cm}$) quando comparado com o tempo de 30 minutos ($\bar{X}=1,33\text{cm}$).

b) Concentrações diferentes de hipoclorito, com tempo fixo de 10 minutos: A porcentagem de germinação melhora, conforme o aumento da concentração de hipoclorito. O melhor tratamento é de 1% (Qboa a 20%) por 10 minutos, atingindo 82% de germinação. Soluções muito concentradas de hipoclorito, fazem com que as sementes fiquem esbranquiçadas e consequentemente não germinem (Tabela 11).

c) Concentrações diferentes de HCl, com tempo fixo de 10 minutos: O melhor tratamento foi 0,1N HCl por 10 minutos. Concentrações maiores são tóxicas para as sementes (Tabela 12).

d) Técnicas aplicadas às sementes para obter melhor germinação: A remoção da mucilagem através da raspagem em papel

Tabela 10. Remoção da mucilagem de sementes provenientes de frutos autofecundados (40 dias) de *L. esculentum* var. Angela, utilizando-se Hipoclorito 0,25% em diferentes tempos. Avaliação feita após duas semanas de cultura em meio bá*s*ico MS, enriquecido.

Tratamento	nº sem. inoc.	nº sem. germ.	% germ.	cresciennto (cm)					
				0,5	1,0	2,0	3,0	total	$\bar{x}$
controle H ₂ O - 10'	24	2	8,3	-	2	-	-	2,0	1,00
NaCl - 0,25% - 5'	32	16	50,0	4	7	4	1	20,0	1,25
NaCl - 0,25% - 10'	24	11	39,2	1	6	3	1	15,3	1,39
NaCl - 0,25% - 15'	32	20	62,5	4	6	6	4	32,0	1,60
NaCl - 0,25% - 20'	28	19	67,9	3	5	5	6	34,5	1,82
NaCl - 0,25% - 30'	28	26	92,9	7	11	4	4	34,5	1,33

Tabela 11. Remoção da mucilagem de sementes provenientes de frutos autofecundados (40 dias) de *L. esculentum* var. Angela, utilizando-se concentrações diferentes de Hipoclorito com tempó fixo de 10 minutos. Avaliação feita após duas se*manas* de cultura em meio bá*s*ico MS, enriquecido.

Tratamento	nº sem. inoc.	nº sem. germ.	% germ.	crescimento (cm)					total	$\bar{x}$
				0,5	1,0	2,0	3,0	4,0		
controle H ₂ O - 10'	32	1	3,13	1	-	-	-	-	0,5	0,50
NaCl - 0,25% - 10'	32	12	37,50	3	5	2	1	-	5,5	1,13
NaCl - 0,50% - 10'	32	17	53,13	6	5	4	1	1	23,0	1,35
NaCl - 0,75% - 10'	32	20	62,50	10	4	1	3	2	28,0	1,40
NaCl - 1,00% - 10'	44	36	81,82	9	9	7	5	5	62,5	1,79

de filtro, apresenta um ótimo resultado (74% de germinação). (Tabela 13). Isolando-se o embrião ou fazendo-se um corte na base da semente para facilitar o contato do embrião em desenvolvimento com o meio de cultura, elimina-se completamente esse fator em sementes de *L. esculentum* com cerca de 40 dias de idade.

2.2. Cultura de sementes imaturas de frutos de autofecundação da variedade Angela Gigante em diferentes estádios de desenvolvimento

Sementes híbridas praticamente cessam o desenvolvimento no estágio II e apresentam apenas células embrionárias sem forma definida enquanto que as sementes do tomateiro comercial com a idade de 7 dias aproximadamente (estádio II) apresentam um embrião em estágio globular (TORRES, 1984). Sementes provenientes de frutos no estágio II de *L. esculentum* var. Angela autofecundado quando cultivado em meio básico de MS, apresentam uma baixa porcentagem de germinação, ou seja, 1% (Tabela 14). A germinação das sementes imaturas deste cultivar comercial melhora, conforme o aumento do estágio, e a diminuição da germinação no estágio V, provavelmente devido à inibidores de crescimento presentes em resíduos da mucilagem no tegumento das sementes.

Baseado neste teste, o meio de cultura básico para a cultura de embriões deverá ser enriquecido com uma fonte de vitaminas e aminoácidos, em vista do baixo índice de crescimento ocorrido principalmente nos estádios mais novos.

Tabela 12. Remoção da mucilagem de sementes de autofecundação (40 dias) de *L. esculentum* var. Angela, utilizando-se concentrações diferentes de HCl e tempo fixo de 10 minutos. Avaliação feita após duas semanas de cultura em meio básico MS, enriquecido.

Tratamento	nº sem. inoc.	nº sem. germ.	%	crescimento (cm)							total	$\bar{x}$
				0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0			
controle H ₂ O - 10'	24	3	12,5	1	-	1	1	-	-	6,5	2,17	
0,1N HCl - 10'	24	18	75,0	4	4	4	3	2	1	36,0	2,00	
0,5N HCl - 10'	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1,0N HCl - 10'	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25N HCl - 10'	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabela 13. Germinação de sementes e posterior crescimento das plantas, provenientes de frutos verdes de *L. esculentum* var. Angela, com cerca de 40 dias de idade. Dados de crescimento após duas semanas de cultura em meio básico MS, enriquecido.

Tratamento	nº sem. inoc.	nº sem. germ.	%	crescimento (cm)							total	$\bar{x}$
				0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0		
papel de filtro	42	31	73,81	21	3	4	2	1	-	-	31,5	0,75
embrião isolado	40	40	100,00	6	10	7	6	4	3	4	100,0	2,50
semente cortada na base	40	40	100,00	5	12	10	10	2	1	-	77,5	1,94

Tabela 14. Indução de plantas a partir de embriões imaturos de diferentes estádios de frutos *L. esculentum* var. Angela autopolinizados. Avaliação feita após 30 dias de cultura.

Estádio do fruto	nº sem. inoc.	nº sem. germ.	%	crescimento (cm)									
				0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	total	$\bar{X}$	
I	140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
II	210	2	0,95	-	1	1	-	-	-	-	3,0	1,50	
III	175	83	47,43	6	16	21	21	5	-	-	144	1,73	
IV	100	84	84,00	9	8	16	15	51	15	7	265,5	3,16	
V	40	12	30,00	5	1	3	2	1	-	-	19,5	1,63	

2.3. Testes preliminares quanto à resposta de sementes imaturas de *L. esculentum* var. Angela Gigante à reguladores de crescimento

Sementes provenientes de frutos com 40 dias após a polinização já apresentam embriões capazes de se desenvolver em plantas diretamente quando cultivadas em meio de cultura. Estas sementes germinam em meio de Murashige e Skoog, após remoção de inibidores, sem necessidade de reguladores de crescimento. Este experimento mostrou que 6-BA ($5,0 \mu\text{M}$) incrementou ligeiramente a germinação (Tabela 15). No entanto a adição do GA_3 favorece a germinação quando comparada com controle. O GA_3 ($0,5 \mu\text{M}$) adicionado de NAA ($0,1 \mu\text{M}$) diminuiu a porcentagem de germinação favorecendo a formação de calos anômalos. As plantas se apresentaram melhores quando originadas em meio MS sem reguladores de crescimento.

2.4. Cultura de embriões imaturos do cruzamento *L. esculentum* (var. Angela Gigante) X *L. peruvianum* (PI 126928, PI 126930, PI 126944, PI 126946, PI 128657 e PI 129146)

Utilizou-se de vários métodos para eliminar os inibidores de germinação, já testadas em sementes imaturas de *L. esculentum* var. Angela. Entre os métodos utilizados, a raspagem da semente híbrida em papel de filtro, foi a mais favorável, pela sua praticidade e também por lesar menos estas sementes mais delicadas.

A semente híbrida, conforme o estudo citológico realizado, apresenta apenas grupos de células sem forma defini-

Tabela 15. Porcentagem de germinação de sementes provenientes de frutos imaturos *L. esculentum* var. Angela, com aproximadamente 40 dias de idade, no meio básico de MS adicionado de GA₃ (0,5µM), 6BA(5,0µM) e NAA (0,1µM) em diferentes combinações. Avaliação feita após 3 semanas de cultura.

Tratamentos	Tot. inoc.	GA ₃ (µM)	6-BA (µM)	NAA (µM)	% Germinação
1	24	0	0	0	54,17
2	24	0,5	0	0	75,00
3	24	0	5,0	0	83,33
4	24	0,5	5,0	0	70,83
5	24	0,5	0	0,1	33,33
6	24	0	0	0,1	54,17

da, sendo essencial algum estímulo hormonal para a formação de calos. THOMAS & PRATT, 1981 descreveram sucesso na utilização de reguladores de crescimento com finalidade de induzir calos a partir do embrião imaturo.

Em nossos experimentos com fitorreguladores, também houve aparecimento de calo com aspecto friável e coloração verde devido ao seu cultivo na luz (Figura 12). Este calo não apresentou organogênese logo nas primeiras repicagens mas quando colocado em maior intensidade de luz (3.000 lux) apresentou organogênese (Figura 13). Este calo foi denominado de C₅₀, sendo proveniente de semente extraída de fruto em estado de desenvolvimento III e colocado em meio de cultura básico adicionado de 2,5 µM de IAA com 10 µM de 6-BA.

2.5. Cultura de sementes híbridas do cruzamento *L. esculentum* (var. Angela Gigante) X *L. peruvianum* (LA 371. LA 462 e LA 444/1)

No cruzamento interespecífico envolvendo o grupo LA da espécie *L. peruvianum*, ocorre desenvolvimento de frutos e sementes semelhantes aos obtidos na série PI. Conseguiu-se a regeneração de plantas híbridas, através da fase intermediária de calos, com maior ou menor sucesso, dependendo do meio de cultura utilizado. Por outro lado, a regeneração de plantas híbridas, diretamente a partir de sementes, teve insucesso total. Reguladores de crescimento quando em concentrações e combinações favoráveis, possibilitam o crescimento de embriões imaturos. O melhor resultado foi obtido quando se removeu a mucilagem em papel de filtro e colocação imediata em meio básico de MS adicionado de 6-BA com 2,5 µM de IAA ou

Figura 12. Amostra de duas réplicas de calo C₅₀ com excelente desenvolvimento aos 30 dias de sub cultura. Este calo é proveniente da cultura de embrião imaturo obtido do cruzamento interespecífico *Lycopersicon esculentum* var. Angela com seis introduções de *Lycopersicon peruvianum* (PI 126928, PI 123930, PI 126944, PI 126946, PI 128657 e PI 129146).

Figura 13. Regeneração de brotos do calo C₅₀ após 60 dias de cultura.



10 μM de IAA. Houve o crescimento de calos a partir de duas sementes do tipo pequeno, ambas provenientes de estágio de fruto III, que foram denominados de calo C_{75} e calo C_{273} .

O calo C_{75} , teve a formação de gemas adventícias anormais durante o processo de morfogênese somática. Foi obtido em meio enriquecido de MS, adicionado de 10 μM de IAA e 10 μM de 6-BA. O outro calo, C_{273} , foi obtido em meio MS enriquecido adicionado de 2,5 μM de IAA e 10 μM de 6-BA, apresentando intensa organogênese.

Para o processo de organogênese do calo C_{273} , não houve necessidade de indução através de adição de fitorreguladores, sendo que limitamo-nos apenas a manter os calos sob regime de alta intensidade luminosa (3.000 lux), temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e subculturas periódicas em meio básico enriquecido, a cada 50 dias. Por outro lado, após várias subculturas, o calo C_{75} oxidou completamente, produzindo apenas algumas gemas adventícias anormais, que não enraizaram.

Substâncias complexas como água de côco, extrato de sementes imaturas (100 sementes/3ml de H_2O) e extrato de batata (100 g/l) apresentam uma série de vitaminas e reguladores de crescimento (HEATON, 1929; CUTTER, Jr. & WILSON, 1952). No entanto em nossos experimentos esses extratos quando adicionados ao meio enriquecido de MS não proporcionaram crescimento dos embriões.

Entre as tentativas de cruzamento para auxiliar o pegamento, a mistura de pólen de *L. peruvianum*, se destacou, com formação de calo, denominando C_{294} . Este calo foi originado em meio básico enriquecido de MS, adicionado de 10 μM de 6-BA e 2,5 μM de IAA.

Esse calo, desenvolveu-se rapidamente, apresentando aspecto friável (Figura 14) e após a transferência para intensidade luminosa de 3.000 lux com fotoperíodo de 16 horas de luz, e temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, estabeleceu-se o processo de organogênese. A baixa frequência de obtenção de calos (apenas 1 em 560 sementes híbridas) permite concluir que essa prática de mistura de pólen não incrementou substancialmente a obtenção de híbridos de maneira a se preconizar tal procedimento. (Tabela 16).

Em cruzamentos realizados em plantas enxertadas (Figura 15), notou-se que as sementes apresentaram o mesmo tamanho que as sementes híbridas por cruzamento convencional. Tudo indica que o grau de incompatibilidade entre a espécie *L. esculentum* var. Angela e a mistura desses três espécies de *L. peruvianum* (LA 444/1, LA 371 e LA 462) provavelmente deve ser muito grande, pois há muita dificuldade em se obter híbridos, mesmo com auxílio de tentativas de auxiliar o pegamento.

Diferentes variedades de *L. esculentum* foram polinizadas com pólen de *L. peruvianum* LA 444/1, como tentativa de se encontrar um cruzamento mais compatível. Foi obtido um calo denominado NRG (Figura 16). O cultivar comercial utilizado foi a planta Rio Grande. Este calo foi posteriormente repicado em meio com fitorreguladores, permanecendo porém pouco friável e sem organogênese.

Muitos embriões quando cultivados em meio básico enriquecido com carvão originaram calos anômalos e muito pequenos que estacionaram o seu desenvolvimento com 2 a 3mm de comprimento e oxidaram após subculturas. Trata-se provavelmente de uma reação de tecidos da semente imatura aos reguladores de

Tabela 16. Porcentagem de sementes do tipo grande (*L. esculentum*) e pequenas (híbridas) extraídas de frutos obtidos pela utilização da técnica de mistura de pólen de *Angela Gigante* (10%) ao pólen das espécies selvagens (90%).

Estádio	Número de sementes inoc.		crescimento	
	prováveis híbridas	grandes	prováveis híbridas	grandes
I	10	-	-	-
III	264	8	-	4 (50%)
IV	276	41	1*	23 (56%)
V	10	1	-	-
TOTAL	560	50	1	27

* Calo C₂₉₄

de crescimento (Figura 17).

Pelo número de sementes inoculadas e resultados obtidos, *L. peruvianum* LA 444/1 trata-se provavelmente de espécie selvagem altamente incompatível com qualquer uma das variedades comerciais testadas. (Tabela 17).

As sementes provenientes de cruzamento intermediário com a espécie *L. pimpinellifolium* apresentam tamanho semelhante aos obtidos em cruzamentos anteriores, mas sugere-se maior desenvolvimento do embrião, pois houve maior facilidade de obtenção de calo. Entretanto, com a cultura das sementes deste cruzamento triplo, também apareceram frequentemente calos anômalos, sem organogênese. Um calo com organogênese e crescimento rápido foi originado em meio b/S, adicionado de $0,25 \mu\text{M GA}_3$. Este calo denominado por CN, produziu plantas (CN-01, CN-04) de aspecto muito vigoroso, folhas verdes escuras e recortadas e produziu frutos amarelos.

A utilização da espécie compatível *L. pimpinellifolium* em cruzamento intermediário com *L. esculentum* e posterior cruzamento com *L. peruvianum* parece melhorar a taxa de obtenção de calos, talvez pelo maior desenvolvimento do embrião, possibilitando melhor atuação do meio de cultura. Cruzamentos intermediários com outras espécies selvagens de maior compatibilidade com *L. peruvianum*, do que *L. pimpinellifolium*, tais como a espécie *L. hirsutum* e *L. chilense* parecem promissores.

3. Regeneração e adaptação de plantas híbridas F_1 a partir de calos

Tabela 17. Porcentagem de calos anômalos em cruzamento envolvendo cultivares comerciais.

