

BC/36475

IB/80575

UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

RICARDO TADEU DE FARIA

INTROGRESSÃO DA CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO DE
PLANTAS "IN VITRO" DA ESPÉCIE (Lycopersicon pimpinellifolium

PARA CULTIVARES COMERCIAIS DO TOMATEIRO
(Lycopersicon esculentum Mill.)

ORIENTADOR: PROFº DR. ROLF DIETER ILLG

CAMPINAS - SP

1998

T/UNICAMP

F225_i

RICARDO TADEU DE FARIA

**INTROGRESSÃO DA CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS
"IN VITRO" DA ESPÉCIE *Lycopersicon pimpinellifolium*
PARA CULTIVARES COMERCIAIS DO
TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
RICARDO TADEU DE FARIA
e aprovada pela Comissão Julgadora

Tese apresentada à Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do Título de Doutor
em Biologia.
Área de concentração: Genética Vegetal.

33/12/98
Rolf Dieter Illg
Orientador: Prof. Dr. Rolf Dieter Illg

CAMPINAS - SP

1998

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	
V.	2
TIPO	36475
DATA	229/99
C	0 ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	23/02/99
N.º CIRC.	4002206475

**FICHA CATALOGRÁFICA ELEBORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Faria, Ricardo Tadeu

F225i Introgessão da capacidade de regeneração de plantas
"in vitro" da espécie *Lycopersicon pimpinellifolium* para
cultivares comerciais do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*
Mill).

Ricardo Tadeu de Faria -- Campinas, SP : [s.n.], 1998.
72f.: ilus

Orientador: Rolf Dieter Illg

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

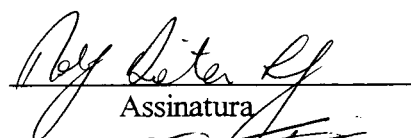
1. Tomate. 2. Células - cultura. 3. Plantas - regeneração. 4.
Biotecnologia. I. Illg, Rolf Dieter. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, _____ de _____ de 1998.

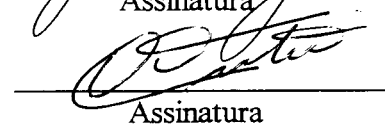
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

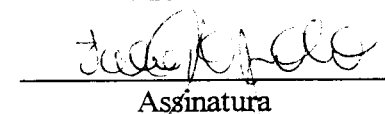
Dr. ROLF DIETER ILLG (ORIENTADOR)


Assinatura

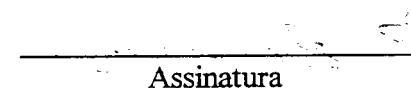
Dr. DEONISIO DESTRO


Assinatura

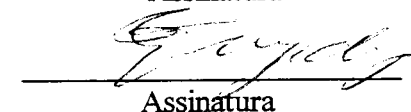
Dra. VALÉRIA CARPENTIERI PÍPOLO


Assinatura

Dr. WALTER JOSÉ SIQUEIRA


Assinatura

Dr. HERCULANNO PENNA MEDINA FILHO


Assinatura

SUPLENTES:

Dr. RICARDO MONTALVÁN DEL AGUILA

Assinatura

Dra. SIMONE LILIANE KIRSZENZAFIT SHEPHERD

Assinatura

A meus pais

José Celso Faria

e Tereza Aparecida Buganza Faria

pela confiança e apoio em todas

etapas da minha vida

DEDICO

A meus irmãos

Mara Cristina de Faria

José Eduardo de Faria

Fábio Augusto de Faria

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Rolf Dieter Illg pela orientação, estímulo, amizade e confiança durante a realização deste trabalho.
- A minha família pelo incentivo, apoio e confiança durante todos esses anos.
- À Universidade Estadual de Campinas pelos conhecimentos adquiridos durante o curso de Pós-Graduação
- Ao Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina pelo apoio na fase de redação desse trabalho.
- Ao Conselho Nacional de Pesquisa pela concessão da bolsa de doutorado.
- Ao pesquisador Dr. Walter José Siqueira pelo fornecimento do germoplasma de tomateiro e pelas sugestões apresentadas durante a execução desse trabalho.
- Aos professores: Dr. William José da Silva, Dr. Aquiles Piedrabuena e Dr. Ivanhoé Rodrigues Baracho pelos ensinamentos e sugestões durante a elaboração dessa tese.
- Ao Sr. Pedro Maria (Formiga) pela amizade e auxílio nos trabalhos de campo.
- As técnicas de laboratório Antonia Nadir Dallacqua e Edna dos Santos pela amizade e colaboração durante esse anos de convivência.

- Aos colegas do Depto. de Genética da UNICAMP: Alfredo, Juverlandi, Gilberto, Maria, Marta, Gisa, Marcos, Ingrid e Ricardo pela amizade e convívio durante o curso.
- As secretárias do Dept. de Genética e Evolução: Tereza, Ana Rita e Célia pela atenção e cordialidade durante a elaboração dessa tese.
- Aos pesquisadores Dr. Gil Serra e Pedro Magalhães que concordaram com o término desse trabalho no Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP.
- Aos colegas do CPQBA: Marcos, Simone, Ílio, Gleen, Benício, Moisés, Aparecido, Marta, Érika, Mariana e Ana Paula pela colaboração e amizade durante a finalização desse trabalho.
- A Prof. Dra. Nilva Teresinha Teixeira pela minha iniciação na carreira científica.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	01
2. <u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	04
2.1. HISTÓRICO, ORIGEM E CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS.....	04
2.2. HIBRIDIZAÇÃO INTERESPECÍFICA NO TOMATEIRO.....	07
2.3. A GENÉTICA DA REGENERAÇÃO DE PLANTAS NO TOMATEIRO.....	09
2.4. TRANSFERÊNCIA DA CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS “IN VITRO” NO TOMATEIRO E EM OUTRAS CULTURAS.....	10
3. <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	12
3.1. GERMOPLASMA.....	12
3.2. CRUZAMENTOS ARTIFICIAIS	14
3.3. MÉTODO DOS RETROCRUZAMENTOS.....	15
3.4. SELEÇÃO DAS PLANTAS COM ALTA CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS.....	17

3.5. ESTERILIZAÇÃO DAS SEMENTES PARA OBTENÇÃO DOS	
EXPLANTES.....	18
3.6. MEIOS DE CULTURA.....	18
3.6.1. MEIO PARA GERMINAÇÃO DE SEMENTES.....	18
3.6.2. MEIO PARA INDUÇÃO DE CALOS.....	19
3.6.3. MEIO PARA REGENERAÇÃO DE PLANTAS.....	19
3.6.4. MEIO PARA PROPAGAÇÃO E ENRAIZAMENTO DOS	
ÁPICES	20
3.6.5. PROCEDIMENTO PARA INDUÇÃO DE CALOS.....	20
3.6.6. PROCEDIMENTO PARA REGENERAÇÃO DE PLANTAS.....	20
3.7. AVALIAÇÃO DO PESO MÉDIO DOS FRUTOS NOS SUCESSIVOS	
RETROCRUZAMENTOS	21
4. <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	22
4.1 CRUZAMENTOS ARTIFICIAIS	22
4.2. ESTERILIZAÇÃO DAS SEMENTES PARA OBTENÇÃO DOS	
EXPLANTES.....	23
4.3. MEIO PARA GERMINAÇÃO DE SEMENTES	23
4.4. MEIO PARA INDUÇÃO DE CALOS.....	23
4.5. MEIO PARA REGENERAÇÃO DE PLANTAS.....	24
4.6. MEIO PARA PROPAGAÇÃO E ENRAIZAMENTO DOS ÁPICES....	26

4.7. SELEÇÃO DAS PLANTAS COM ALTA CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS.....	29
4.8. AVALIAÇÃO DO PESO MÉDIO DOS FRUTOS RESULTANTES DO PRIMEIRO RETROCRUZAMENTO COM OS PARENTAIS RECORRENTES DE <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	31
4.9. AVALIAÇÃO DO PESO MÉDIO DOS FRUTOS RESULTANTES DO SEGUNDO RETROCRUZAMENTO COM OS PARENTAIS RECORRENTES DE <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	36
4.10.AVALIAÇÃO DO PESO MÉDIO DOS FRUTOS RESULTANTES DO TERCEIRO RETROCRUZAMENTO COM OS PARENTAIS RECORRENTES DE <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	41
4.11.AVALIAÇÃO DO PESO MÉDIO DOS FRUTOS RESULTANTES DO QUARTO RETROCRUZAMENTO COM OS PARENTAIS RECORRENTES DE <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	45
5. <u>CONCLUSÕES</u>	58
6. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	59
7. <u>APÊNDICE</u>	72
. LISTA DE ABREVIATURAS	
.. INHERITANCE OF IN VITRO PLANT REGENERATION ABILITY IN THE TOMATO	

INTROGRESSÃO DA CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS “IN VITRO” DA ESPÉCIE *Lycopersicon pimpinellifolium* PARA CULTIVARES COMERCAIS DO TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

RICARDO TADEU DE FARIA

RESUMO

Para a aplicação com sucesso das técnicas de cultura de tecidos e biologia molecular é necessário que as células apresentem capacidade de regenerar plantas completas em alto rendimento. No entanto, o tomateiro cultivado (*Lycopersicon esculentum*) apresenta um baixo potencial organogênético quando comparado com as espécies selvagens. Tendo-se como base os estudos da genética da regeneração descritos por FARIA (1992) e FARIA & ILLG (1996) foram selecionados para este trabalho o genótipo selvagem WV-700 (*Lycopersicon pimpinellifolium*), com alta capacidade de regeneração de plantas, e três cultivares comerciais de *L. esculentum* (Petomech, Santa Rita e VFN-8), recalcitrantes para esta característica. Estudos da herança da regeneração nos genótipos de tomate acima mencionados, mostraram que a capacidade de regeneração de plantas a partir de calos é controlada pela interação de dois genes dominantes. Dessa maneira, é possível a transferência dessa característica encontrada

na espécie selvagem para cultivares comerciais. Os híbridos F_1 resultantes do cruzamento de *L. pimpinellifolium* com os três cultivares comerciais de *L. esculentum* produziram frutos pequenos e sem valor comercial. Os resultados da regeneração de plantas, após quatro ciclos de retrocruzamento para os parentais recorrentes de *L. esculentum* (Petomech, Santa Rita e VFN-8), mostraram que a alta capacidade de regeneração de plantas foi mantida em algumas plantas das progênes dos retrocruzamentos para os três parentais recorrentes. Desse modo, foi demonstrado que, por meio de sucessivos retrocruzamentos, é possível se transferir para o tomateiro comercial os alelos que controlam a capacidade de regeneração de plantas presentes na espécie silvestre *L. pimpinellifolium* e recuperar a produtividade e qualidade dos frutos dos cultivares de *L. esculentum*.

INTROGRESSION OF THE PLANT REGENERATION CAPACITY IN
VITRO OF *Lycopersicon pimpinellifolium* FOR TOMATO COMMERCIAL
CULTIVARS (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

RICARDO TADEU DE FARIA

SUMMARY

For the successful application of techniques of tissue culture and molecular biology, the cells must present the capacity to regenerate complete plants at high return. However, the cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*) presents low organogenetic potential when compared with wild species. Based on studies on regeneration genetics done by FARIA (1992) and FARIA & ILLG (1996), for the present study were selected the wild genotype WV-700 (*Lycopersicom pimpinellifolium*), with high capacity of plant regeneration, and three *L. esculentum* commercial cultivars (Petomech, Santa Rita and VFN-8), recalcitrant to that characteristic.

Studies of the regeneration genetic base in the tomato genotypes mentioned show that the regeneration ability of plants based on calluses is controlled by an interaction of two dominant genes. That way, its transference from wild species to commercial cultivars is possible. The F_1 hybrid, resulting from the cross-breed of *L. pimpinellifolium* with three *L. esculentum* cultivars, produced small fruit with no commercial value. The results of plant regeneration after four back-crosses for the *L. esculentum* recurrent commercial cultivar (Petomech, Santa Rita and VFN-8) showed that the high capacity of plant regeneration was maintained in some plants of the back-cross progeny for the three recurrent commercial cultivars. Thus, it was demonstrated that, by means of successive back-crosses, it is possible to introgress the alleles that control the plants regeneration ability and recuperate the fruit productivity and quality of tomato cultivars.

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro é hoje, dentre as hortaliças, a que apresenta maior interesse econômico. Além de ser consumido ao natural, ele é ainda extensamente explorado pela indústria, na forma de sucos, purês, extratos e diversos outros produtos. Seu cultivo se espalha por vastas regiões agrícolas do território brasileiro e a demanda do mercado, sempre crescente, mostra que sua expansão ainda está longe de ter atingido um final (NUEVO, 1994).

O início da tomaticultura no Brasil data do começo deste século, quando a produção era basicamente para o consumo *in natura*, havendo algumas formas de processamento doméstico para sua conservação (HOFFMANN, 1985).

Esta espécie tornou-se, por uma série de características favoráveis, muito estudada em trabalhos de genética. Entre as suas características favoráveis para os estudos genéticos estão: falta de duplicação gênica na arquitetura da planta ($2n=24$); alta taxa de autopolinização; e facilidade de hibridizações controladas. Além disso, é uma planta fácil de ser cultivada, tem um ciclo de vida curto e produz grande quantidade de sementes. As pesquisas produziram mapas cromossômicos que se situam entre os melhores obtidos para plantas superiores (RICK, 1978).

Durante o processo de domesticação os cultivares de tomateiro foram selecionados principalmente para características de produtividade, perdendo porém muitos genes que conferiam resistência às doenças, causadas por fungos, bactérias e vírus, e aos insetos.