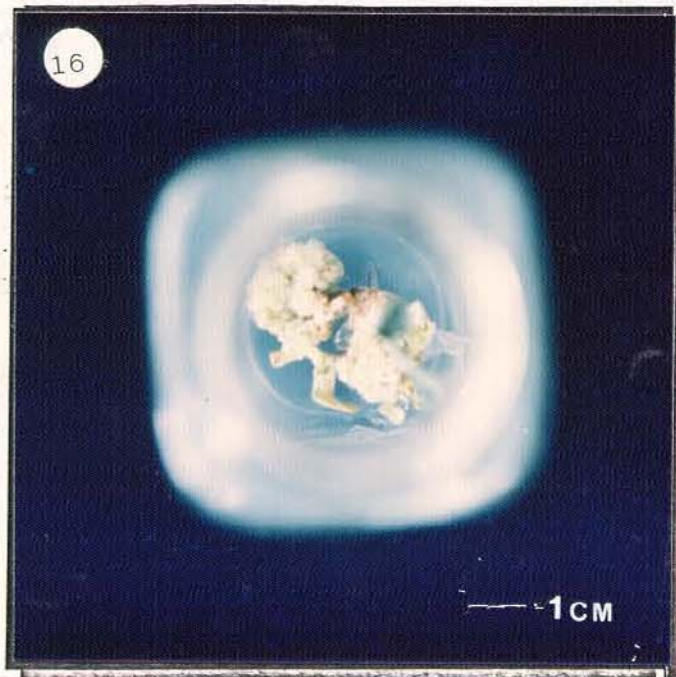
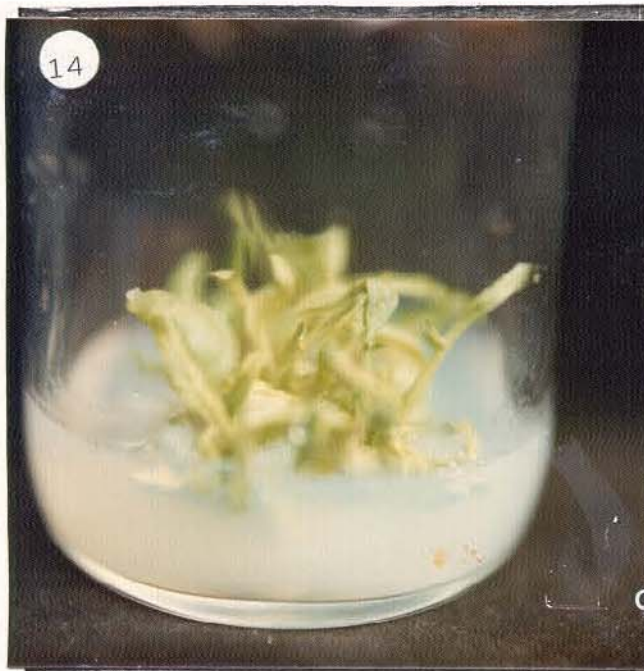
Progenitor feminino (varied.)	total sementes inoculadas	contami- nação	Viáveis	Calos total	anômalos %
Santa Clara I 5.300	1848	56	1792	47	2,62
Rio Grande	885	43	842	5	0,59
Ceresiforme Transamazônica	248	7	241	2	0,83
TOTAL	2981	106	2875	54	1,88

Figura 14. Detalhe do calo C₂₉₄ que apresenta boa organogênese aos 30 dias de sub cultura. Este calo é proveniente da cultura de embrião imaturo obtido do cruzamento interespecífico: *L. esculentum* cv. Angela com três introduções de *L. peruvianum* (LA 444-1, LA 371, LA 462).

Figura 15. Enxertia de *L. esculentum* var. Angela (enxerto) em *L. peruvianum* LA 371 (porta-enxerto).

Figura 16. Detalhe do calo NRG, que apresenta aspecto pouco friável e sem organogênese intensa como os outros calos obtidos. Este calo é proveniente da cultura de embrião imaturo, obtido do cruzamento interespecífico: *L. esculentum* Rio Grande x *L. peruvianum* LA 444-1.

Figura 17. Calos pequenos denominados de "Anômalos". Estes calos crescem apenas 3mm e quando repicados oxidam completamente.



Plantas de *L. esculentum* var. Angela, foram polinizadas com uma mistura de pólen de 6 introduções de *L. peruvianum* (PI 126928, PI 126930, PI 126944, PI 126946, PI 128657 e PI 129146). Da cultura "in vitro" de sementes deste cruzamento foi obtido o calo C₅₀, que perdeu completamente a capacidade morfogênética, após 2 anos de subcultura. Na tentativa de recuperação do processo de organogênese desses calos, foram analisados dois experimentos em dialélico, utilizando variações dos fitorreguladores ácido indolacético (IAA) X 6-Benzil adenina (6-BA) em combinações 5 x 5 e 3 x 3.

As condições para o dialélico 5 x 5 foram fotoperíodo de 12 horas de luz à 600 lux e temperatura de 25±3°C. No dialélico 3 x 3, os frascos foram mantidos em ambiente natural de casa de vegetação com cerca de 2.000 lux. Em cada frasco inoculou-se um calo com cerca de 0,5 cm² em câmara asséptica.

Plantas obtidas da cultura prolongada de calos tendem a ter uma maior variabilidade genética (REISCH & BINGHAN, 1981; LARKIN & SCOWCROFT, 1981 e EVANS & SHARP, 1983). Esta variabilidade é denominada por "variação somaclonal" (BROSSARD, 1976; SHEPARD et al. 1980; LARKIN & SCOWCROFT, 1983; ILLG & SIQUEIRA, 1984b; EVANS et al., 1984) e pode ser originada pelas drogas comumente utilizadas no meio de cultura, (GAMBORG & DUNN - COLEMAN, 1983) bem como pela variabilidade originada da rápida divisão mitótica das células do calo. Essa variação tende a ser maior nos casos de hibridação interespecífica (HEINS & MEE, 1971; LARKIN & SCOWCROFT, 1981; NAKAMURA et al., 1981).

Pela tabela 18 e figura 18 observa-se que no dialélico 5 x 5 os maiores índices de crescimento de calos foram obtidos nas seguintes concentrações de IAA testados: 0,5; 2,5 e 5,0 μM . Estas concentrações quando combinadas com 2,5 μM de 6-BA atingiram os valores de 57, 75 e 75%, respectivamente, considerando-se apenas as notas 4 e 5 de crescimento de calos. Para maiores concentrações dos dois fitorreguladores, houve resposta no crescimento dos calos, apenas no tratamento com 10 μM de IAA e 5 μM de 6-BA. Os calos se mantiveram com um aspecto friável e de coloração verde clara em todos os tratamentos. No entanto, o aparecimento de algumas gemas adventícias ou centros meristemáticos e brotos ocorreram em outras concentrações de citocinina (10, 25 e 50 μM).

A manutenção dos frascos contendo os tratamentos do dialélico 5 x 5, durante os 30 dias de cultura em sala de crescimento com fotoperíodo de 14 horas luz (600 lux) e temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, não incrementou satisfatoriamente o aparecimento das gemas adventícias. A repetição de parte deste dialélico com mudança das condições de cultura para casa de vegetação com maior intensidade luminosa ($\pm 1.200 - 2.000$ lux) favoreceu a indução e desenvolvimento de gemas adventícias (Tabela 19 e Figura 19).

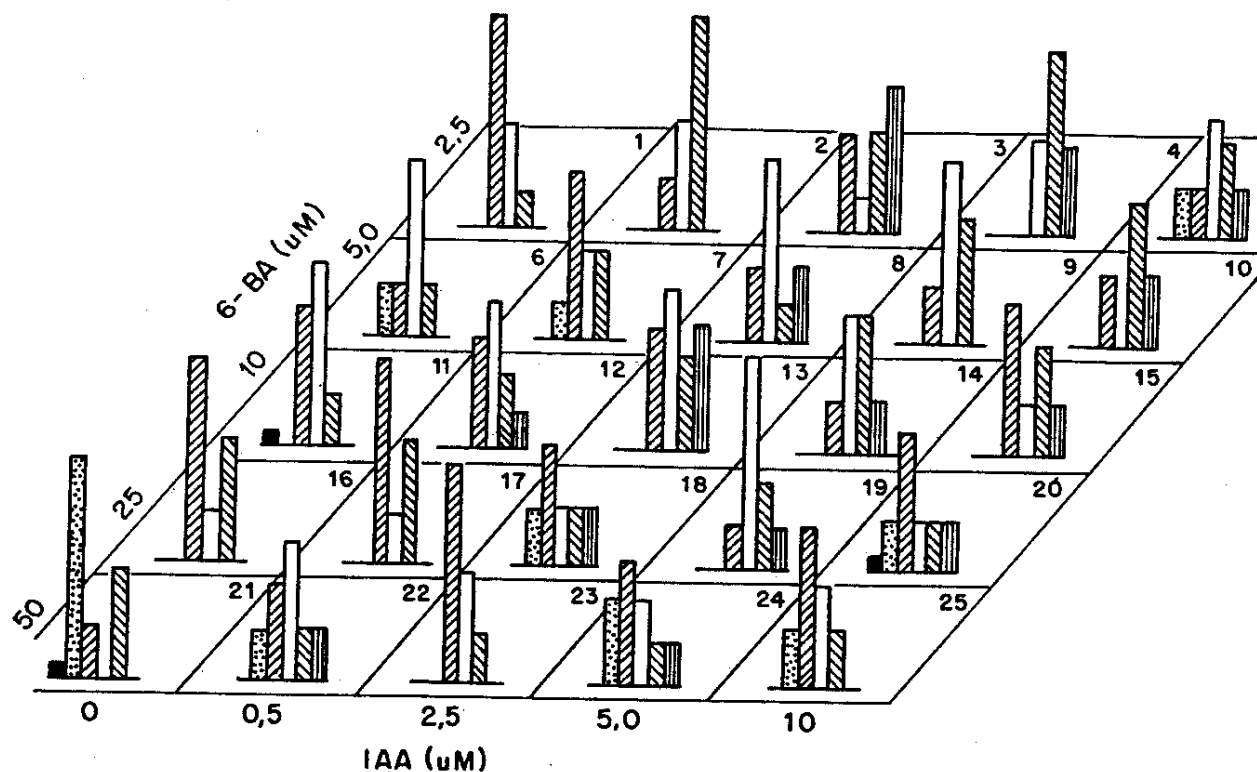
Nessas condições ambientais, não houve o desenvolvimento dos calos a exemplo do experimento anterior, uma vez que, aos 30 dias de cultura, nenhum tratamento recebeu a nota 5. Sugere-se que seja em decorrência da indução de gemas adventícias seguido do desenvolvimento de brotos, concomitantemente ao crescimento dos calos, evidenciando algum tipo de competição. Para essas novas condições, ao se agruparem os va

Tabela 18. Avaliação aos 30 dias de cultura do experimento dia-
lético (5x5) visando o crescimento de calos e regeneração de
gemas adventícios. O calo foi obtido da cultura de embrião
imaturo do cruzamento interespecífico entre *L. esculentum*
var. Angela Gigante AG x *L. peruvianum*.

IAA μM	6-BA μM	Tot.Inoc.	Contam. oxid. +	Viáveis	Crescimento calos (%)					gemas adv. 2-3 cm nº
					1	2	3	4	5	
0	2,5	10	-	10	-	60,0	30,0	10,0	-	-
0,5	2,5	10	3	7	-	14,3	28,6	57,1	-	-
2,5	2,5	8	4	4	-	25,0	-	25,0	50,0	-
5,0	2,5	9	1	8	-	-	25,0	50,0	25,0	-
10,0	2,5	10	2	8	12,5	12,5	37,5	25,0	12,5	-
0	5,0	11	4	7	14,3	14,3	57,1	14,3	-	-
0,5	5,0	12	3	9	11,1	44,4	22,2	22,2	-	-
2,5	5,0	11	1	10	-	20,0	50,0	10,0	20,0	-
5,0	5,0	11	5	6	-	16,6	50,0	33,3	-	-
10,0	5,0	10	5	5	-	20,0	20,0	40,0	20,0	-
0	10,0	10	2	8	-	37,5	50,0	12,5	-	1
0,5	10,0	11	1	10	-	30,0	40,0	20,0	10,0	-
2,5	10,0	12	5	7	-	28,6	42,8	-	28,6	-
5,0	10,0	12	4	8	-	12,5	37,5	37,5	12,5	-
10,0	10,0	12	5	7	-	42,8	14,3	28,6	14,3	-
0	25,0	11	4	7	-	57,1	14,3	28,6	-	-
0,5	25,0	13	6	7	-	57,1	14,3	28,6	-	-
2,5	25,0	13	7	6	16,6	33,3	16,6	16,6	16,6	-
5,0	25,0	12	3	9	-	11,1	55,6	22,2	11,1	-
10,0	25,0	16	8	8	12,5	37,5	12,5	12,5	12,5	1
0	50,0	13	6	7	57,1	14,3	-	28,6	-	1
0,5	50,0	12	4	8	12,5	25,0	37,5	12,5	12,5	-
2,5	50,0	13	6	7	-	57,1	28,6	14,3	-	-
5,0	50,0	13	4	9	22,2	33,3	22,2	11,1	11,1	-
10,0	50,0	10	3	7	14,3	42,9	28,6	14,3	-	-

Tabela 19. Resultados obtidos com inoculações de calos (1cm³)
de um ano e meio de subcultura em diferentes meios e em
condições de casa de vegetação.

IAA μM	6-BA μM	Tot.Inoc.	Contam. oxid. +	Viáveis	Crescimento calos (%)					gemas adv. 2-3 cm nº
					1	2	3	4	5	
0	10	20	7	13	-	30,8	38,4	30,8	-	3
0,5	10	20	7	13	-	27,7	66,9	5,4	-	7
2,5	10	20	6	14	-	35,7	57,2	7,1	-	-
0	25	20	8	12	16,5	16,5	16,5	16,5	-	10
0,5	25	20	7	13	30,8	30,8	30,8	7,7	-	7
2,5	25	20	2	18	16,6	27,8	27,8	27,8	-	8
0	50	20	5	15	40,0	33,3	6,7	20,0	-	13
0,5	50	20	4	16	31,3	37,5	18,7	12,5	-	8
2,5	50	20	3	17	11,8	41,2	17,6	29,4	-	7



GEMA (1cm = 5 GEMAS ADVENTÍCIAS)



CALOS (1cm = 20%)

■ = NOTA 1

▨ = NOTA 2

□ = NOTA 3

▩ = NOTA 4

▤ = NOTA 5

Figura 18. Diagrama dos resultados obtidos das combinações em dialético (5x5) de IAA x 6-BA no desenvolvimento dos calos e regeneração, do cruzamento interespecífico entre *L. esculentum* x *L. peruvianum*. Condições ambientais de 25± 3°C fotoperíodo de 12 horas e 600 lux. Avaliação feita aos 30 dias de cultura.

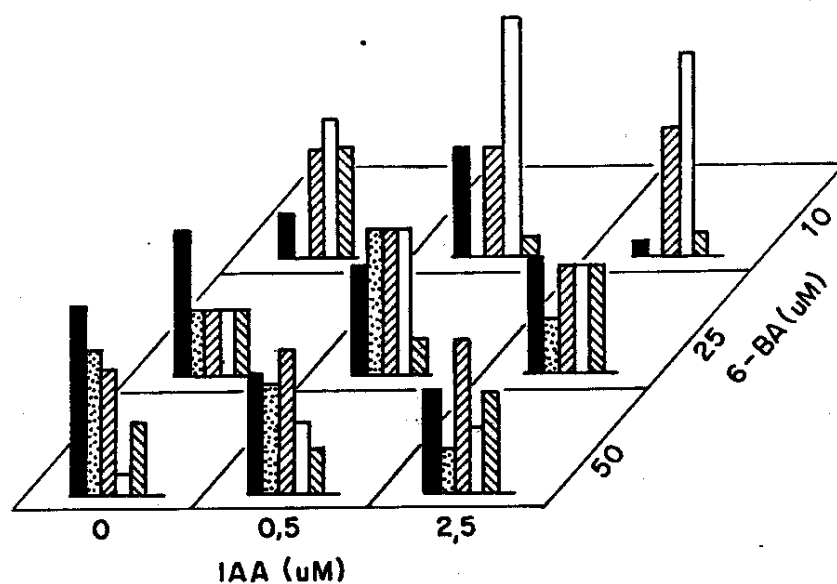


Figura 19. Diagrama dos resultados das combinações em dialélico (3x3) de IAA x 6-BA no desenvolvimento dos calos e regeneração do cruzamento interespecífico *L. esculentum* x *L. peruvianum*. Condições de casa de vegetação sob luz natural à cerca de 2.000 lux e temperatura mínima, variando de 12-19°C e máxima de 26-30°C. Avaliação feita após 30 dias de cultura.

lores em porcentagem, obtidos nas notas 3 e 4, a combinação do 10 μM de 6-BA com 0,5 μM de IAA se mostrou mais satisfatória para crescimento dos calos (82,3%). Na ausência de auxina, o tratamento com 10 μM de 6-BA apresentou o total de 69,2% de calos com as notas 3 e 4. Níveis de auxina e citocininas maiores que 0,5 μM e 10 μM , respectivamente, propiciam menor desenvolvimento dos calos. Por outro lado, houve rápida formação de gemas adventícias em quase todos os tratamentos, durante os primeiros 30 dias de cultura dos calos, com exceção das combinações em μM de IAA e 6-BA: 2,5 x 10 e 0,5 x 50. Nota-se certa influência da citocinina 6-BA na indução e desenvolvimento das gemas adventícias ou centros meristemáticos globulares a partir das células dos calos, nos tratamentos com ausência de auxina (IAA). Essa auxina apresenta labilidade foto-dinâmica, razão pela qual, houve reduzido desenvolvimento de calos e rápida regeneração de plantas (organogênese) a exemplo do encontrado por HAVRANEK & NOVÁK, 1973.