A tomaticultura é hoje uma das atividades agrícolas que mais utiliza fungicidas e inseticidas em pulverizações, havendo a necessidade de obtenção de cultivares resistentes a doenças e pragas.

Devido à variabilidade genética restrita dos genótipos de tomate cultivado é importante avaliar o potencial genético dos taxons selvagens, incluindo o antecessor (var. cerasiforme) e as outras espécie do gênero *Lycopersicon* (RICK, 1982).

O melhoramento de plantas pelos métodos tradicionais de hibridização interespecífica e seleção tem sido usado com bons resultados onde não há barreiras de incompatibilidade.

No entanto, com o desenvolvimento das técnicas de Engenharia Genética os genes disponíveis para o melhorista não mais limitam-se àqueles encontrados nos gêneros e espécies dentro do mesmo “complexo genético”. Hoje já é possível introduzir num cultivar genes de espécies muito distantes geneticamente e inclusive de origem não vegetal.

O método mais bem sucedido, até o presente, para a obtenção de plantas transgências do tomateiro, baseia-se no uso de vetores de linhagens selvagens de *Agrobacterium tumefaciens*, que permitem a inserção estável e a expressão de genes exógenos em plantas (FISCHHOFF, 1987, GIELEN et al., 1991).

Para a aplicação com sucesso das técnicas de cultura de tecidos e biologia molecular é necessário que as células apresentem capacidade de regeneração de plantas intactas em alto rendimento. No entanto, o tomateiro cultivado (*Lycopersicon esculentum* Mill.) tem baixo potencial organogenético quando comparado com as espécies selvagens.

Estudos da base genética da regeneração em genótipos de tomate mostram que a capacidade de regeneração de plantas, a partir da cultura de calos, é uma característica altamente herdada, possibilitando assim sua transferência de espécies selvagens para cultivares comerciais (FRANKEBERGER, 1981b; KOORNNEEF et al. , 1987; FARIA, 1992).

Programas de melhoramento voltados especialmente para a produção de genótipos com alta capacidade de regeneração de plantas tem sido descrito para várias espécies vegetais como: alfafa (BINGHAM, 1975), batata (TEMPLETON-SOMERS, et al. , 1986), trigo (KALEIKAU et al., 1989) e tomate (KOORNNEEF, et al., 1986).

A transferência da capacidade de regeneração de plantas para cultivares brasileiros de tomate de interesse agrônômico são de grande importância para selecionar genótipos favoráveis para futuros trabalhos de hibridização somática, cultura de anteras visando a produção de haplóides, seleção *in vitro* e transformação genética.

O presente trabalho teve por objetivo realizar a introgressão da característica regeneração de plantas da espécie selvagem *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. para cultivares comerciais da espécie *Lycopersicon esculentum* Mill. utilizando-se o método dos retrocruzamentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. HISTÓRICO, ORIGEM E CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS

O tomate é originário da região que compreende o norte do Chile ao Equador, entre o Oceano Pacífico e os Andes, e as Ilhas Galápagos (JENKINS, 1948).

No século XVI até início do século XVII, o tomate foi cultivado nos jardins da Europa, como ornamental e afrodisíaco e pela beleza de seus frutos com o nome de “pomme d’amour”. Durante um século ou mais, o tomate foi tido como venenoso, provavelmente por ser membro das solanáceas, temida pelos europeus da época como uma família de plantas venenosas, tendo por isso o povo relutado em usá-lo como alimento (HEISER, 1977; RICK, 1978).

A toxicidade de certas espécies desta família é atribuída aos alcalóides. O alcalóide predominante no tomate é a tomatina que, embora em altas concentrações na folhagem e nos frutos verdes, transforma-se em composto inerte nos frutos maduros. Os italianos foram os primeiros a cultivar o tomate em 1550 e, provavelmente, os primeiros que utilizaram-no na alimentação humana em meados do século XVIII (RICK, 1978).

O tomateiro foi domesticado no México, e uma prova disso é que o tomateiro silvestre não possui nomes nativos nos Andes, mas é conhecido na língua Nahuatl do México pelo nome de TOMATL, que seria obviamente a origem do nome atual desta planta (SMITH, 1968).

O uso do tomate foi amplamente difundido do século XIX em diante, mas a suposição de que as plantas fossem venenosas persistiu amplamente mesmo no século XX em muitas áreas, incluindo a América do Norte, para a qual a planta tinha sido levada por colonizadores (RICK, 1978).

No Brasil, a introdução do tomate deve-se aos imigrantes italianos do fim do século passado. A cultura se desenvolveu com a vinda dos imigrantes japoneses, porém, somente para fins de consumo *in natura*. Em apenas três décadas de processo de seleção, o tamanho e o peso médio do tomate do grupo “Santa Cruz” foram dobrados, adquirindo considerável capacidade de adaptação e elevado valor comercial em todo o mundo (NAGAI, 1993).

A indústria do tomate no Brasil iniciou-se durante a Segunda Guerra Mundial. Até então, a maior parte do tomate industrializado era importado da Argentina ou Itália, com uma pequena produção de origem caseira. A partir de 1950, a indústria tomou um impulso muito grande, estabilizando-se na década de 60 e tomando um novo alento a partir de 1970. Hoje o Brasil situa-se entre os maiores produtores mundiais, juntamente com os Estados Unidos, Itália, Grécia, Egito, Turquia, Espanha, México, Portugal (MINAMI, 1982).

Essa conjuntura favorável, a partir de 1970, provocou a reestruturação da indústria de derivados de tomate. Os equipamentos se modernizaram e aumentou também a vinculação da indústria com os produtores de tomate rasteiro impondo profundas transformações no segmento agrícola, visando sobretudo, a garantia de suprimento da matéria-prima e controle de qualidade. A indústria ampliou seus níveis de exigência tecnológica, passando a firmar contratos de fornecimento apenas com

tomaticultores que atendessem aos padrões tecnológicos mínimos requeridos pela indústria. (HESPANHOL, 1991).

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) é uma planta dicotiledônea, pertencente a família Solanaceae. O gênero *Lycopersicon* possui dois subgêneros : *Eulycopersicon* e *Eriopersicon* . Atualmente, o gênero *Lycopersicon* é composto por nove espécies. O gênero *Eulycopersicon* compreende as espécies *L. esculentum* (tomate cultivado) e *L. pimpinellifolium*, ambos com frutos avermelhados quando maduros. O gênero *Eriopersicon*, compreende as espécies: *L. chilense*, *L. peruvianum*, *L. hirsutum*, *L. parviflorum* , *L. cheesmanii*, *L. pennellii* e *L. chmielewskii*, de frutos verde e arroxeados quando maduros (WARNOCK, 1988).

O caule do tomateiro novo é herbáceo, suculento e coberto de pêlos glandulares, tornando-se lenhoso e fino quando a planta cresce. Quanto ao hábito de crescimento o tomateiro pode ser de crescimento indeterminado (apresentam dominância apical) ou determinado (sem dominância apical). O sistema radicular é pivotante. As raízes podem alcançar até 1,5 m de profundidade desde que não sejam danificadas no transplante e consequentemente, infectadas por patógenos (ex.: nematóides), impedidas por camadas adensadas de solo, debilitadas por deficiências nutricionais, etc. As folhas são alternadas, compostas de número ímpar de folíolos e cobertas com pêlos, na maioria glandulares, que emitem um cheiro característico ao serem esmagados com o manuseio. As flores são hermafroditas e a polinização é por autofecundação. RICK, (1958), em seus estudos realizados com tomates silvestres do Equador, Peru e parte do norte do Chile, observou que, ao contrário do que sucede com o tomate comum, que é principalmente autógamo, ocorre alta taxa de cruzamento natural nas espécies silvestres.

Os frutos são carnosos e suculentos (baga) e possuem formato globular-achatado a alongado. Os cultivares do grupo Santa Cruz possuem de dois a três lóculos e os cultivares do grupo Salada de cinco a dez lóculos. As sementes são reniformes, pequenas, com pêlos bem curtos e de coloração marrom-clara, apresentando o embrião disposto internamente em espiral (PINTO & CASALI, 1980).

2.2. HIBRIDIZAÇÃO INTERESPECÍFICA NO TOMATEIRO

O gênero *Lycopersicon* é atualmente composto por nove espécies: *L. esculentum* Mill., *L. pimpinellifolium* Mill., *L. cheesmanii* Riley, *L. hirsutum* Humb & Bonpl., *L. penellii* D'Arcy, *L. chmielewskii* Rick, *L. parviflorum* Rick, *L. peruvianum* Mill. e *L. chilense*. Dun. (NAGAI, 1993).

Não existem barreiras nos cruzamentos entre *L. pimpinellifolium* e *L. esculentum*. Deste modo, é possível a introgressão de genes entre essas duas espécies (RICK, 1978). Por outro lado, de acordo com os estudos realizados por HOGENBOOM (1972 a, b) as espécies *L. peruvianum* e *L. chilense* apresentam sistemas de incompatibilidade nos cruzamentos interespecíficos com o tomateiro cultivado *L. esculentum*.

O tomateiro (*L. esculentum*) é um exemplo típico de planta cultivada que foi beneficiada com a introgressão experimental de genes de germoplasmas de espécies silvestres, apesar das dificuldades nos cruzamentos entre algumas espécies desse gênero (RICK & YODER, 1988).

As espécies *L. peruvianum* e *L. chilense* que mostram uma forma muito drástica de incompatibilidade com tomate cultivado (*L. esculentum*), há necessidade de fazer o

resgate de embriões imaturos para obtenção de plântulas híbridas (KINSARA et al, 1986; FONSECA, 1987).

De acordo com RICK (1982) e NAGAI (1993) muitas das doenças e pragas comuns do tomateiro cultivado (*L. esculentum*) encontram fatores genéticos de resistência dentro das espécies silvestres, como por exemplo:

- *L. peruvianum* LA 444-1 e *L. hirsutum* P.I. 134417: resistência à traça do tomateiro;
- *L. peruvianum* LA 444-1: resistência ao vírus da vira-cabeça, nematóides e fungo verticilium;
- *L. pimpinellifolium*: resistência a murcha de *fusarium*, murcha de *estenfilium* e murcha de *cladosporium*;
- *L. chilense*: resistência ao broto crespo;

Além da resistência a pragas e doenças, as espécies silvestres do tomateiro possuem outros genes de interesse no melhoramento genético como:

- *L. hirsutum*: resistência a baixas temperaturas;
- *L. pimpinellifolium*: resistência a altas temperaturas;
- *L. cheesmannii*: resistência a salinidade;
- *L. chmielewskii*: alta concentração de sólidos solúveis.

2.3. ANÁLISE GENÉTICA DA REGENERAÇÃO DE PLANTAS EM TOMATE

A regeneração de plantas a partir da cultura de calos de tomate tem sido descrita como uma característica genética dominante (FRANKENBERGER et al, 1981b; KUT & EVANS, 1982; ADAMS & QUIROS, 1985; KOORNNEEF et al, 1986; TAN et al, 1987; KOORNNEEF et al., 1987; WIJBRANDI et al., 1988 & FARIA, 1992) e controlada por dois genes dominantes com interação complementar (KOORNNEEF et al., 1987; FARIA, 1992; FARIA & ILLG, 1996).

De acordo com a análise dialélica para a regeneração de plantas de genótipos selecionados por FRANKENBERGER et al. (1981b), foi demonstrado que houve uma alta herdabilidade para a regeneração de plantas ($h^2 = 0,98$), sugerindo portanto um modelo de herança qualitativa para esta característica.

Uma alta herdabilidade para regeneração de plantas ($h^2 = 0,87$) também foi encontrada em uma população derivada de híbridos de *L. esculentum* (sem capacidade para regenerar plantas) e *L. peruvianum* (com alta capacidade de regeneração de plantas). Foi sugerido que provavelmente dois genes dominantes controlam a diferenciação de plantas a partir da cultura de calos estabelecidos de tomate, sendo que o crescimento dos calos e a regeneração de plantas não apresentaram correlação nas populações estudadas (KOORNNEEF et al., 1987).

O fato do genótipo silvestre *L. peruvianum* apresentar melhor resposta de regeneração de plantas quando comparado com *L. esculentum* havia sido descrito previamente tanto para a cultura de calos (MORGAN & COCKING, 1982; LOCKY, 1983) como para protoplastos (ZAPATA et al, 1977; MUHLBACH, 1980; THOMAS & PRATT, 1981).

Em alguns estudos sobre o controle genético da regeneração de plantas em tomate foi verificada a ocorrência de heterose e do efeito citoplasmático (OHKI et al., 1978; TAN et al., 1987).

Dos trabalhos analisados, pode-se concluir que a indução de calos com alta capacidade de regeneração de plantas é resultado da interação do genótipo e de vários outros fatores como: meio de cultura, tipo de explante, idade ontológica do tecido, balanço dos fitorreguladores e das condições ambientais (temperatura, umidade, luz, etc).

2.4. TRANSFERÊNCIA DA CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS “IN VITRO” NO TOMATEIRO E EM OUTRAS CULTURAS

KOORNNEEF et al. (1986), obtiveram um genótipo superior para regeneração de plantas “in vitro” a partir do cruzamento de *L. peruvianum* com *L. esculentum*. O genótipo denominado MsK93, apresentou ótimos resultados de regeneração nos experimentos de transformação de disco foliar mediada pela *Agrobacterium tumefaciens*. Apesar desses resultados satisfatórios foi verificado que o aborto de embriões continuou a ocorrer nos sucessivos retrocruzamentos com os cultivares comerciais, dificultando deste modo a recuperação das características agronômicas do fruto.