Portanto, calos de tomate com cerca de um ano e meio de cultura, com reduzido potencial morfogênético, pode ser "revigorado" através da manipulação de fitorreguladores e condições ambientais de manutenção das culturas, principalmente no que concerne a fotoperíodo e intensidade luminosa.

Seguindo-se a metodologia de ILLG & SIQUEIRA, 1984a para tomateiro de mesa, houve rápida indução e desenvolvimento de raízes no meio secundário, facilitando o transplante e pegamento das mudas.

Foram recuperadas aproximadamente 400 plantas híbridas *L. esculentum* x *L. peruvianum* de 4 calos híbridos e dessas, 63 foram transferidas com sucesso para o campo. Notou-se

o aparecimento de plantas poliploides, principalmente oriundas de calos repicados por várias vezes (Tabela 20).

Entretanto, a adaptação das plantas híbridas em estufa é crítica e há muitas perdas de material se não forem tomados cuidados adequados. Observou-se maior sobrevivência das plantas híbridas quando são removidas do meio de cultura, com suas raízes bem desenvolvidas (Figura 20) e na ocasião do transplante elas devem ter suas raízes bem lavadas em água e tratadas com solução fungicida para depois então, serem transferidas para a mistura solo e vermiculita. (Figura 21). Este substrato deve ser autoclavado e usado somente uma vez. Nas primeiras semanas, é recomendável regar as plantas com solução nutritiva de HOAGLAND & SNYDER, 1934, diluída a 50% mas de maneira que o substrato permaneça apenas ligeiramente úmido. Também são necessárias pulverizações semanais com inseticidas, fungicidas e adubo foliar, bem como a adubação em cobertura com NPK.

As desbrotas e tutoramento são periodicamente realizadas. Todas as plantas híbridas vem sendo propagadas vegetativamente e assim mantidas no campo ou em casa de vegetação empregando as técnicas usadas para a cultura de tomateiro. (Figura 22).

Tomando-se como padrões de tamanho, as medidas da secção longitudinal e perímetro do eixo longitudinal, os frutos híbridos (*L. peruvianum* x *L. esculentum*) foram classificados em quatorze estádios conforme a tabela 8. (Materiais e Métodos).

Foram observados os registros percentuais de ocorrência de frutos de diversos tamanhos nos híbridos F_1 : está-

Tabela 20. Diferentes plantas híbridas (*L. esculentum* x *L. peruvianum*) recuperadas a partir de cultura de embriões imaturos.

Iden- tifi- cação	Ident. de calo/ nº repli- cagens	Estádio máximo/ encon- trado	Semen- tes	Colora- ção de fruto	Nº semen- tes por fruto	Plantas anôma- las	Iden- tifi- cação	Ident. de calo/ nº repli- cagens	Estádio máximo/ encon- trado	Semen- tes	Colora- ção de fruto	Nº semen- tes por fruto	Plantas anôma- las
F ₁ 01	C 50/16	X	grande	amarelo	+	-	F ₁ 39	C 273/3	XI	grande	amarelo	+	-
F ₁ 02	C 50/16	X	grande	amarelo	+	+	F ₁ 41	C 273/3	X	grande	amarelo	+	-
F ₁ 04	C 50/16	não produziu frutos	-	-	-	-	F ₁ 42	C 273/3	X	grande	amarelo	+	-
F ₁ 05	C 50/14	não produziu frutos	-	-	-	-	F ₁ 43	C 273/3	IX	grande	amarelo	+	-
F ₁ 08	C 50/15	não produziu frutos	-	-	-	-	F ₁ 46	C 273/2	X	média	amarelo	++	-
F ₁ 09	C 50/17	X	grande	amarelo	+	+	F ₁ 48	C 273/3	X	grande	amarelo	+	-
F ₁ 11	C 50/17	XI	grande	amarelo	++	+	F ₁ 51	C 273/2	X	média	amarelo	+	-
F ₁ 12	C 50/18	não produziu frutos	-	-	-	-	C ₁ 59	*CF-C50/18/3	não produziu frutos	-	-	-	+
F ₁ 14	C 50/19	IX	média	amarelo	+	+	F ₁ 61	C 273/2	VIII	média	amarelo	+	-
F ₁ 15	C 50/19	VIII	média	amarelo	+	+	F ₁ 70	*CF-C50/18/1	não produziu frutos	-	-	-	+
F ₁ 17	C 273/2	X	grande	amarelo	++	-	F ₁ 72	C 50/18	não produziu frutos	-	-	-	+
F ₁ 18	C 50/21	não produziu frutos	-	-	-	-	F ₁ 73	C 50/18	não produziu frutos	-	-	-	+
F ₁ 19	C 273/2	X	grande	amarelo	+	-	F ₁ 74	C 50/32	X	média	amarelo	+	+
F ₁ 20	C 273/3	X	grande	amarelo	+	-	F ₁ 75	C 50/19	não produziu frutos	-	-	-	+
F ₁ 27	C 273/3	X	média	amarelo	+	-	F ₁ 79	C 273/5	X	média	amarelo	+	-
F ₁ 28	C 273/3	VII	média	amarelo	+	-	F ₁ 80	C 273/5	XI	grande	amarelo	+	+
F ₁ 30	C 273/3	XI	grande	amarelo	+	-	F ₁ 81	C 273/5	XI	grande	amarelo	+	-
F ₁ 31	C 273/3	XI	grande	amarelo	+	-	F ₁ 82	C 273/5	X	grande	amarelo	+	-
F ₁ 33	C 273/2	XI	grande	amarelo	+	-	F ₁ 83	C 273/5	X	média	amarelo	+	-
F ₁ 33	C 273/2	XI	grande	amarelo	+	-	F ₁ 84	C 273/5	XI	grande	amarelo	+	-
F ₁ 34	C 273/2	XI	grande	amarelo	+	-	F ₁ 85	C 273/5	X	média	amarelo	+	-
F ₁ 35	C 273/3	XI	grande	amarelo	+	-	F ₁ 86	C 273	X	grande	amarelo	+	-
F ₁ 36	C 273/3	XI	grande	amarelo	+	-	F ₁ 87	C 273/5	XI	média	amarelo	+	-
F ₁ 37	C 273/3	XI	médio	amarelo	+	-	F ₁ 93	C 273/5	X	média	amarelo	+	-
F ₁ 38	C 273/3	XI	média	amarelo	+	-	F ₁ 95	C 273/5	IX	grande	amarelo	+	+
Total 63													

Obs.: - = ausência; + = poucas sementes (1 a 5); ++ = número médio de sementes; +++ = muitas sementes (mais de 15).

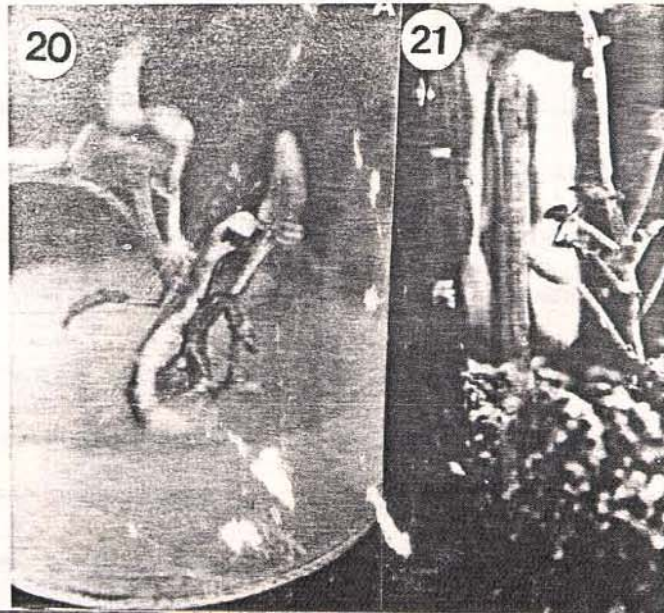
Sementes do tipo médio - semelhante à *L. peruvianum*; sementes do tipo grande - semelhante ao tipo *L. esculentum* e sementes do tipo pequeno - semelhante ao do F₁ (*L. esculentum* x *L. peruvianum*).

(*) Anotação de replicagens - dos calos de folha está repreg sentada por: nº de replicagem do calo em que foi obtida a planta para fazer o calo folha/replicagem de CF.

Figura 20. Planta híbrida em meio de enraizamento evidenciando o sistema radicular em formação com duas semanas de cultura.

Figura 21. Transferência para mistura de terra/vermiculita.

Figura 22. Plantas híbridas transferidas com sucesso ao campo.



estádio VII (4,84%), estágio VIII (8,06%), estágio IX (8,06%), estágio X (33,87%), estágio XI (24,19%) e 19,35 não produziram frutos.

Portanto, a maioria dos frutos estudados nas plantas híbridas F_1 , concentraram-se nos estádios X e XI. (Tabela 20).

Nos frutos das plantas híbridas, ocorre variação para tamanho de sementes e estas foram classificadas em:

- a) Grandes - plenamente desenvolvidas, coloração parda, semelhantes às sementes de *L. esculentum* var. *Angela* autofecundadas, medindo 2 a 3mm de comprimento. Germinam normalmente em caixas de semeadura.
- b) Médias - plenamente desenvolvidas, coloração parda escura, semelhantes às sementes de *L. peruvianum* e às vezes com aspectos intermediário entre as duas espécies, medindo de 1 a 2mm de comprimento. Também germinam normalmente em caixas de semeadura.
- c) Pequenas - imaturas, coloração creme, medindo 1mm de comprimento. Não germinam e necessitam serem passadas por culturas de embrião para a obtenção da próxima geração.

Quanto ao tamanho das sementes presentes nos frutos de híbrido F_1 , observa-se a predominância de sementes grandes (70,84%), enquanto as sementes médias revelaram 29,16%. (Tabela 20).

Folhas de plantas híbridas adultas, serviram de explante para exploração da variação somaclonal, e assim obter novas plantas. Esses explantes foliares de plantas híbridas quando cultivadas em meio para produção de calos originam calos com crescimento vigoroso e intensa organogênese, nas pri-

meiras repicagens. Possuem, em geral, características semelhantes ao calo que originou a planta híbrida, de onde foram tirados os explantes.

Folhas de plântulas "in vitro" também foram utilizadas para inoculações em meio de cultura próprio para indução de calo e regeneração, com a finalidade de multiplicação e manutenção das plantas híbridas, além da possibilidade de obtenção de variabilidade genética nessas plantas.

4. Caracterização morfológica e isoenzimática de híbridos F_1 obtidos

a) Aspectos morfológicos

Quanto aos aspectos morfológicos das plantas híbridas, estas apresentam variação quanto ao formato de folha, mas em geral com aspecto intermediário aos progenitores envolvidos nos cruzamentos (Figura 23). Ocorreu também uma ampla variação nos frutos, sendo que seu tamanho máximo, é ainda menor que o fruto de *L. esculentum* var. Angela. A produção por inflorescência é numerosa, característica esta própria da espécie selvagem e sua coloração varia de esverdeado, com estrias arroxeadas até levemente amarelado (Figura 24). As flores de plantas híbridas, apresentam estigma extruso à semelhança da espécie selvagem (alógama) (Figura 25).

Todas as plantas híbridas, devido à sua maior rusticidade, desenvolvem-se rapidamente no campo. Na verdade elas são provenientes de apenas 4 calos diferentes (Tabela 21).

O primeiro calo obtido, denominado por C_{50} , apresen

Tabela 21. Identificação dos calos obtidos nos diversos experimentos, e o número de plantas híbridas sobreviventes no campo, após as fases de enraizamento e aclimação.

calos ident.	Progen. masc.	Progen. fem.	nº plantas regen.	nº plantas enraizadas em vermic.	nº plantas sobreviven tes campo
C ₅₀	PI'S	L.esc. cv.A.G.	110	60	18
C ₂₇₃	LA'S	L.esc. cv.A.G.	200	90	36
C ₂₉₄	LA'S	L.esc. cv.A.G.	70	15	6
CN	LA 444/1	L.esc. cv. Rio Grande X L. pímp. NAV 1062	20	10	2
Total			400	175	62

Figura 23. Aspecto morfológico de uma folha de *Lycopersicon esculentum* (esquerda), folha de *Lycopersicon peruvianum* (direita) e folha do híbrido.

Figura 24. Detalhe de flor de *L. esculentum* (esquerda). *L. peruvianum* (direita) e híbrido entre estas duas espécies. Nota-se as diferenças morfológicas do estigma e da coloração entre os materiais.

Figura 25. Detalhe de frutos de algumas plantas híbridas.

23



24



25



ta a característica de se manter sempre com aspecto friável mesmo após várias repicagens periódicas de 30 em 30 dias. Em uma das últimas avaliações, este calo estava com 32 repicagens e mesmo assim se apresentou com o mesmo aspecto: friável, coloração esverdeada, crescimento rápido mas sem organogênese. A regeneração de plantas se deu mais nas três primeiras repicagens, sendo que novas plantas foram produzidas após a variação da concentração dos fitorreguladores e/ou local de cultura onde havia uma maior intensidade de luz. As Figuras 26-31 apresentam a sequência das etapas desde a organogênese do calo C₅₆ até a obtenção de plantas na fase reprodutiva. As plantas provenientes da regeneração de calos com muitas repicagens (mais de 15), apresentaram morfologia de parte aérea típicos de plantas com anormalidades (Figuras 32-33).

Do cruzamento que envolveu o grupo LA (LA 371, LA 462 e LA 444/1), foram obtidos dois calos (C₂₇₃ e C₂₉₄). Estes calos são muito semelhantes, apresentam intensa organogênese, sendo que quase toda a superfície do calo fica preenchido por setores globulares esverdeados e de gemas adventícias. (Figura 34). Um destes calos (calo C₂₉₄) se originou após 6 meses de colocação da semente híbrida no meio de cultura. Os frutos originados de plantas são de coloração alaranjada (Figuras 35-36).

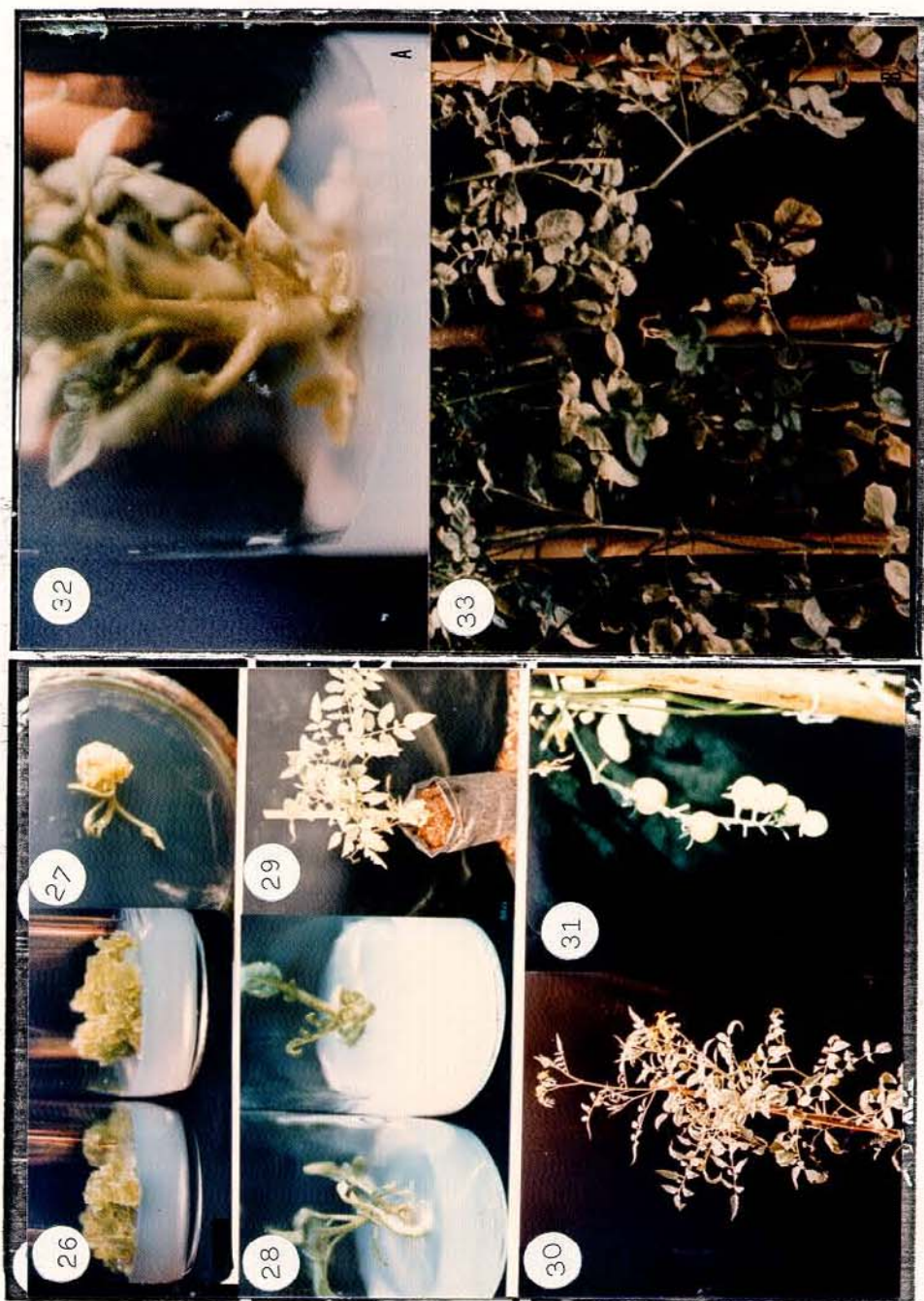
O calo CN proveniente do cruzamento envolvendo cruzamento intermediário com a espécie *L. pimpinellifolium*: *L. esculentum* (Rio Grande) x (*L. pimpinellifolium* NAV 1062 x *L. peruvianum* LA 444/1), não tinha aspecto friável e oxidou após algumas repicagens. Entretanto, foram regeneradas duas plantas (CN-01 e CN-04) e estas, apresentaram maior vigor quando comparadas aos outros híbridos (Figuras 37-39).

Figuras 26-31. Sequência das etapas desde a organogênese do calo C₅₀ até a obtenção de plantas na fase reprodutiva.

Figuras 32-33. Aspecto de plantas anômalas com ploidia (ca-
lo C₅₀).

Figura 32. Ainda em condições assépticas.

Figura 33. No campo sem formação de frutos.

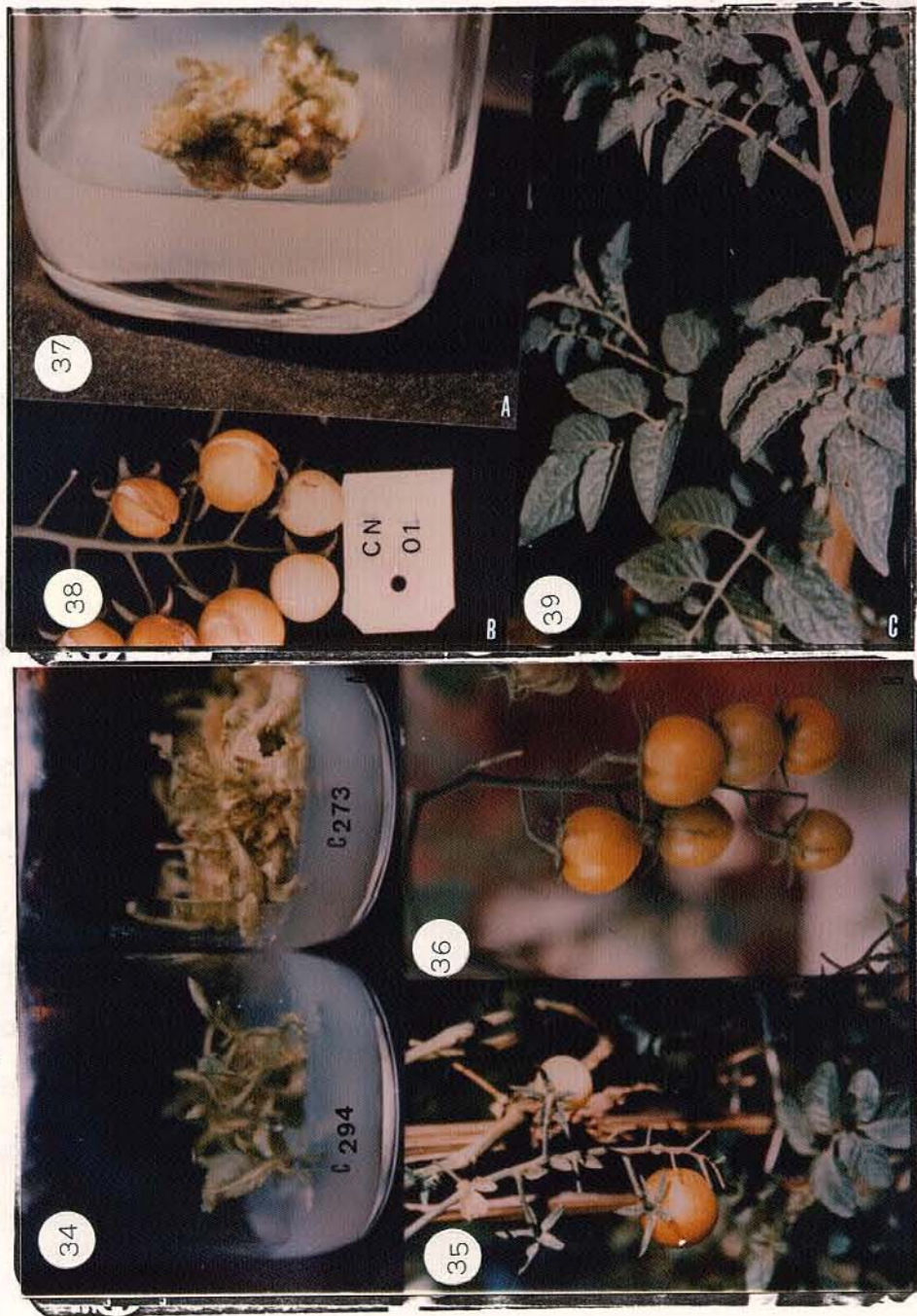


Figuras 34-36. Detalhe do calo C₂₉₄ e C₂₇₃ provenientes da cultura de embrião imaturo obtido do cruzamento de *L. esculentum* var. Angela com três LA'S de *L. peruvianum*.

Figuras 35-36. Frutos híbridos de coloração alaranjada (esquerda) do calo C₂₇₃ e C₂₉₄ respectivamente que atinge tamanho bem maior que o *L. peruvianum*.

Figura 38.37 Fruto proveniente de planta F₁ CN-01. Detalhe do calo proveniente da cultura de embrião imaturo do cruzamento *L. esculentum* Rio Grande x (*L. pimpinellifolium* NAV 1062 com *L. peruvianum* LA 444-1).

Figura 39. Planta F₁ CN-01.



b. Comparação da natureza híbrida, pela técnica da eletroforese

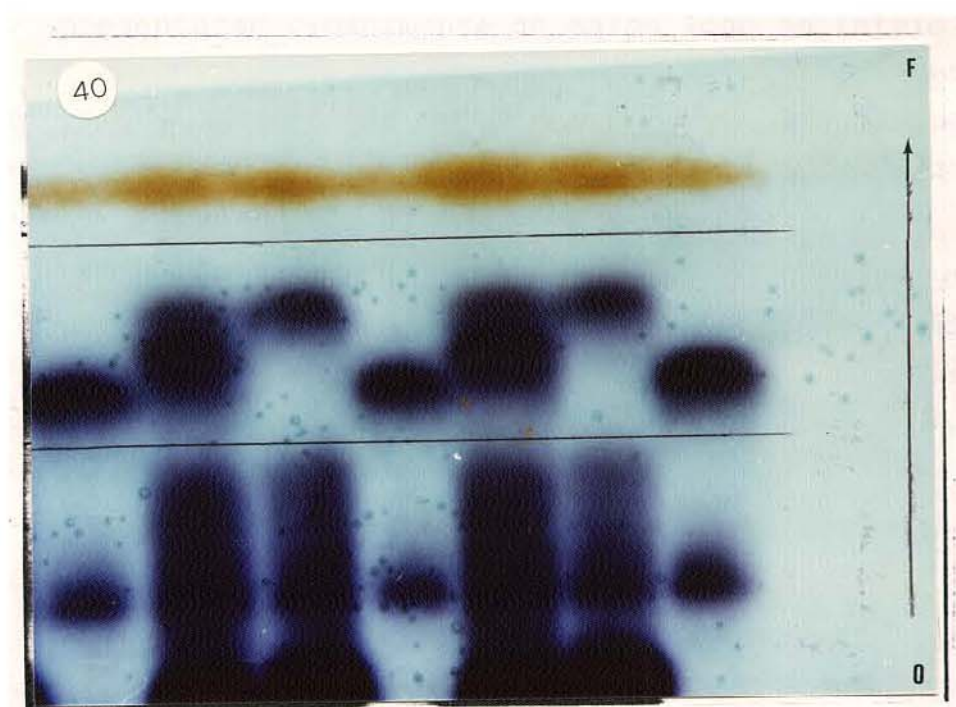
Verificou-se que os padrões eletroforéticos para as enzimas APS de *L. esculentum* (var. Angela Gigante) e *L. peruvianum* (LA 371) são distintos e que no híbrido interespecífico são encontrados bandas específicas aos tipos parentais além de uma banda com migração intermediária (Figura 40). Por essa razão, foi possível determinar-se inequivocamente, a natureza híbrida das plantas obtidas por cultura de embrião "in vitro". Observa-se que os locus F_1 de APS para *L. esculentum*, tem o genótipo $+/+$, revelado no gel por uma banda próxima ao "front F", mais avançada em relação à banda comum na espécie selvagem (*L. peruvianum* LA 371), de genótipo l/l . Como, no caso, trata-se de uma enzima dímera, o híbrido interespecífico, possui, além das bandas avançadas e retardada, presentes nos tipos parentais, uma terceira banda, de migração intermediária e que corresponde ao heterodímero, no caso APS-1, caracterizando-se assim a condição híbrida ($+/l$) do indivíduo analisado.

Para o caso de PGI, verifica-se também que *L. esculentum* e *L. peruvianum* tem padrões isoenzimáticos distintos. Ao contrário de ASP-1, onde o fenótipo pode ser geneticamente caracterizado, os padrões observados de PGI não permitiram a interpretação genética segura. No entanto, o padrão eletroforético do híbrido interespecífico analisado foi claramente formado pela composição dos dois fenótipos parentais.

- Figura 40.** Padrões de bandas referentes à isoenzima fosfatase ácida (APS). Notam-se três padrões distintos próximos ao "front" (F) na região indicada na foto, de acordo com o genótipo:
- 1/1 - homozigose para o alelo selvagem, representada no gel por uma banda retardada;
 - +/+ - homozigose para o alelo +, representada no gel por uma banda rápida, próxima ao "front" (F);
 - +/1 - heterozigose para APS representada no gel por 3 bandas equidistantes.

Legendas:

- P - Lycopersicon peruvianum LA 371
- H - híbrido Interespecífico L. peruvianum x L. esculentum
- E - Lycopersicon esculentum Cv. Angela
- F - "front" (sentido de migração - 0-F) = ↑
- 0 - origem



5. Populações Segregantes

5.1. Obtenção

a) Geração F_2

Foram produzidas 188 plantas na geração F_2 (174 provenientes da sementeira direta e 14 plantas regeneradas "in vitro"). (Tabela 22). A porcentagem média de germinação de sementes em caixas plásticas foi de 37% (Figura 41). As sementes imaturas (pequenas), coletadas nos frutos das plantas híbridas F_1 , quando cultivadas em meio de Murashige & Skoog (1962) na forma sólida, apresentaram crescimento de calos logo no início (Figura 42). A porcentagem de obtenção de plantas destas sementes foi de apenas 2% (Tabela 22). Estas plantas quando adultas, se aproximam muito do fenótipo de tomateiros selvagens, com frutos menores e de coloração esverdeada. (Tabela 23).

Foram observadas as seguintes porcentagens de ocorrência de frutos de diversos tamanhos nos híbridos F_2 : estágio III (1,67%), IV (6,14%), V (4,47%), VI (3,91%), VII (29,05%), VIII (8,94%), IX (17,32%), X (13,41%), XI (10,61%), XII (3,35%), XIII (1,68%).

Portanto, a maioria dos frutos estudados na geração F_2 concentravam-se nos estágios VII, VIII, IX, X e XI.

Quanto ao tamanho das sementes presentes nos frutos F_2 , observou-se a predominância das sementes médias (60,3%) enquanto as sementes grandes e pequenas revelaram 33,5% e 6,1% de ocorrência respectivamente. Quanto ao número de sementes por fruto, 83,8% dos mesmos mostravam 1 a 5 sementes enquanto 10,61% e 5,6% dos mesmos apresentaram 5 a 15 e mais de 15 sementes/fruto, respectivamente.

A quase totalidade dos frutos observados mostrou coloração amarela, embora alguns híbridos F_2 tivessem frutos de coloração verde (F_3 , F_4 e F_5) e coloração vermelha (F_{84}).

Tabela 22. Obtenção da geração F₂, através da semeadura direta de sementes completamente desenvolvidas e por cultura "in vitro" de sementes imaturas em meio .

Progenitor	Número de Sementes				Identificação da Planta F ₂
	desenvolvidas (semeadura direta)		imaturas (cultura de embriões)		
	inoc.	cresc.	inoc.	cresc.	
F ₁ 01/C ₅₀	340	120	400	12(3%)	F ₂ 1, F ₂ 2, F ₂ 9*, F ₂ 10*, F ₂ 11*, F ₂ 14*, F ₂ 21*, F ₂ 22*, F ₂ 25*, F ₂ 27 a F ₂ 62, F ₂ 63*, F ₂ 64 a F ₂ 81, F ₂ 82*, F ₂ 83 a F ₂ 86, F ₂ 91 a F ₂ 98, F ₂ 99*, F ₂ 100*, F ₂ 114 a F ₂ 116, F ₂ 148* e.. F ₂ 182*, F ₂ 23
F ₁ 13/C ₂₇₃	7	2	-	-	F ₂ 5, F ₂ 6, F ₂ 107, F ₂ 214, F ₂ 224, F ₂ 225, F ₂ 231, F ₂ 233, F ₂ 235
F ₁ 19/C ₂₇₃	3	2	-	-	F ₂ 103, F ₂ 180

Continua...

Tabela 22. continuação.

Progenitor	Número de Sementes				Identificação da Planta F ₂
	desenvolvidas (semeadura direta)		imaturas (cultura de embriões)		
	inoc.	cresc.	inoc.	cresc.	
F ₁ 27/C ₂₇₃	4	2	103	1(0,97%)	F ₂ 87*, F ₂ 104, F ₂ 105
F ₁ 28/C ₂₇₃	7	2	-	-	F ₂ 167, F ₂ 168
F ₁ 29/C ₂₇₃	2	2	-	-	F ₂ 88, F ₂ 89
F ₁ 33/C ₂₇₃	8	5	-	-	F ₂ 106, F ₂ 108, F ₂ 177, F ₂ 181
F ₁ 34/C ₂₇₃	9	4	-	-	F ₂ 109, F ₂ 111, F ₂ 112, F ₂ 178
F ₁ 35/C ₂₇₃	-	-	210	1(0,48%)	F ₂ 26*
F ₁ 36/C ₂₇₃	6	1	-	-	F ₂ 69, F ₂ 170
F ₁ 37/C ₂₇₃	3	1	-	-	F ₂ 179
F ₁ 38/C ₂₇₃	5	1	-	-	F ₂ 171

Continua...

Tabela 22. continuação.

Progenitor feminino	Número de Sementes				Identificação da Planta F2
	desenvolvidas (semeadura direta)		mat. puras (cultura de embriões)		
	inoc.	cresc.	inoc.	cresc.	
F ₁ 41/C ₂ 73	3	1	-	-	F ₂ 110
F ₁ 42/C ₂ 73	5	3	-	-	F ₂ 172 a F ₂ 174
F ₁ 43/C ₂ 73	4	1	-	-	F ₂ 175
F ₁ 51/C ₂ 73	2	1	-	-	F ₂ 90
F ₁ 76/C ₂ 73	1	1	-	-	F ₂ 113
F ₁ 80/C ₂ 73	2	1	-	-	F ₂ 176
F ₁ 95/C ₂ 73	8	2	-	-	F ₂ ³ e F ₂ ⁴
CN 01	21	8	-	-	F ₂ 203, F ₂ 208, F ₂ 190 a F ₂ 195
CN 04	10	7	-	-	F ₂ 196 a F ₂ 202
F ₁ 131/C ₂ 94	9	3	-	-	F ₂ 204 a F ₂ 207
F ₁ 134/C ₂ 94	11	4	-	-	F ₂ 200 a F ₂ 202
Total	470	174 (37,02%)	713	14 (1,96%)	

* plantas de cultura de embrião.