A transferência da característica regeneração de plantas da espécie silvestre para o tomate cultivado foi sugerida por WIJBRANDI et al. (1988), por meio da fusão de protoplastos de *L. peruvianum* e *L. esculentum*. Os híbridos somáticos apresentaram uma alta capacidade de regeneração de plantas e foram identificados pelo padrão isoenzimático para fosfatase ácida, locus Aps-1, localizada no cromossomo 6. O parental *L. peruvianum* é heterozigoto para este gene, enquanto *L. esculentum* é homozigoto para

diferentes alelos, o que resulta em uma única banda. O produto da fusão destas duas espécies apresenta as bandas parentais e algumas adicionais. Entretanto, pelo fato da espécie *L. peruvianum* apresentar frutos pequenos e verdes, mesmo quando maduros, e por continuar a ocorrer o aborto de embriões nos retrocruzamentos, não foi possível recuperar as características de fruto desejáveis agronomicamente da espécie *L. esculentum*.

Por outro lado, de acordo com os resultados descritos por FARIA & ILLG, 1996, a transferência da capacidade de regeneração de plantas de *L. pimpinellifolium* para cultivares comerciais de *L. esculentum*, por meio de sucessivos retrocruzamentos, deve ser conseguido sem grandes dificuldades, pelo fato desta espécie hibridizar-se facilmente com o tomate cultivado por não apresentar problemas de incompatibilidade, aborto de embriões e por apresentar frutos de coloração vermelha.

A transferência dos genes da regeneração para germoplasmas elite, via cruzamentos, tem sido descrito também para outras culturas como: alfafa (BINGHAM et al., 1975; WAN et al., 1988), milho (TOMES & SMITH, 1985; PRIOLI, 1987; NOVAK et al., 1988), trigo (BULLOCK et al., 1982; LAZAR et al., 1984) e trevo (BHOJWANI et al., 1984).

A realização de estudos complementares objetivando a identificação de genes marcadores ligados à regeneração de plantas são de fundamental importância para auxiliar nos programas de seleção e melhoramento para esta característica favorável nos trabalhos de cultura de tecidos (WAN et al., 1988; HOSPITAL et al., 1992; KOORNNEEF, 1993).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. GERMOPLASMA

O germoplasma que foi utilizado neste trabalho foram cedidos pelo pesquisador Dr. Walter Siqueira da Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas. A multiplicação do germoplasma foi realizada em casa de vegetação na área experimental do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas.

O genótipo selvagem WV-700 (*Lycopersicon pimpinellifolium* Mill.) com alta capacidade para regeneração de plantas e os três cultivares comerciais do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), recalcitrantes para esta característica, foram selecionados para este trabalho de acordo com os resultados descritos por FARIA & ILLG, 1991 (FIGURA 1).

Os três genótipos do tomateiro cultivado apresentam características distintas quanto ao grupo, hábito de crescimento e forma de utilização comercial (TABELA 1).



Figura 1. Morfologia dos frutos do genótipo selvagem WV-700 (*L.*

pimpinellifolium) com alta capacidade para regeneração de plantas e dos três cultivares comerciais de *L. esculentum* Mill. (Santa Rita, Petomech e VFN-8) recalcitrantes para esta característica.

TABELA 1. Descrição do grupo, hábito de crescimento e forma de utilização comercial dos genótipos de *L. esculentum* selecionados como parentais recorrentes.

Cultivar	Grupo	Hábito de crescimento	Forma de utilização comercial
Petomech	Quadrado	Determinado	Indústria
Santa Rita	Santa Cruz	Indeterminado	Consumo “in natura”
VFN-8	Caqui	Determinado	Consumo “in natura”

Com relação ao peso médio dos frutos, o genótipo silvestre *L. pimpinellifolium* (WV-700) produz frutos com 1,87g, enquanto o peso médio dos frutos do terceiro cacho dos cultivares comerciais são: Petomech (55,51g), Santa Rita (62,53g) e VFN-8 (110,66g).

3.2. CRUZAMENTOS ARTIFICIAIS

Visando a obtenção das progênes híbridas F_1 o genótipo selvagem WV-700 (*L. pimpinellifolium*), que apresenta uma alta capacidade para regeneração de plantas foi utilizado como doador de pólen no cruzamento com os cultivares recalcitrantes para essa característica: Petomech, Santa Rita e VFN-8 (*L. esculentum*).

A espécie selvagem *L. pimpinellifolium* não apresenta problemas de incompatibilidade com a espécie cultivada de *L. esculentum*, possibilitando cruzamentos interespecíficos dirigidos (RICK, 1978).

As flôres dos parentais recorrentes (Petomech, Santa Rita e VFN-8) foram emasculadas antes de se abrirem, com auxílio de uma pinça e os estigmas polinizados com um palito. A polinização foi repetida novamente 24 h após a emasculação para garantir o pegamento dos cruzamentos.

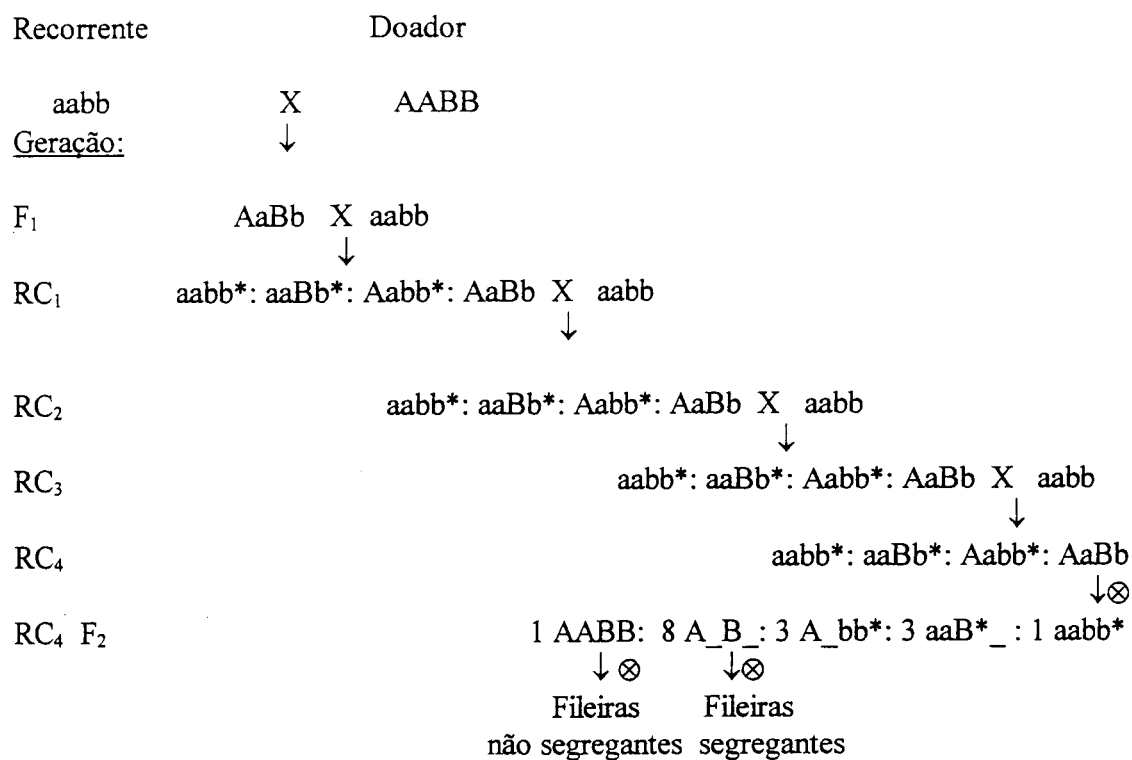
As flôres polinizadas foram marcadas com pedaços de lã colorida para identificação dos frutos originados pelos cruzamentos.