Tabela 23. Diferentes plantas F₂ recuperadas a partir de cultura de embriões e semeadura direta.

Identif. tiff. ção	Planta mãe	Estádio de fruto máx. encontrado	Semen tes	Colora- ção de fruto	Nº semen tes por fruto	Identif. tiff. ção	Planta mãe	Estádio de fruto máx. encontrado	Semen tes	Colora- ção de fruto	Nº semen tes por fruto	Identif. tiff. ção	Planta mãe	Estádio de fruto máx. encontrado	Semen tes	Colora- ção de fruto	Nº semen tes por fruto
F ₂ 1	F ₁ 01/C ₅₀	VI	média	amarelo	+	F ₂ 40	F ₁ 01/C ₅₀	IX	média	amarelo	+	F ₂ 67	F ₁ 01/C ₅₀	VI	média	amarelo	+
F ₂ 2	F ₁ 01/C ₅₀	X	média	verde	+++	F ₂ 41	F ₁ 01/C ₅₀	IX	média	amarelo	+	F ₂ 68	F ₁ 01/C ₅₀	XI	média	amarelo	++
F ₂ 3	F ₁ 95/C ₂₇₃	XI	pequena	verde	+++	F ₂ 42	F ₁ 01/C ₅₀	IX	grande	amarelo	+	F ₂ 69	F ₁ 01/C ₅₀	VIII	grande	amarelo	+
F ₂ 4	F ₁ 95/C ₂₇₃	X	pequena	verde	+++	F ₂ 43	F ₁ 01/C ₅₀	IX	grande	amarelo	+	F ₂ 70	F ₁ 01/C ₅₀	XI	grande	amarelo	+
F ₂ 5	F ₁ 17/C ₂₇₃	XI	média	verde	+++	F ₂ 44	F ₁ 01/C ₅₀	IX	média	amarelo	+	F ₂ 71	F ₁ 01/C ₅₀	IX	média	amarelo	+
F ₂ 6	F ₁ 17/C ₂₇₃	X	média	amarelo	+	F ₂ 45	F ₁ 01/C ₅₀	IX	grande	amarelo	+	F ₂ 72	F ₁ 01/C ₅₀	VI	média	amarelo	+
F ₂ 9*	F ₁ 01/C ₅₀	VI	média	amarelo	++	F ₂ 46	F ₁ 01/C ₅₀	IX	média	amarelo	+	F ₂ 73	F ₁ 01/C ₅₀	VI	média	amarelo	+
F ₂ 10*	F ₁ 01/C ₅₀	V	pequena	amarelo	++	F ₂ 47	F ₁ 01/C ₅₀	IX	grande	amarelo	+	F ₂ 74	F ₁ 01/C ₅₀	XI	média	amarelo	+
F ₂ 11*	F ₁ 01/C ₅₀	VI	pequena	amarelo	++	F ₂ 48	F ₁ 01/C ₅₀	IX	grande	amarelo	+	F ₂ 75	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+
F ₂ 14*	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	++	F ₂ 49	F ₁ 01/C ₅₀	X	pequena	amarelo	+	F ₂ 76	F ₁ 01/C ₅₀	V	média	amarelo	+
F ₂ 21*	F ₁ 01/C ₅₀	IX	média	amarelo	+++	F ₂ 50	F ₁ 01/C ₅₀	X	média	amarelo	+	F ₂ 77	F ₁ 01/C ₅₀	X	grande	amarelo	++
F ₂ 23*	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+++	F ₂ 51	F ₁ 01/C ₅₀	VII	grande	amarelo	+	F ₂ 78	F ₁ 01/C ₅₀	IV	média	amarelo	+
F ₂ 25*	F ₁ 01/C ₅₀	VII	pequena	amarelo	++	F ₂ 52	F ₁ 01/C ₅₀	VII	grande	amarelo	+	F ₂ 79	F ₁ 01/C ₅₀	IV	média	amarelo	+
F ₂ 26*	F ₁ 35/C ₂₇₃	IX	média	amarelo	+	F ₂ 53	F ₁ 01/C ₅₀	VII	grande	amarelo	+	F ₂ 80	F ₁ 01/C ₅₀	V	grande	amarelo	+
F ₂ 27	F ₁ 01/C ₅₀	IX	grande	amarelo	+	F ₂ 54	F ₁ 01/C ₅₀	VII	grande	amarelo	+	F ₂ 81	F ₁ 01/C ₅₀	XI	média	amarelo	+
F ₂ 28	F ₁ 01/C ₅₀	XI	média	amarelo	+	F ₂ 55	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 82*	F ₁ 01/C ₅₀	VII	pequena	amarelo	+
F ₂ 29	F ₁ 01/C ₅₀	XI	média	amarelo	+	F ₂ 56	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 83	F ₁ 01/C ₅₀	V	grande	amarelo	+
F ₂ 30	F ₁ 01/C ₅₀	IX	média	amarelo	+	F ₂ 57	F ₁ 01/C ₅₀	X	grande	amarelo	+	F ₂ 84	F ₁ 01/C ₅₀	XII	méd. e gr. vermelho	+++	
F ₂ 31	F ₁ 01/C ₅₀	XI	grande	amarelo	+	F ₂ 58	F ₁ 01/C ₅₀	VIII	média	amarelo	+	F ₂ 85	F ₁ 01/C ₅₀	VIII	grande	amarelo	+
F ₂ 32	F ₁ 01/C ₅₀	IX	média	amarelo	+++	F ₂ 59	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 86	F ₁ 01/C ₅₀	V	média	amarelo	+
F ₂ 33	F ₁ 01/C ₅₀	IX	média	amarelo	+	F ₂ 60	F ₁ 01/C ₅₀	X	grande	amarelo	+++	F ₂ 87*	F ₁ 27/C ₂₇₃	VIII	pequena	amarelo	+
F ₂ 34	F ₁ 01/C ₅₀	IX	média	amarelo	+	F ₂ 61	F ₁ 01/C ₅₀	X	média	amarelo	+	F ₂ 88	F ₁ 29/C ₂₇₃	VIII	média	amarelo	+
F ₂ 35	F ₁ 01/C ₅₀	XI	grande	amarelo	++	F ₂ 62	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	++	F ₂ 89	F ₁ 29/C ₂₇₃	VIII	grande	amarelo	+
F ₂ 36	F ₁ 01/C ₅₀	IX	grande	amarelo	+	F ₂ 63*	F ₁ 01/C ₅₀	VII	pequena	amarelo	+	F ₂ 90	F ₁ 318/C ₂₇₃	XI	grande	amarelo	+
F ₂ 37	F ₁ 01/C ₅₀	IX	média	amarelo	+	F ₂ 64	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 91	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+
F ₂ 38	F ₁ 01/C ₅₀	IX	média	amarelo	+	F ₂ 65	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 92	F ₁ 01/C ₅₀	VIII	média	amarelo	+
F ₂ 39	F ₁ 01/C ₅₀	IX	média	amarelo	+	F ₂ 66	F ₁ 01/C ₅₀	VI	média	amarelo	+	F ₂ 93	F ₁ 01/C ₅₀	IV	média	amarelo	+
												F ₂ 94	F ₁ 01/C ₅₀	V	média	amarelo	+

Continua...

Tabela 23. continuação.

Identifi- cação	Planta mãe	Estádio de fruto máx. encontrado	Semen- tes	Colora- ção de fruto	Nº semen- tes por tífl cão	Planta mãe	Estádio de fruto máx. encontrado	Semen- tes	Colora- ção de fruto	Nº semen- tes por tífl cão	Planta mãe	Estádio de fruto máx. encontrado	Semen- tes	Colora- ção de fruto	Nº semen- tes por tífl cão		
F ₂ 95	F ₁ 01/C ₅₀	V	média	amarelo	+	F ₂ 124	F ₁ 01/C ₅₀	IV	média	amarelo	+	F ₂ 151	F ₁ 01/C ₅₀	VIII	média	amarelo	+
F ₂ 96	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 125	F ₁ 01/C ₅₀	V	grande	amarelo	+	F ₂ 152	F ₁ 01/C ₅₀	VIII	média	amarelo	+
F ₂ 97	F ₁ 01/C ₅₀	X	média	amarelo	+	F ₂ 126	F ₁ 01/C ₅₀	VII	grande	amarelo	+	F ₂ 153	F ₁ 01/C ₅₀	VIII	média	amarelo	+
F ₂ 98	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 127	F ₁ 01/C ₅₀	VII	grande	amarelo	+	F ₂ 154	F ₁ 01/C ₅₀	X	grande	amarelo	+
F ₂ 99	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 128	F ₁ 01/C ₅₀	VII	grande	amarelo	+	F ₂ 155	F ₁ 01/C ₅₀	XI	grande	amarelo	+
F ₂ 100	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 129	F ₁ 01/C ₅₀	VII	grande	amarelo	+	F ₂ 156	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+
F ₂ 101	F ₁ 19/C ₂₇₃	X	grande	amarelo	+	F ₂ 130	F ₁ 01/C ₅₀	VII	grande	amarelo	+	F ₂ 157	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+
F ₂ 102	F ₁ 27/C ₂₇₃	X	média	amarelo	+	F ₂ 131	F ₁ 01/C ₅₀	X	grande	amarelo	++	F ₂ 158	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+
F ₂ 103	F ₁ 27/C ₂₇₃	XI	grande	amarelo	+	F ₂ 132	F ₁ 01/C ₅₀	VII	grande	amarelo	+	F ₂ 159	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+
F ₂ 104	F ₁ 33/C ₂₇₃	IX	média	amarelo	+	F ₂ 133	F ₁ 01/C ₅₀	VII	grande	amarelo	+	F ₂ 160	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+
F ₂ 105	F ₁ 33/C ₂₇₃	IX	média	amarelo	+	F ₂ 134	F ₁ 01/C ₅₀	VII	grande	amarelo	+	F ₂ 161	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+
F ₂ 106	F ₁ 33/C ₂₇₃	IX	média	amarelo	+	F ₂ 135	F ₁ 01/C ₅₀	VII	grande	amarelo	+	F ₂ 162	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+
F ₂ 107	F ₁ 34/C ₂₇₃	IX	média	amarelo	+	F ₂ 136	F ₁ 01/C ₅₀	VII	grande	amarelo	+	F ₂ 163	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+
F ₂ 108	F ₁ 41/C ₂₇₃	IX	média	amarelo	++	F ₂ 137	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 164	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+
F ₂ 109	F ₁ 34/C ₂₇₃	VIII	grande	amarelo	+	F ₂ 138	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 165	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+
F ₂ 110	F ₁ 34/C ₂₇₃	X	méd. e gr.	amarelo	+	F ₂ 139	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 166	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+
F ₂ 111	F ₁ 76/C ₂₇₃	IX	média	amarelo	+++	F ₂ 140	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 167	F ₁ 28/C ₂₇₃ /3	IX	média	amarelo	+
F ₂ 112	F ₁ 01/C ₅₀	IX	grande	amarelo	+	F ₂ 141	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 168	F ₁ 28/C ₂₇₃ /3	IX	média	amarelo	+
F ₂ 113	F ₁ 01/C ₅₀	IX	grande	amarelo	+	F ₂ 142	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 169	F ₁ 36/C ₂₇₃ /3	X	média	amarelo	+
F ₂ 114	F ₁ 01/C ₅₀	IX	média	amarelo	+	F ₂ 143	F ₁ 01/C ₅₀	XII	média	amarelo	+	F ₂ 170	F ₁ 36/C ₂₇₃ /3	X	média	amarelo	+
F ₂ 115	F ₁ 01/C ₅₀	IX	média	amarelo	+	F ₂ 144	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 171	F ₁ 38/C ₂₇₃ /3	XI	grande	amarelo	+
F ₂ 116	F ₁ 01/C ₅₀	IV	média	amarelo	+	F ₂ 145	F ₁ 01/C ₅₀	VII	média	amarelo	+	F ₂ 172	F ₁ 42/C ₂₇₃ /3	X	grande	amarelo	+
F ₂ 117	F ₁ 01/C ₅₀	IV	média	amarelo	+	F ₂ 146	F ₁ 01/C ₅₀	VIII	grande	amarelo	+	F ₂ 173	F ₁ 42/C ₂₇₃ /3	X	grande	amarelo	+
F ₂ 118	F ₁ 01/C ₅₀	IV	média	amarelo	+	F ₂ 147	F ₁ 01/C ₅₀	VIII	grande	amarelo	+	F ₂ 174	F ₁ 43/C ₂₇₃ /3	VIII	média	amarelo	+
F ₂ 119	F ₁ 01/C ₅₀	IV	média	amarelo	+	F ₂ 148	F ₁ 01/C ₅₀	VII	pequena	amarelo	+	F ₂ 175	F ₁ 80/C ₂₇₃ /5	IX	média	amarelo	+
F ₂ 120	F ₁ 01/C ₅₀	IV	média	amarelo	+	F ₂ 149	F ₁ 01/C ₅₀	VIII	média	amarelo	+	F ₂ 176	F ₁ 33/C ₂₇₃ /2	XI	grande	amarelo	+
F ₂ 121	F ₁ 01/C ₅₀	IV	média	amarelo	+	F ₂ 150	F ₁ 01/C ₅₀	X	média	amarelo	++	F ₂ 177					

Continua...

Tabela 23. continuação.

Identificação	Planta mãe	Estádio de fruto máx. encontrado	Sementes	Coração de fruto	Nº sementes por fruto
F ₂ 178	F ₁ 34/C ₂ 73/2	IX	média	amarelo	+
F ₂ 179	F ₁ 37/C ₂ 73/3	X	média	amarelo	+
F ₂ 180	F ₁ 19/C ₂ 73/2	VIII	grande	amarelo	+
F ₂ 181	F ₁ 33/C ₂ 73	VII	pequena	amarelo	+
F ₂ 182*	F ₁ 01/C ₅ 0	XII	grande	amarelo	+
F ₂ 190	CN 01	XII	grande	amarelo	++
F ₂ 191**	CN 01	XIII	grande	amarelo	++
F ₂ 192	CN 01	XIII	média	amarelo	++
F ₂ 193	CN 01	X	grande	amarelo	++
F ₂ 194**	CN 01	XI	grande	amarelo	++
F ₂ 195	CN 01	XIII	grande	amarelo	++
F ₂ 196**	CN 04	XII	grande	amarelo	++
F ₂ 197	CN 04	XI	média	amarelo	++
F ₂ 198**	CN 04	IX	grande	amarelo	+
F ₂ 199**	CN 04	XII	grande	amarelo	++
F ₂ 203	CN 01	X	grande	amarelo	++
F ₂ 208	CN 01	XI	grande	amarelo	++
Total					179

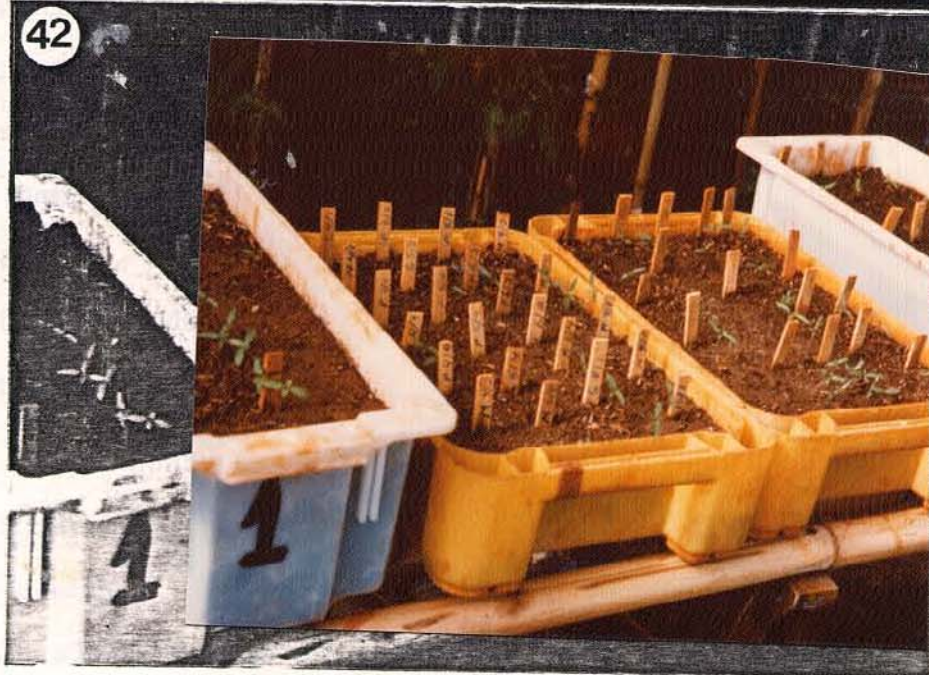
Obs.: - = ausência de sementes; + = 1 a 5 sementes por fruto;
 ++ = 5 a 15 sementes por fruto; +++ = mais de 15 sementes por fruto.