3.3. MÉTODO DOS RETROCRUZAMENTOS

O método dos retrocruzamentos constitui-se em uma maneira precisa de melhorar cultivares que são muito bons, com relação a um grande número de atributos, porém são deficientes em algumas características (VENCOVSKY & BARRIGA, 1992).

O método dos retrocruzamentos é um método convencional, o qual permite transferir um alelo ou alguns poucos alelos de um parental denominado não recorrente ou doador (PD) a outro chamado recorrente (PR). O parental recorrente, geralmente, é um cultivar de interesse comercial, mas apresenta a falta de um alelo desejável. Esse alelo desejável é transferido por meio de cruzamentos do parental doador com o parental recorrente (MONTALVÁN & DESTRO, 1997).

Os retrocruzamentos com os respectivos parentais recorrentes de *L. esculentum* (Petomech, Santa Rita e VFN-8), visando a transferência da característica regeneração de plantas, foi realizado de acordo com a adaptação do esquema proposto por ALLARD, 1971 (FIGURA 2).



* Plantas descartadas após a análise da capacidade de regeneração de plantas “in vitro”.

Figura 2 . Transferência de dois alelos dominantes pelo método do retrocruzamento
(adaptado de ALLARD, 1971).

3.4. SELEÇÃO DAS PLANTAS COM ALTA CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS

Após cada geração de retrocruzamento com os cultivares comerciais de *L. esculentum*, foram colocadas para germinar 100 sementes de cada progênie em placas de petri em condições assépticas. As plântulas obtidas forneceram os explantes de hipocótilo que foram utilizados para a indução de calos e regeneração de plantas.

Os ápices de cada plântula foram excisados dos hipocótilos, sendo que cada ápice proveniente de cada hipocótilo recebeu uma numeração correspondente. Os segmentos de hipocótilo de cada plântula foram colocados para indução de calos e analisados quanto a capacidade de regeneração de plantas, enquanto isto, os respectivos ápices foram propagados e enraizados “in vitro”.

As plântulas provenientes dos ápices dos hipocótilos que apresentaram uma alta capacidade de regeneração de plantas foram transferidas para substrato organo-mineral, aclimatizadas e cultivadas na casa de vegetação para avaliação do peso médio dos frutos. As plantas que produziram frutos com maior peso médio foram propagadas por estaquia para fornecerem o pólen para o retrocruzamento subsequente.

3.5. ESTERILIZAÇÃO DAS SEMENTES PARA OBTENÇÃO DOS

EXPLANTES

Os explantes utilizados nos experimentos foram segmentos de hipocótilos com 5 mm de comprimento, de sementes germinadas “in vitro”. Na literatura existem vários trabalhos mostrando que esse tecido é favorável para a indução de calos e regeneração de plantas do tomateiro (GUNAY & RAO, 1980; ZELCER et al., 1984; TORRES & ROMANO, 1987; BULK et al., 1990; GREER & TABEIZADEH, 1991).

A assepsia das sementes para obtenção dos explantes de hipocótilos foi feita através da esterilização superficial com solução aquosa de hipoclorito de sódio comercial com 2,5% de cloro ativo a 33% v/v, sob agitação, por um período de 20 minutos. Em seguida as sementes foram lavadas por 3 vezes em água autoclavada, na câmara de fluxo laminar. Posteriormente, as sementes foram colocadas em placas de petri contendo o meio de cultura para germinação e levadas para câmara de cultura na presença de luz, aproximadamente $50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas luz e temperatura de 26 °C. Estas condições de luminosidade e temperatura foram mantidas para todos os experimentos.

3.6. MEIOS DE CULTURA

3.6.1. MEIO PARA GERMINAÇÃO DE SEMENTES

O meio de cultura utilizado para a germinação de sementes foi o meio de MURASHIGE & SKOOG (1962), com a metade da concentração dos macronutrientes e sem a adição de sacarose. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da

adição do agar (7g/l) com gotas de KOH (0.5 M) ou HCl (1N). O meio de cultura foi autoclavado a 120 °C , 1 atm por 20 minutos em frascos erlemeyer de 500 ml e em seguida 20 ml de meio foram distribuídos por placa de petri na câmara de fluxo laminar. O ajuste do pH e a distribuição do meio de cultura em placas de petri foram mantidos em todos os experimentos.

3.6.2. MEIO PARA INDUÇÃO DE CALOS

O meio de cultura utilizado para a indução de calos foi o meio de MURASHIGE & SKOOG (1962), com a metade da concentração dos macronutrientes , acrescido de 10mg/l de tiamina e 0,5 g/l de caseína hidrolizada. A combinação de fitorreguladores utilizadas no meio para a indução de calos foi de 1 mg/l de ácido 3-indolilacético (AIA) e 2,25 mg/l de 6-benzilaminopurina (6-BA), de acordo com os estudos realizados por ILLG & SIQUEIRA (1984). Os explantes de hipocótilo foram mantidos nesse meio de cultura por um período de 15 dias.

3.6.3. MEIO PARA REGENERAÇÃO DE PLANTAS

Os constituintes do meio utilizado foi o mesmo que o descrito para a fase de indução de calos. Porém, a combinação de fitorreguladores utilizadas foi ácido 3-indolilacético (AIA) 0,5 mg/l e 6-benzilaminopurina (6-BA) 5,0 mg/l . Os calos foram mantidos no meio de regeneração de plantas por 60 dias, sendo feita a renovação do meio de cultura após 30 dias de cultura.

3.6.4. MEIO PARA PROPAGAÇÃO E ENRAIZAMENTO DOS ÁPICES

O meio de cultura utilizado para a propagação e enraizamento dos ápices do tomateiro foi o meio de MURASHIGE & SKOOG (1962), sem a presença de fitorreguladores. As plantas foram propagadas através de cortes das gemas axilares e subcultivadas a cada 30 dias.

3.6.5. PROCEDIMENTO PARA INDUÇÃO DE CALOS

Após a germinação das sementes os hipocótilos das plântulas foram seccionados com o auxílio de uma tesoura em segmentos de aproximadamente 5mm, dispostos em 8 fileiras, perfazendo um total de 80 explantes por placa de petri. Em seguida as placas de petri foram vedadas com filme de PVC e transferidas para a câmara de cultura na presença de luz. Os explantes foram mantidos por 15 dias no meio de indução de calos.

3.6.6. PROCEDIMENTO PARA REGENERAÇÃO DE PLANTAS

Os calos formados na fase anterior foram transferidos para placas de petri contendo o meio de regeneração de plantas por um período de 60 dias. A renovação do meio de cultura foi feita após 30 dias de cultura.

Os calos foram avaliados após 60 dias quanto a capacidade de regenerar plantas.

3.7. AVALIAÇÃO DO PESO MÉDIO DOS FRUTOS NOS SUCESSIVOS

RETROCRUZAMENTOS

As plantas que apresentaram capacidade para regeneração, selecionadas por meio dos sucessivos retrocruzamentos, foram cultivadas na casa de vegetação para a avaliação do peso médio dos frutos. Os frutos do terceiro cacho foram colhidos e pesados. PÁRRAGA (1963) observou que essa característica é a melhor indicadora do peso médio dos frutos e da produtividade do tomateiro.

O espaçamento e os tratos culturais foram realizados de acordo com as recomendações técnicas para o cultivo do tomateiro (FILGUEIRA, 1982).

Os frutos do terceiro cacho, provenientes de cada planta, foram pesados individualmente e utilizou-se os testes “F” e “Tukey” para detectar as diferenças estatísticas.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.CRUZAMENTOS ARTIFICIAIS

No presente trabalho, foi observado que não houve problemas no pegamento das polinizações realizadas entre a espécie selvagem *L. pimpinellifolium* com os cultivares comerciais de *L. esculentum*. Os frutos híbridos apresentaram um crescimento normal e as sementes foram produzidas em grande quantidade por não haver problemas de incompatibilidade no desenvolvimento dos tubos polínicos durante a fecundação e, possivelmente, o pareamento normal dos cromossomos na meiose.

KOORNNEEF et al., 1986 realizaram hibridizações entre a espécie *L. peruvianum*, com alta capacidade de regeneração de plantas, e cultivares do tomateiro (*L. esculentum* Mill.) recalcitrantes para esta característica. O híbrido obtido foi denominado de MsK93 e apresentou alta capacidade de regeneração de plantas. Porém, nos retrocruzamentos com *L. esculentum* houve uma alta frequência de aborto de embriões devido a uma incompatibilidade existente nos cruzamentos entre essas espécies.

Nos resultados das análises de RFLP, descritas por MILLER e TANKSLEY (1990), foi constatado que a espécie *L. pimpinellifolium* é uma das espécies silvestres mais próxima do tomateiro cultivado, sugerindo, portanto, que a variação genética encontrada nesta espécie é facilmente utilizável para o melhoramento do tomateiro.

4.2. ESTERILIZAÇÃO DAS SEMENTES PARA OBTENÇÃO DOS EXPLANTES

A esterilização superficial das sementes com solução aquosa de hipoclorito de sódio comercial, com 2,5 % de cloro ativo, a 33 % v/v, durante 20 minutos, foi altamente eficiente na desinfecção das sementes. A frequência de contaminações fúngicas e bacterianas foram inferiores a 5 % para todos os genótipos analisados.

4.3. MEIO PARA GERMINAÇÃO DE SEMENTES

As sementes germinaram de forma homogênea após 4-5 dias de cultivo no meio de MURASHIGE & SKOOG (1962), com a metade da concentração dos macronutrientes e sem adição de sacarose. Foi observado que a germinação na presença de luz, propiciou o crescimento de hipocótilos mais vigorosos do que as sementes germinadas no escuro. Em função disso, em todos os experimentos, optou-se pela utilização de explantes das sementes germinadas na presença de luz.

4.4. MEIO PARA INDUÇÃO DE CALOS

O meio de cultura MS, suplementado com AIA (1,0mg/l) e 6-BA (2,25mg/l), mostrou-se adequado para a indução de calos a partir de explantes de hipocótilo do tomateiro. Após 10 dias de cultura foi observada uma grande proliferação celular nas extremidades dos explantes e aos 15 dias de cultura os calos estavam formados.

A indução de calos na presença da luz propiciou a formação de calos verdes e com textura compacta para todos os genótipos analisados.

4.5. MEIO PARA REGENERAÇÃO DE PLANTAS

A concentração de fitorreguladores utilizada AIA (0,5mg/l) e 6-BA (5mg/l), no meio basal de MURASHIGE & SKOOG (1962), induziu uma alta frequência de regeneração de plantas para determinados genótipos, permitindo assim a seleção das plantas que possuíam os alelos da regeneração. A regeneração dos calos nessas condições de cultivo ocorreu sempre por organogênese. No entanto, há autores que observaram a regeneração por embriogênese somática no tomateiro (ZAPATA & SINK, 1981; GILL et al., 1995; NEWMAN et al., 1996).

Embora evidências conclusivas estejam faltando, a embriogênese somática é usualmente postulada como iniciação de uma única célula, enquanto, a organogênese de acordo com os estudos histológicos de calos do tomateiro descritos por MONACELLI et al. (1988), deve envolver um grupo de células iniciais.

CRINO et al., 1994 observaram o aparecimento de quimeras nas plantas de tomateiro regeneradas a partir de cotilédones irradiados, sugerindo, portanto, o envolvimento de mais de uma célula no processo de regeneração.

A regeneração de plantas a partir de calos do tomateiro em alta frequência é o resultado da interação de vários fatores como: genótipo, tipo de explante, composição do meio de cultura e condições ambientais (BELLINI et al., 1990; ZORZOLI et al., 1994; MARCENARO et al., 1994; PRATTA et al., 1997).

Diferenças genotípicas para habilidade de formação de calos e regeneração de plantas tem sido descritas, com freqüência, para o tomateiro (ILLG & SIQUEIRA, 1984; ZELCER et al., 1984; TORRES & ROMANO, 1987).

De acordo com os resultados descritos por KOORNNEEF et al. (1987), foi concluído que as condições de cultura para expressão da regeneração de genótipos cultivados do tomateiro comercial (*L. esculentum* Mill.) são muito específicas, enquanto as exigências das células da espécie silvestre (*L. peruvianum*) são menores.

O tipo e o estágio de desenvolvimento do tecido utilizado como fonte de explante alteram também a expressão da morfogênese de um determinado genótipo. Os explantes usualmente usados nos experimentos de cultura de tecidos do tomateiro, com resultados favoráveis para regeneração de plantas são os discos foliares (PADMANABHAN, 1974; KARTHA et al, 1976; PENCE & CARUSO, 1984; MATOS & CORDEIRO, 1988) e hipocótilos de plantas germinadas “in vitro”(ZELCER et al., 1984; BULK et al., 1990).