(*) planta proveniente de sementes imaturas recuperadas em meio de cultura.

(**) planta autocompatível.

Figura 41. Germinação direta de sementes F_2 e F_3 após 15 dias de semeadura.

Figura 42. Recuperação da geração F_2 através de sementes amaturas e verdes com tamanho impróprio (1mm de comprimento) para germinação direta. O meio de cultura para recuperação destes híbridos contém reguladores de crescimento e conseqüentemente também induzem a formação de calos.



A maioria das plantas F_2 , quando tiveram suas inflorescências protegidas com sacos de papel, não produziram sementes. Isto mostra que são autoincompatíveis, exigindo polinização cruzada. Entretanto, ocorreram exceções ($F_2/191$, $F_2/192$, $F_2/196$, $F_2/198$ e $F_2/199$), que revelaram assim certo nível de autocompatibilidade. Essas plantas foram intensivamente utilizadas nos cruzamentos para o *L. esculentum* var. *Angela* (fêmea), sem no entanto produzirem sementes normais, mas apenas sementes imaturas, ao contrário de que se previa, segundo trabalhos de HOGENBOOM (1972 a e).

b) Geração F_3

Foram produzidas 39 plantas na geração F_3 , todas provenientes de semeadura em caixas plásticas (Tabela 24). A porcentagem de germinação das sementes foi de 34%. Observou-se as seguintes porcentagens de ocorrência de frutos de diversos tamanhos nos híbridos F_3 : estágio II (4,8%), V (4,8%), VI (4,8%), VII (14,3%), VIII (14,3%), IX (23,8%), X (19,0%), XI (14,3%), de maneira semelhante ao ocorrido na geração F_2 . (Tabela 24).

Quanto ao tamanho das sementes presentes nos frutos predominaram as sementes médias (90,9%), seguidas das sementes grandes (9,6%), não ocorrendo frutos com sementes pequenas, talvez devido ao reduzido número de híbridos F_3 estudados.

Em relação à característica número de sementes por fruto, 38,09% dos frutos mostraram mais de 15 sementes, 33,4% nenhuma semente, 19,1% 1 a 5 sementes e 9,5% 5 a 15 sementes. Nota-se a ocorrência acentuada de frutos sem sementes (33,4%),

Tabela 24. Obtenção da geração F_3 , através da semeadura direta de sementes completamente desenvolvidas de frutos de híbridos F_2 .

Progenitor feminino	Nº de sementes inoc.	desenvolvidas cresc.	Identificação
F_{235}/C_{50}	14	4	$F_{301}, F_{302}, F_{303},$ F_{304}
F_{270}/C_{50}	8	1	F_{03}^{05}
F_{281}/C_{50}	3	1	F_{306}
F_{284}/C_{50}	22	2	F_{307}, F_{308}
F_{2107}/C_{273}	15	10	$F_{309}, F_{310}, F_{311}^*,$ $F_{312}, F_{313}, F_{314},$ $F_{315}, F_{316}, F_{338},$ F_{339}
F_{2143}/C_{50}	10	2	$F_{319}, F_{320}, F_{321},$ F_{322}, F_{323}
F_{284}/C_{50}	5	3	$F_{326}, F_{327}, F_{328}$
F_{225}/C_{50}	10	2	F_{324}, F_{325}
F_{2104}/C_{273}	15	6	$F_{329}, F_{330}, F_{334}, F_{334}, 36, 37$
F_{2132}/C_{50}	7	2	F_{340}, F_{341}
Total	122	38 (31,15%)	

* Planta auto compatível.

o que não aconteceu na geração F_2 .

Por outro lado, a maioria dos frutos F_3 mostraram coloração verde, alguns apresentando coloração amarela e roxa.

Nesta geração, constatou-se a presença de uma planta autocompatível ($F_3 11$). (Tabela 25).

5.2. Avaliação morfológica e isoenzimática de híbridos nas gerações F_2 e F_3 .

A geração F_2 e F_3 apresenta variabilidade quanto à pilosidade em haste e formato de folha (Figura 43-44) em geral o estigma se apresentou extruso (planta alogama à semelhança do *L. peruvianum*) e flores com coloração bem amarelada. Os frutos, em geral, apresentaram-se com coloração desde esverdeado com estrias até amarelado ou rosados quando maduras, e pouco maiores que o *L. peruvianum* (Figura 45-46).

A análise isoenzimática para a fosfatase ácida (APS-1) revelou a ocorrência de três tipos diferentes de fenótipos correspondentes aos genótipos 1/1, +/1 e +/+ nas introduções do tomate selvagem *Lycopersicon peruvianum* estudados (cf. Figura 40), enquanto o cultivar de tomate comercial *L. esculentum* var. Gigante e Angela mostrou possuir o alelo + para APS-1, para a mesma isoenzima.

O híbrido interespecífico F_1 -17 apresentou o genótipo +/1 para APS-1, sendo, então, derivado do cruzamento *L. peruvianum* 371 ou 453 x *L. esculentum* Angela.

Ocorreu segregação alélica para o locus APS-1 nas gerações F_2 e F_3 , apesar do reduzido número de indivíduos testados em eletroforese (Figura 47).

Da mesma forma, comprovou-se a ocorrência de segregação para o locus APS-1 na geração F_2 do híbrido interespecífico F_1 131 (Figura 48).

Tabela 25. Diferentes plantas F_3 , recuperadas a partir da cultura de embriões.

Identifi- cação	Planta mãe	Estádio de fruto máx. encontrado	Semen- tes	Colora- ção de fruto	Nº semen- tes por fruto
F ₃ 03	F ₂ 35/C ₅₀	VIII	média	amarelo	+
F ₃ 04	F ₂ 35/C ₅₀	X	média	verde	+
F ₃ 05	F ₂ 70/C ₅₀	XI	grande	amarelo	+
F ₃ 08	F ₂ 84/C ₅₀	VII	média	verde	+
F ₃ 10	F ₂ 107/C ₂₇₃	VI	média	verde	-
F ₃ 11*	F ₂ 107/C ₂₇₃	X	média	verde	+++
F ₃ 12	F ₂ 107/C ₂₇₃	IX	grande	amarelo	+++
F ₃ 13	F ₂ 107/C ₂₇₃	X	média	verde-roxo	+++
F ₃ 14	F ₂ 107/C ₂₇₃	VII	média	roxo	-
F ₃ 16	F ₂ 107/C ₂₇₃	IX	média	roxo	+++
F ₃ 17	F ₂ 143/C ₅₀	X	média	verde	++
F ₃ 18	F ₂ 143/C ₅₀	XI	média	verde	+++
F ₃ 21	F ₂ 02/C ₅₀	IX	média	verde	+++
F ₃ 22	F ₂ 02/C ₅₀	XI	média	verde	+++
F ₃ 23	F ₂ 02/C ₅₀	IX	média	verde	-
F ₃ 24	F ₂ 35/C ₅₀	II	média	verde	-
F ₃ 29	F ₂ 104/C ₂₇₃	VIII	média	verde	+++
F ₃ 30	F ₂ 104/C ₂₇₃	VII	média	verde	++
F ₃ 34	F ₂ 104/C ₂₇₃	IX	média	verde	-
F ₃ 35	F ₂ 104/C ₂₇₃	V	média	verde	-
F ₃ 36	F ₂ 104/C ₂₇₃	VIII	média	verde	-

* planta auto compatível

Figura 43-44. Variação morfológica de folha, vigor, etc, de plantas da geração F_2 do cruzamento interespecífico *L. esculentum* x *L. peruvianum*.

Figura 45-46. Variação em tamanho e coloração de frutos provenientes de plantas da geração F_2 do cruzamento interespecífico *L. esculentum* x *L. peruvianum*.

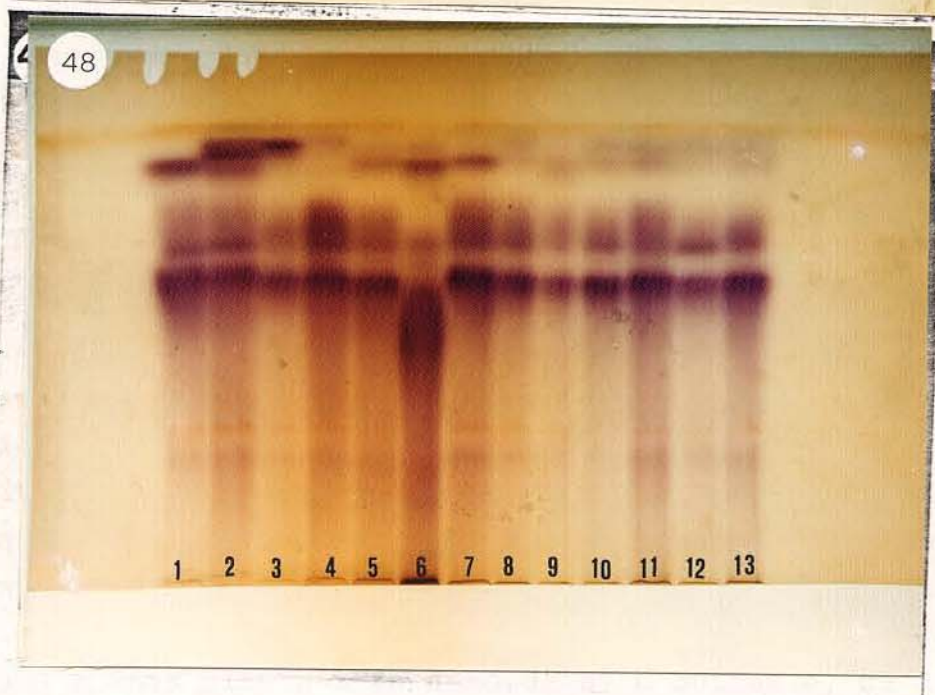
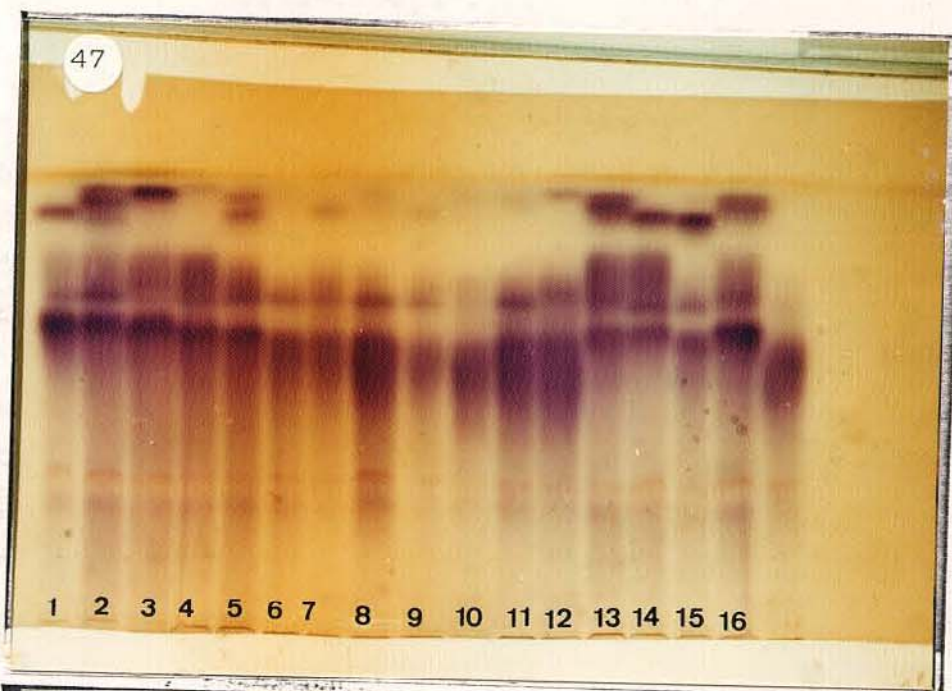


Figura 47. Padrões de isoenzima fosfatase ácida (APS) em três da espécie *L. peruvianum* (LA 371, LA 462 e LA 444) na variedade comercial Angela Gigante de *L. esculentum* no híbrido interespecífico F₁-17 e em indivíduos das gerações F₂ e F₃ dele derivados.

COLUNA	IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA	GENÓTIPO
1	LA 371	1/1
2	LA 462	+/1
3	LA 444	+/+
4	cv. Angela Gigante	+/+
5	F ₁ 17	+/1
6	F ₂ 235	?
7	F ₂ 224	1/1
8	F ₂ 107	+/1
9	F ₂ 233	1/1
10	F ₂ 231	+/+ ou +/1
11	F ₂ 225	+/+
12	F ₂ 214	+/1
13	F ₃ 10	+/1
14	F ₃ 11	1/1
15	F ₃ 15	1/1
16	F ₃ 12	+/1

Figura 48. Padrões de APS mostrando a segregação de APS-1 em plantas pertencentes à espécie *L. peruvianum*, *L. esculentum* e os híbridos interespecíficos regenerados de um mesmo calo além da geração F₂ deles derivados.

COLUNA	PLANTA	GENÓTIPO
1	LA 371	1/1
2	LA 462	+/1
3	LA 444	+/+
4	cv. Ang.	+/+
5	F ₁ 131	+/1
6	F ₁ 133	+/1
7	F ₂ 204	1/1
8	F ₂ 205	+/+
9	F ₂ 206	1/1
10	F ₂ 207	+/1
11	F ₂ 200	+/1
12	F ₂ 201	+/1
13	F ₂ 202	+/1



5.3. Teste de resistência dos híbridos F_1 e das gerações segregantes F_2 e F_3 ao vírus causador do "vira-cabeça".

Testes de inoculação mecânica, realizados em casa de vegetação, mostraram que todos os cultivares comerciais em estudo (Kada, Ângela, Santa Clara, Imperador, Roxinho e Olho Roxo) são altamente suscetíveis ao vírus do "vira-cabeça". A introdução LA 444/1 de *L. peruvianum* revelou-se altamente resistente à doença, mesmo após ter sido sucessivamente reinoculada com diversas estirpes do vírus (mantidas em folhas de fumo ou de tomate), apresentando apenas pequenas lesões locais, com ausência de sintomas sistêmicos, após 20-25 dias de inoculação. Reação idêntica foi observada no híbrido F_1 interespecífico *L. esculentum* x *L. peruvianum*).

Das 42 plantas F_2 avaliadas, 35 se mostraram resistentes e sete suscetíveis enquanto das 382 plantas F_2 avaliadas, 339 se revelaram resistentes e apenas 43 suscetíveis. (Tabela 26).

5.4. Teste de resistência do híbrido interespecífico (CN-01) e populações segregantes à traça do tomate (*Scrobipalpula absoluta*)

Os materiais resistentes (PI 134 417, PI 134 418 - *L. hirsutum* e NAV 29/115 - *L. peruvianum*) sofreram danos foliares variando entre 5% e 15% da área foliar total. As variedades suscetíveis (Rio Grande, Kada e Santa Clara) sofreram danos totais, ou seja, 100% de área foliar consumida pelo inseto. As plantas F_2 tiveram danos intermediários, variando entre 40 e 50%. A maioria das plantas F_3 tiveram danos entre 30 e 70%, sendo que apenas uma planta teve dano de 5% e outras 5, de 10 a 15% (LOURENÇÃO et alii, 1985) (Tabela 27). Estas 6 plantas, portanto, foram selecionadas como resistentes. Foram, posteriormente, podadas, pulverizadas contra ácaros e insetos para obtenção do maior número de frutos para sementes.

Tabela 26. Avaliação de cultivares comerciais de tomate (*L. esculentum*) e de híbridos interespecíficos (*L. esculentum* x *L. peruvianum*) quanto à tolerância ao vírus do "vira-cabeça", utilizando-se inoculações mecânicas, em casa de vegetação.

Cultivar/Híbrido	Nº de plantas avaliadas	Nº de Plantas resistentes	Nº de plantas suscetíveis
Kada* (<i>L. escul.</i>)	20	0	20
Ângela * (<i>L. escul.</i>)	22	0	22
Santa Clara* (<i>L. escul.</i>)	19	0	19
Imperador* (<i>L. escul.</i>)	21	0	21
Raminho* (<i>L. escul.</i>)	18	0	18
Olho Roxo* (<i>L. escul.</i>)	23	0	23
LA 441/1 (<i>L. peruvianum</i>)	20	20	0
F ₁ (<i>L. peruvianum</i>)	4	4	0
F ₂ (<i>L. peruvianum</i>)	42	35	43
F ₃ (<i>L. peruvianum</i>)	382	339	43

Obs: *Cultivar em distribuição comercial.

Tabela 27. Avaliação de cultivares comerciais (*L. esculentum*), espécies selvagens (*L. esculentum* e *L. peruvianum*) e das gerações segregantes F₂ e F₃ de cruzamentos interespecíficos *L. peruvianum* x *L. pimpinellifolium* x *L. esculentum* quanto à tolerância à traça (*Scrobipalpula absoluta*) em casa de vegetação.

População/ Genótipo	Origem	Nº de plantas avaliadas	% área foliar comida por <i>Scrobipalpula absoluta</i> (intervalor)	Plantas individuais selecionadas
Rio Grande*	<i>L. esculentum</i>	12	100%	-
Kada*	<i>L. esculentum</i>	12	100%	-
Santa Clara*	<i>L. esculentum</i>	12	100%	-
PI 134417	<i>L. hirsutum</i>	24	5-15%	-
PI 134418	<i>L. hirsutum</i>	24	5-15%	-
NAV 29/115	<i>L. peruvianum</i>	48	5-15%	-
(NAV 29/115 x <i>L. peruvianum</i> x F ₂ NAV 1062 x <i>L. pimpinellifolium</i> RIO FUEGO)	<i>L. esculentum</i>	15	40-50%	-
(NAV 29/115 x <i>L. peruvianum</i> x F ₃ NAV 1062 x <i>L. pimpinellifolium</i> RIO FUEGO)	<i>L. esculentum</i>	96	5-70%	1 planta 5% 5 plantas- 10 a 15%

Obs: *Cultivar em distribuição comercial.

A herança genética da resistência ao vírus do "vira-cabeça" tem sido estudada por diversos pesquisadores, com resultados conflitantes. Devido ao elevado número de estirpes existentes do vírus e suas interações no hospedeiro, com consequentes efeitos mascaradores e sinergismos, torna-se difícil estabelecer o número de genes envolvidos.

A hipótese mais provável é de que a resistência às diversas estirpes do vírus seja condicionada pela presença de dois genes dominantes e três genes recessivos (FINLAY, 1952).

Em nosso caso, quando utilizada a espécie *L. peruvianum* nos cruzamentos interespecíficos, além do emprego da espécie *L. pimpinellifolium* como ponte, os resultados também são inconclusivos quanto ao número de genes que condicionam a resistência ao vírus do "vira-cabeça".

Entretanto, os resultados obtidos sugerem que existem diversas restrições à recombinação, em híbridos interespecíficos, causadas por eliminação gamética e zigótica, pleiotropia e ligação gênica, conforme também verificado por ANDERSON, 1939.

A resistência ao vírus do "vira-cabeça" pode também ser condicionada por um grupo de genes fortemente ligados, aparentemente associados a uma maior fertilidade ou maior compatibilidade nos cruzamentos. Os genótipos que portarem esse bloco de genes ou pedaço de cromossomo, originário da espécie *L. peruvianum*, devem apresentar uma maior sobrevivência dos embriões, caracterizando-se assim uma fertilização preferencial. Resta saber se esse efeito pleiotrópico dificultará a recuperação das características agronômicas desejáveis do tomate comercial, mantendo-se o caráter de resistência ao vírus.

VI. CONCLUSÕES

Confirmou-se que nos cruzamentos entre *L. esculentum* e *L. peruvianum*, a primeira espécie deve ser utilizada como parental feminino. No cruzamento inverso, não há formação de frutos.

Sementes provenientes do cruzamento interespecífico entre *L. esculentum* e *L. peruvianum* cessam o crescimento entre 7 à 13 dias após a polinização, sendo que o fruto continua crescendo até cerca de 50 dias após a polinização. As sementes chegam a ter um tamanho máximo de 1 mm^2 e não germinam "in vivo".

Estudos histológicos de sementes híbridas revelaram que cerca de 20 dias após polinização começa a ocorrer a degeneração do endosperma. Excepcionalmente, sementes de até 30 dias mostraram-se viáveis em meio de cultura.

Em meio de cultura básico de Murashige & Skoog (1962), as sementes imaturas de 15 a 20 dias de idade oxidaram-se em poucos dias, não observando-se qualquer crescimento.

Para manter as sementes híbridas viáveis por mais tempo e para induzir a formação de calo em meio de cultura, há necessidade de remover a mucilagem das sementes imaturas. O método foi o da raspagem das sementes em papel de filtro.

A adição de 2,5 g/l de carvão ativado ao meio de cultura também contribuiu para manter a sementes viável por mais tempo, além de favorecer o aparecimento de pequenos calos.

Ca os friáveis com organogênese foram obtidas em meio básico de Murashige & Skoog (1962) enriquecida com vitami

nas, glutamina, , hidrolizado de caseína, auxina, citocinina, sacarose e com pH ajustado em 5,5. As melhores condições de cultura no laboratório foram incubação durante sete dias no escuro e posterior transferência para luz fluorescente e incandescente de 1.200 lux, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25± 3°C.

A melhor fonte e combinação de fitorregulares para indução de calo e organogênese foi a de 2,5 uM IAA e de 10um 6-BA. Mesmo assim, a ocorrência de calos viáveis capazes de morfogênese somática, foi ainda bastante reduzida neste tratamento.

Dentro de outras estratégias testadas para melhorar a formação de calos dos embriões imaturos, as que deram melhor resultado foram:

a) Mistura de 10% de pólen de *L. esculentum* ao pólen de *L. peruvianum*;

b) utilização do híbrido entre *L. esculentum* e *L. pimpinelli folium* como parental feminino no cruzamento com *L. peruvianum* LA 444.

Através da utilização de outras introduções de *L. peruvianum*, mostrou-se que aparentemente há um efeito genético do material de *L. peruvianum* usado no cruzamento para o processo de obter calos com capacidade de regeneração.

Morfogênese somática de calos de várias subculturas e sem capacidade de organogênese no laboratório foi conseguido em condições da casa de vegetação sombreada com temperaturas mínimas variando de 12 a 19°C e máxima de 26 a

36°C. Nestas condições, houve influência favorável de 25 a 50 μ m de 6-BA na diferenciação de gemas ou centros meristemáticos globulares, nos calos híbridos.

Os brotos obtidos nos calos, após serem destacadas, apresentaram boa formação de raízes em meio básico de Murashige & Skoog (1962) sem adição de fitorregulares.

De um total de 400 plantas regeneradas no meio de cultura, foi possível obter 62 plantas adultas em telado através de aclimatização gradativa.

Confirmou-se a natureza híbrida das plantas obtidas por cultura de embrião "in vitro", através de suas características morfológicas tais como: pilosidade, odor, extrusão do estigma, tamanho e coloração do fruto e hábito de crescimento das plantas, características essas mais semelhantes ao *L. peruvianum*.

A natureza híbrida das plantas foi também comprovada pelos padrões eletroforéticos para a enzima APS. Plantas híbridas apresentam, além das camadas específicas dos tipos parentais, uma outra camada com migração intermediária (enzima dímera).

Todas as plantas F_1 , foram autoincompatíveis. Obtiveram-se frutos com sementes viáveis, através de cruzamento entre plantas irmãs, por polinização artificial e natural. Algumas plantas F_2 e F_3 foram autocompatíveis, uma característica altamente desejável pois pode facilitar o retrocruzamento.

Nos frutos das plantas F_1 , F_2 e F_3 ocorre a seguinte segregação para tamanho de semente:

- a) grandes e maduras, semelhantes à *L. esculentum*;
- b) pequenas e maduras, semelhantes à *L. peruvianum*

c) pequenas e imaturas, sem desenvolvimento completo do embrião, que necessitam novamente serem cultivadas "in vitro" para obtenção de plantas. Essas últimas plantas regeneradas eram mais semelhantes a *L. peruvianum*, enquanto as demais mostraram características intermediárias entre as duas espécies.

Testes paralelos mostraram que as plantas híbridas F_1 , F_2 e F_3 segregam para resistência ao vírus causador do vi-
ra-cabeça e à traça *scrobipalpula absoluta*.

Para recuperação das características agronômicas desejáveis do tomate comercial, há necessidade de efetuar retrocruzamentos das plantas híbridas com cultivares de *L. esculentum*. Sementes RC_1 , provenientes desse cruzamento são do tipo pequeno e imaturo, que não germinam "in vivo" havendo de novo necessidade da cultura desses embriões imaturos.

O sucesso obtido no presente trabalho mostra que a cultura de embriões se apresenta como técnica adequada para romper a barreira de incompatibilidade no cruzamento entre *L. esculentum* e *L. peruvianum*, possibilitando assim, a transferência de características desejáveis desse tomateiro selvagem para o tomateiro comercial.

VII. RESUMO

A moléstia vira-cabeça é considerada uma das viroses de maior importância na cultura do tomateiro sendo que ainda não existem variedades comerciais (*L. esculentum*) adaptadas às nossas condições, com resistência satisfatória à es moléstia. Algumas fontes promissoras de resistência foram identificadas em introduções de *Lycopersicon peruvianum* (LA 370, 462, 444 e PI 126928, 126930, 126944, 126946, 128657 e 129146). No entanto a barreira pós-zigótica existente entre essas duas espécies, que é devido ao aborto precoce do embrião, impede a introgressão de genes limitando assim a exploração dessa espécie no melhoramento do tomateiro.

A técnica da cultura "in vitro" de embrião híbrido imaturo, antes de ocorrer o aborto do mesmo, possibilita a obtenção de plantas, através do fenômeno da organogênese somática dos calos, desenvolvidos a partir das células embrionárias. A análise histológica e o acompanhamento do desenvolvimento de embriões híbridos, com 15, 20 e 25 dias após polinização, nos auxiliou na determinação da idade mais adequada para a cultura "in vitro", que é aproximadamente entre 15 e 20 dias (estádio III).

O meio de cultura básico empregado nos experimentos foi solução salina de Murashige e Skoog, 1962, vitaminas de acordo com Söndahl (30 g/l) e Agar (7 g/l) para os ensaios dos tipos parentais. Para a cultura dos embriões híbridos, o meio foi enriquecido com 10 mg/l de glutamina e com 100 mg/l de caseína hidrolisada. Os frascos mantidos em sala de cultura, no escuro, por três dias e depois transferidos para sala

de crescimento com fotoperíodo de 14 hs de luz (1.200 lux). A temperatura foi sempre mantida a $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Foram realizados tratamentos envolvendo diferentes concentrações de fitorreguladores (auxina x citocinina), adição de extratos complexos ao meio de cultura, além de algumas estratégias de polinização com a finalidade de se tentar diminuir as barreiras de incompatibilidade.

O melhor tratamento com fitorreguladores para indução e crescimento de calos com posterior regeneração de plantas híbridas foi 10 μM de 6-BA e 2,5 μM de IAA. Entretanto, não houve influência dos extratos complexos na indução e crescimento dos calos. Por outro lado, a utilização da espécie *L. pimpinellifolium* como "ponte" entre o cruzamento das duas espécies utilizadas, promoveu o aparecimento de calo e também quando se utilizou 10% de pólen da planta mãe (*L. esculentum*) misturado ao pólen do *L. peruvianum*.

Foram regeneradas cerca de quatrocentas plantas originárias de quatro calos. O enraizamento das mesmas foi realizado utilizando-se o mesmo meio de cultura usado nos experimentos para a cultura dos embriões, sem adição de fitorreguladores. As plantas foram submetidas, posteriormente, a uma aclimação gradativa, com a finalidade de se diminuírem as perdas de material na fase de plantio no campo. Mesmo assim, ocorreu uma mortalidade de aproximadamente 85%.

A natureza híbrida das plantas regeneradas foi verificada pelo exame de diversas características morfológicas (formato e coloração de folha, tamanho e coloração de fruto, comprimento de estilo-estigma, pilosidade da haste, etc). Adicionalmente, foram realizadas análises de eletroforese (gel

de amido), empregando-se duas isoenzimas (APS - fosfatase âcida e PGI - fosfogluco isomerase), para confirmação final da natureza híbrida das plantas F_1 obtidas.

Finalmente, foi sintetizada uma população segregante através de cruzamentos em Sib entre as plantas F_1 regeneradas. Esta população revelou elevada variabilidade para tolerância ao vírus do "vira-cabeça", além de variação acentuada para diversas características morfológicas.

CULTURE OF IMMATURE EMBRYOS FOR OBTAINING INTERESPECIFIC HYBRIDS
IN TOMATO

VIII. ABSTRACT

Tomato spotted wilt is a major limiting factor of tomato cultivation in Brazil, especially in certain times of the year. Good resistance to this disease and also to insect pests has been identified in *Lycopersicon peruvianum*. Mainly due to early embryo abortion, it is impossible to obtain hybrids of this species with *L. esculentum* by conventional methods. The present research was to determine optimal conditions for "in vitro" embryoculture and to obtain hybrids between two resistant *L. peruvianum* accessions with brazilian cultivars of *L. esculentum*.

Histological analysis of hybrid embryo development showed that 25 days after pollination nearly all embryos had aborted, therefore immature embryos of 15-20 days old were used for "in vitro" culturing. The basic culture medium contained salts and vitamins, as used by Murashige & Skoog (1962) and Söndahl & Sharp (1979), respectively, with addition of 500 μ M inositol, 30g/l sucrose, 10mg/l glutamine, 100mg/l casein hydrolysate and 7g/l agar. The pH was adjusted at 5.5. On this medium no development of the immature seeds was observed, all of them being oxidized after a few days.

Several combinations of auxin and cytokinin were tested as well as addition of complex substrates to the basic medium and certain pollination strategies in order to improve success.

The best treatment was the addition of 10 μ M 6-BA and 2.5 μ M IAA, which gave rise to callus formation of about 20% of the immature seeds. Four calli were obtained which showed normal development and shoot formation. Rooting was induced on the same basic medium, without hormones. Rooted plantlets were gradually adapted to nursery conditions and totally 62 were transplanted to the field.

The hybrid nature of the regenerated plants was demonstrated by their morphological characters, like color and shape of leaves and fruits, stigma exertion and hairyness, and also by isozyme analysis for acid phosphatase and phosphoglucose isomerase. All F_1 plants showed self-incompatibility. A few F_2 plants, obtained by sibcrossing F_1 plants, showed self-compatibility.

The seed of F_1 plants showed variation in size and color. The small sized green colored seeds had to be cultured again "in vitro" and were able to develop directly into plants. The average and large sized brown colored seeds were sown directly into soil. The larger seeds gave rise to plants with more *L. esculentum* characteristics, whereas the plants from smaller seeds showed greater *L. peruvianum* resemblance.

Separate tests showed that the hybrid populations segregate for resistance to tomato spotted wilt, as well as to *Scrobipalpula absoluta*, with presently is a serious pest in Brazil. It is concluded that the above applied embryo culture technique can be an effective tool in overcoming the crossing-barriers between *L. esculentum* and *L. peruvianum*.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, L.J. 1963. Transfer of a fominant type of resistance to the four know ohio pathogenic strains of tobacco mosaic viris (TMV), from Lycopersicon peruvianum to L.esculentum. Phytopathology, 53:869. (Abstract).
- ALEXANDER, L.J.; LINCON, R.E. & WRIHT, V. 1944. A survey of the genus Lycopersicon for resistance to the important tomato diseases occurring in ohio and Indiana. Plant Dis. Rep.,136: 5-57. (Suppl.).
- ALLARD, R.W. 1960. Principles of plant breeding. John Wiley & Sons, Inc. Chap. 20:234-242.
- ANDERSON, EDGAR. 1939. Recombination in species crosses. Genetics 24:668-698.
- ANGORA, G.; SACCARDO, F.; CAPPADOCIA, M. & RAMULU, K. 1981. Backcross progenies from Lycopersicon esculentum x Hibrid (L.esculentum x L. peruvianum Mill) Z. Pflzücht, 87(2):153-157.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. 1983. Rio de Janeiro, Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, v. 44.
- BARBANO, P.P. & TOPOLESKI, L.D. 1984. Postfertilization hybrid seed failure in Lycopersicon esculentum x Lycopersicon peruvianum ovules. J. Am. Soc. Hortic Sci., 109(1): 95-100.
- BOHN, G.W. 1948. Sesquidiploid F₁ Hybrids of Lycopersicon esculentum and L. peruvianum. Jour. of Agric. Res. 77:(2): 33-54
- BROSSARD, D. 1976. The influence of Kinetion on formation and ploid levels of buds arising from Nicotiana tabacum pith tissue grown "in vitro" Z. Pflanzenphysiol., 78:32-333.
- CLAYBERG, C.D.; BUTLER, L.; KERR, E.W.; RICK, C.M.; ROBINSON, R.W. 1966. Third lird of Kao genes in the tomato. J. Hered, 5:189-197.

CHOUDHURY, B. 1955a. Embryo culture Technique I. The growth of immature tomato embryo "in vitro". Indian J. Hort. 12: 143-151.

CHOUDHURY, B. 1955b. Embryo culture Technique II. "Embryo factors" and immature tomato embryo. Indian J. Hort. 12: 152-154.

CHOUDHURY, B. 1955c. Embryo culture Technique III. Growth of hybrid embryos (Lycopersicon esculentum x Lycopersicon peruvianum) in culture medium. Indian J. Hortic., 12:155 - 156.

CIONINI, P.G.; BENNICI, A.; ALPI, A. & D'AMATO, F. 1976. Suspensor, gibberellin and in vitro development of Phaseolus coccineus embryos. Planta, 131:115-117.

COPPER, D.C. & BRINK, R.A. 1940. Somatoplastic sterility as a cause of seed failure after interspecific hybridization. Genetics, 25:593-617.

CORSI, G. 1972. The suspensor of Eruca sativa Miller (Cruciferae) during embryogenesis "in vitro". G. Bot. Ital., 106: 41-54.

CURRENCE, T.M. 1963. Tomato Breeding. I. Species, origin and botanical characters. Handbuch der Pflanzenzuchtung, 2: 351-369.

CUTTER, V.M. Jr. & WILSON, K.S. 1952. The effect of coconut milk and endosperm upon the in vitro development of embryos of Cocos nucifera. (Unpublished; paper presented on 9/10/1952 at AIBS meeting at Cornell Univ.).

EVANS, D.A. & SHARP, W.R. 1983. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. Science, 221: 949-951.

EVANS, D.A.; SHARP, W.R. & MEDINA, FILHO, H.P. 1984. Somoclonal and gametoclonal variation. Am. J. Bot., 71(6): 759 - 774.

- FINLAY, K.W. 1952. Inheritance of spotted wilt resistance in the tomato. 1. Identification of strains of the virus by resistance or susceptibility. Aust. J. Sci. Res., 5: 303.
- GAMBORG, O.L. & DUNN-COLEMAN, N.S. 1983. New plant variants and hibrids from somatic cells. In: MIAMI WINTER SYMPOSIUM, 15.11, 19p.
- HAQ, N.; SMARTT, J. & LANE, G.R. 1973. Causes interspecific hybrid abortion in Phaseolus. Annu. Rep. Bean Improvement Coop., 16:31-32.
- HAVRÁNEK, P. & NOVÁK, F.J. 1973. The Bud Formation in the Callus Culture of Allium sativum L. Z. Pflanzenphysiologie. 68:308-318.
- HEATON, T.B. 1929. The effect of inhibition of connective tissue growth by means of substance present in tissue extracts. II. J. Pathol. Bacteriol., 32:565.
- HEINZ, D.J. & MEE, G.W.P. 1971. Morphologic, cytogenetic, and enzymatic variation in Saccharum species hybrid clones derived from callus tissue. Am. J. Bot., 58:258-262.
- HOAGLAND, D.R. & SNYDER, W.C. 1934. Nutrition of strawberry plant under controlled conditions: (A) effects of boron and certain other elements; (B) susceptibility to injury to sodium salts. Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 30:288-294.
- HOGENBOOM, N.G. 1972a. Breaking breeding barriers in Lycopersicon. 1. The genus Lycopersicon, its breeding barriers and the importance of breaking these barriers. Euphytica, 21: 221-227.
- HOGENBOOM, N.G. 1972b. Breaking breeding barriers in Lycopersicon. 2. Breaking of self-incompatibility in L. peruvianum (L.) Mill. Euphytica, 21:228-243.

- HOGENBOOM, N.G. 1972c. Breaking breeding barriers in Lycopersicon. 3. Inheritance of self-compatibility in L. peruvianum (L.) Mill. Euphytica, 21:244-256.
- HOGENBOOM, N.G. 1972d. Breaking breeding barriers in Lycopersicon. 4. Breakdown of unilateral incompatibility between L. peruvianum (L.) Mill. and L. esculentum Mill. Euphytica 21:397-404.
- HOGENBOOM, N.G. 1972e. Breaking breeding barriers in Lycopersicon. 5. The inheritance of the unilateral incompatibility between L. esculentum Mill and the genetic of its breakdown. Euphytica, 21:405-414.
- INST. ECON. AGRIC. 1976. Prognóstico 76/77. Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo, 5:203-211.
- ILLG, R.D. & SIQUEIRA, W.J. 1984a. High frequency of plant regeneration from leaf explants in six Lycopersicon esculentum Mill. cultivars. Rev. Bras. Bot., 7(1):1-4.
- ILLG, R.D. & SIQUEIRA, W.J. 1984b. Variabilidade genética induzida através da cultura de tecidos. In: Aguiar-Perecin, M. L.R.; Martins, P.S. & Bandel G. (eds.). Tópicos de citogenética e evolução de plantas. Piracicaba. pp.125-135.
- JOHANSEN, D.A. 1940. Plant Microtechnique. New York, McGraw Hill Book Company. 523p.
- KAPIL, R.N. & TIWARI, S.C. 1978. The integumentary tapetum. Bot. Rev., 44:457-490.
- KERR, B.A. & BARLEY, D.L. 1964. Resistance of Cladosporium fulvum. Cke. obtained from wild species of tomato. Am. J. Bot., 42:1541-1554.
- KIKU, V.N.; KOSOVA, A.I.; ZAGINAILO, N.N. 1979a. Some methods of overcoming incompatibility in crosses between the cultivated tomato and Lycopersicon peruvianum. Referat. Zh., 1: 65-366.

- KIKU, V.N.; KOSOVA, A.I. & ZAGINAILO, N.N. 1979b. Economic importance of the tomato hibrid Lycopersicon esculentum Mill. x L. peruvianum v. dentatum Dun. Referat. Zh., 12:55 388.
- KIKU, V.N. 1980. Recombinants obtained after interespecific hybridization. Referat. Zh., 2:64-65.
- KIRKHAM, R.P. & HALLORAN, G.M. 1982a. Variation in crosscompatibility between cultivated tomato, Lycopersicon esculentum Mill., and the wild species, L. peruvianum (L) Mill. Z. Pflzucht., 88(2):89-102.
- KIRKHAM, R.P. & HALLORAN, G.M. 1982b. Cytology and fertility of hybrids between cultivated tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) and the wild species L. peruvianum (L.) Mill. Z. Pflzucht., 88(3):232-241.
- KASOVA, A.J. & KIKU, V.N. 1979. Features of fertilization and seed development in tomato following interespecific hybridization. Referat., 6:65-293.
- LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. 1983. Somoclonal variation and eyespot toxin tolerance in sugarcane. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2:111-121.
- LARKIN, P.J. & SCOWCROFT, W.R. 1981. Somoclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoret. Appl. Gent., 60:197-214.
- LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. & ZULLO, M.A.T. 1984. Fontes de resistência à Scrobipalpula absoluta (MEYRICK, 1917) em tomateiro. Bragantia, Campinas, 43(2):569-577.
- LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H.; SIQUEIRA, W.J. & FONSECA, M.I.S., 1985. Seleção de linhagens de tomateiro resistentes a Scrobipalpula absoluta (MEYRICK). Hort.Bras. 3(1):77.
- MACARTHUR, J.V. & CHIASSON, L.P. 1947. Cytogenetic notes on tomato species and hybrids. Genetics, 32:165-177.
- MAKISHIMA, N. 1978. A importância da tomaticultura no Brasil. Campinas, Coordenadoria de Assistência Técnica Intergal (mimeografiado).

MARTIN, F.W. 1961. Complex unilateral hybridization in Lycopersicon hirsutum. Proc. Nat. Acad. Sci., 17:855-857.

McFARLANE, J.S.; HARTZLER, E. & FRAZIER, W.A. 1946. Breeding tomatoes for nematode resistance and for high vitamin C content in Hawaii. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci., 47:262-270.

MCGUIRE, D.C. & RICK, C.M. 1954. Self-incompatibility in species of Lycopersicon sect. Eriopersicum and hybrids with L. esculentum. Hilgardia, 23(4):101-104.

MEDINA-FILHO, H.P. & STEVENS, M.A. 1980. Tomato breeding for nematode resistance: Survey of resistant varieties for horticultural characteristics and genotype of Aps. 1. Acta Horticultural, 100:383-393.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

NAGAI, H. 1975. Resistência ao vírus vira-cabeça em tomateiro derivado do cruzamento entre Lycopersicon esculentum e L. peruvianum. - R. Oleric., Botucatu, 15:22-23 (Resumo).

NAGAI, H. 1978. Curso de tomate. Melhoramento do tomateiro. Campinas. Coordenadoria de Assist. Técnica Integral, 21p. (mimeografiado).

NAKAMURA, C.; KELLER, W.A. & FEDAK, G. 1981. "In vitro" propagation and chromosome doubling of a Triticum crassum x Hordeum vulgare intergeneric hybrid. Theor. Appl. Genet., 60:89-96.

NETTANCOURT, D. de; DEVREUS, M.; BOZZINI, A.; CRESTI, M.; PACINI, E. & SARFATTI, G. 1973a. Ultrastructural aspects of the Self-incompatibility mechanism in Lycopersicon peruvianum. J. Cell. Sci., 12:401-419.

- NETTANCOURT, D. de; DEVREUX, M.; LANERI, U.; PACINI, E.; CRESTI, M. & SARFATTI, G. 1973b. Ultrastructural aspects of Unilateral interspecific in compatibility between Lycopersicon peruvianum and L. esculentum. Caryologica, 25:207 - 217.
- NETTANCOURT, D. de; DEVREUX, M.; LANERI, U.; CRESTI, M.; PACINI, E. & SARFATTI, G. 1974a. Genetical and structural aspects of self and cross incompatibility in interespecific hybrids between self-compatible Lycopersicon esculentum self-incompatible L. peruvianum. Theoret. Appl. Genet.; 44 (6):278-288.
- NETTANCOURT, D. de; SACCARDO, F.; LANERI, U.; CAPPACCIO, E.; WESTERHOF, M. & ECOCHARD, R. 1974b. Self-compatibility in a spontaneous tetraploid of Lycopersicon peruvianum Mill. Int. Atom. En., 77-84.
- NEWCOMB, W. & FOWKE, L.C. 1974. Stellaria media embryogenesis: the development and ultrastructure of the suspensor. Can. J. Bot., 52:607-614.
- PORTE, W. 1945. A cross between Lycopersicon esculentum and Diseases-Resistance L. peruvianum. Phytopathological notes. Phytopathology, 35:931-932.
- PRINKHOD'KO, N.J. & VUROB'EVA, G.A. 1979. The production of amphidihaploids and ampridiploids of Lycopersicon esculentum Mill. x L. peruvianum Mill. by means of in vitro culture. Referat. Zh., 10:65-45.
- PRITCHARD, H.N. 1964. A cytochemical study of embryo development in Stellaria media. Am. J. Bot., 51:472-479.
- RAGHAVAN, V. 1966. Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. Biol. Rev., 41:1-58.
- RAPPAPORT, J.J. 1965. Ovular tumors in incompatible plant crosses. In: RUHLAND, W. ed. Differentiation and development. Handbuch der Pflanzenphysiologie XV (2). Berlin, Springer-Verlag. p.197-208.

- REISCH, B. & BINGHAM, E.T. 1981. Plants from ethionine-resistant alfalfa tissue cultures: variation in growth and morphological characteristics. *Crop Sci.*, 21:783-788.
- RICK, C.M. & LAMM, R. 1963a. Barriers to interbreeding in Lycopersicon peruvianum. *Evolution*, 17:216-232.
- RICK, C.M. & LAMM, R. 1963b. Differential zygotic lethality in a tomato species hybrid. *Genetics*, 48:1497-1507.
- RICK, C.M. 1967. Exploiting species hybrids for vegetable improvement. *Proc. XVII Intern. Hort. Congress.* 3:217-229.
- RICK, C.M. 1973. Potential genetic resources in tomato species clues from observations in native habitats. In: A.M. Genes, Enzymes, and Populations. New York, Plenum Press. 255-259.
- RICK, C.M. & FOBES, J.F. 1975. Allozymes of galapagos tomatoes: Polymorphism, geographic distribution and affinities. *Evolution*, 29:443-457.
- RICK, C.M. & SMITH, P.G. 1953. Novel variation in tomato species hybrids. *Am. Nat.*, 87:359-373.
- RICK, C.M. 1979. Evolution of interspecific barriers in Lycopersicon. In: BROADENING GENETIC BASE OF CROPS PROCEEDING OF THE CONFERENCE. Wageningen.
- RICK, C.M. & BUTLER, L. 1956. Cytogenetics of the tomato. *Adv. Genet.*, 8:267-382.
- SACCARDO, F.; ANGORA, G. & RAMULU, K. 1981. Transfer of useful characters from Lycopersicon peruvianum to L. esculentum. In: GENETICS AND BREEDING OF TOMATO PROC. OF THE MEETING OF THE EUCARPIA TOMATO WORKING GROUP. 235-242.
- SACHET, M.H. 1948. Fertilization in six incompatible species crosses of Datura. *Am. J. Bot.*, 35:302-309.

SATINA, S. & RIESTSEMA, J. 1959. Seed development. In: AVERY, A.G.; SATINA, S. and RIESTSEMA, J. eds. *Blakeslee: the genus Datura*. New York, Ronald Press. p.181-195.

SCHUTZ, P. & JENSEN, W.A. 1969. *Capsella* embryogenesis: the suspensor and the basal cell. *Protoplasma*, 67:139-163.

SHAW, G.R. & PRASAD, R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. *Biochem. Genetics*. 4: 297-320.

SAWANT, A.C. 1958. Cytogenetics of interespecific hybrids *Lycopersicon esculentum* Mill. x *L. hirsutum* Humb, and Bonpl. *Genetics*, 43:502-514.

SHEPARD, J.F.; BIDNEY, D. & SHAHIN, E. 1980. Potato protoplasts in crop improvement. *Science*, 208:17-24.

SKIRM, G.W. 1942. Embryo culturing as an aid to plant breeding. *J. Hered.*, 33:211-215.

SMITH, P.G. 1944. Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 44:413-416.

SÖNDAHL, M.R. & SHARP, W.R. 1979. Research in *Coffea* spp. and applications of tissue culture methods. In: SHARP, W.R. et al., eds. *Plant Cell and Tissue Culture*. USA, The Ohio State Univ. Press. p.527-584.

SZTEYN, K. 1962. Interespecific crosses in the genus *Lycopersicon*. I. Backcrosses to *Lycopersicon glandulosum*. *Euphytica*, 11:149-156.

SZTEYN, K. 1965. Interespecific crosses in the genus. II. Advantage of using tetraploids tomatoes as pistillate parents in interespecific crosses. *Euphytica*, 14:209-216.

TANKSLEY, S.D. 1979. An efficient and economical design for starch-gel electrophoresis. *Rep. Tomato Genetics Coop.*, 29:37-38.

- TAYLOR, I.B. & AL-KUMMER, M.K. 1982. The formation of complex hybrids between Lycopersicon esculentum and Lycopersicon peruvianum, and their potential use in promoting interespecific gene transfer. *Theor. Appl. Genet.*, 61(1):59-63.
- THOMAS; B.R. & PRATT, D. 1981. Efficient hybridization between Lycopersicon esculentum and L. peruvianum via Embryo callus. *Theor. Appl. Genet.*, 59:215-219.
- TORRES, A.C. 1984. "In vitro" culture of Ovularies of Lycopersicon esculentum Mill. and L. peruvianum (L.) Mill. Riverside, Univ. of California. 175p. Tese. (Doutorado).
- UENO, I.H. 1979. Tomate. In: *Prognóstico 79/80*, São Paulo. p. 118-119. Instituto de Economia Agrícola.
- VILLAREAL, R.L. 1979. Tomato production in the tropics. Problems and Progress. In: *LAST INTERNATIONAL AND TROPICAL TOMATO*, Taiwan edited by Robert Cowell. *Proceeding: Asian Vegetable research and Development Center*. p.6-21.
- VOROB'EVA, G.A. & RPINKHOD'KO, N.I. 1980. Use of "in vitro" embryo culture to obtain interespecific tomato hybrids. *Trudy prikl. Bot. Genet. Selek.*, 67(3):64-74.
- VULKOVA-ACHKOVA, Z.V. & STOEVA, P.K. 1979. Unilateral and bilateral hybridizations of L. peruvianum Mill., with certain self compatible species. *Landw Zentbl.*, 24(9):109-111.
- WEAVER, J.B. 1957. Embryological studies following interespecific crosses in Gossypium. I.G. x G. arboreum. *Am. J. Bot.* 44:209-214.
- YEUNG, E.C. 1980. Embryogeny of Phaseolus: the role fo the suspensor. *Z. Pflanzenphysiol.*, 96:17-25.
- YEUNG, E.C. & SUSSEX, J.M. 1979. Embryogeny of Phaseolus co-cineus: the suspensor and the growth of the embryo-proper in vitro. *Z. Pflanzenphysiol.*, 91:423-433.