O meio básico freqüentemente usado para indução de calos e regeneração de plantas do tomateiro é o MS - MURASHIGE & SKOOG (1962). Alternativamente, muitos estudos tem sido reportados com o intuito de identificar o tipo de explante e a concentração ideal de fitorreguladores para indução de calos e regeneração de plantas (BEHKI & LESLEY, 1976; OHKI et al., 1978; FRANKERBERGER et al., 1981; GARCIA-REINA & LUQUE, 1988; CHI & PUA, 1989; BRANCA et al., 1990).

O balanço auxina e citocinina exercem um papel fundamental na diferenciação de plantas (LAZZERI et al., 1987). No entanto, outros elementos básicos do meio de cultura como nitrato de amônio (BEHKI & LESLEY, 1980), boro (SERESINHE &

OERTLI, 1991) e sacarose (DERKS et al., 1990) são necessários em determinadas concentrações para a indução de alta frequência de calos morfogênicos do tomateiro.

É muito freqüente, após alguns meses de cultura, os calos do tomateiro apresentarem-se com coloração escura. De acordo com CAPPADOCIA & RAMULU (1980), a senescência dos calos de tomateiro pode ser revertida com a suplementação de água de côco (20%v/v), 6-BA (0,05 mg/l) no meio de cultura MS, e na ausência de auxina. Esse ajustamento da composição do meio de cultura propiciou a capacidade de regeneração de plantas de calos de longa duração.

4.6. MEIO PARA PROPAGAÇÃO E ENRAIZAMENTO DOS ÁPICES

A micropropagação do tomateiro por meio da seção de brotos apicais e axilares resultantes do crescimento de ápices do tomateiro cultivado no meio MS, sem a presença de fitorreguladores, propiciou uma taxa de multiplicação de 1 para 5, num ciclo regular de 4 semanas (FIGURA 3). Esse procedimento permitiu a propagação clonal rápida de genótipos selecionados do tomateiro, em função de não ter ocorrido a formação de calos que podem originar plantas regeneradas mutantes, devido a variação somaclonal.

Variação somaclonal é um termo introduzido por LARKIN & SCOWCROFT (1981) para designar todos os tipos de variação que ocorrem em plantas regeneradas de cultura de tecidos e de células.

No entanto, a propagação 'in vitro', via calos organogênicos ou embriogênicos é inevitável, no caso de certas espécies economicamente importantes, principalmente alguns cereais, leguminosas, forrageiras, espécies florestais e palmeiras tropicais. Além disso,

qualquer regeneração de plantas, a partir de protoplastos, requer a passagem por pelo menos uma fase de calo . Esta operação é certamente um componente essencial dos procedimentos utilizados para a produção de regenerantes geneticamente engenheirados, a partir de protoplastos transformados (CHEN & ADACHI, 1994).

Na literatura tem sido relatado que, para algumas culturas, os calos podem regenerar plantas genotipicamente uniformes durante anos . Estes calos estáveis foram descritos para gêneros como *Lilium* (SHERIDAN, 1968), *Freesia* (DAVIES, 1972), *Chrysanthemum* (EARLE & LANGHANS, 1974) e *Hemerocallis* (KRIKORIAN et al., 1981). O enraizamento das plantas micropropagadas ocorreu de forma eficiente no meio MS sem a adição de fitorreguladores.



Figura 3 Micropropagação “in vitro” do tomateiro por meio de seções de brotos apicais e axilares no meio de cultura MS, sem a adição de fitorreguladores. Taxa de multiplicação de plantas de 1 para 5, num período de 4 semanas.

4.7. SELEÇÃO DAS PLANTAS COM ALTA CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS

O procedimento de se adotar um número correspondente a cada ápice proveniente de cada hipocótilo, das sementes germinadas “in vitro”, foi uma metodologia eficiente para a seleção das plantas que possuíam os genes da regeneração, nos sucessivos retrocruzamentos com os parentais recorrentes de *L. esculentum* Mill.

(FIGURA 4).

A utilização de segmentos de hipocótilo como explante para indução de calos do tomateiro tem a vantagem de produzir calos de tamanho uniforme. Além disso, há trabalhos na literatura mostrando que plantas regeneradas desse tipo de explante apresentam, geralmente, o número cromossômico normal ($2n=24$). Ou seja, há uma baixa ocorrência de mutação (ASAKURA et al., 1995).



Figura 4. Cada fileira de calos foi obtida de segmentos de um único hipocótilo de sementes germinadas “in vitro”. Cada fileira de calos e o respectivo ápice excisado do hipocótilo receberam uma numeração correspondente, permitindo, desse modo, a seleção das plantas com alta capacidade de regeneração, nos sucessivos retrocruzamentos com os parentais recorrentes de *L. esculentum* Mill.

4.8. AVALIAÇÃO DO PESO MÉDIO DOS FRUTOS RESULTANTES DO PRIMEIRO RETROCRUZAMENTO COM OS PARENTAIS RECORRENTES DE *L. esculentum* Mill.

As plantas selecionadas para a característica regeneração de plantas do primeiro retrocruzamento apresentaram diferenças significativas com relação ao peso médio dos frutos (TABELAS 2, 3 e 4).

Algumas plantas apresentaram a morfologia das folhas e a arquitetura da planta mais similares aos genótipos dos parentais recorrentes de *L. esculentum* Mill. (Petomech, Santa Rita e VFN-8) do que com a espécie selvagem *L. pimpinellifolium* (FIGURA 5).

As plantas resultantes do primeiro retrocruzamento selecionadas para a característica regeneração de plantas e que produziram frutos de maior peso médio, denominadas : P-08 (28,736g) e P- 63 (28,678g), S-16 (31,407g) e S-15 (30,410g), V-92 (39,128g) e V-14 (36,856g) foram utilizadas como doadoras de pólen no segundo retrocruzamento com os respectivos parentais recorrentes de *L. esculentum* Mill. (TABELAS 2,3 e 4).

Tabela 2. Avaliação do peso médio dos frutos do terceiro cacho das plantas resultantes do primeiro retrocruzamento com o parental recorrente Petomech (*L. esculentum* Mill.).

RC ₁ Petomech GENÓTIPOS	PESO MÉDIO DOS FRUTOS (gramas)
P-08	28,736 a
P-63	28,678 a
P-09	25,404 b
P-28	20,264 c
P-52	20,010 c
P-16	17,386 d
P-05	16,906 de
P-37	16,598 def
P-58	14,616 ef
P-44	14,280 f
P-45	10,260 g
Média = 19,376	Petomech = 55,51g
D.M.S. 5% = 2.45	
C.V. = 5.90 %	

Médias seguidas por letras distintas diferem entre-si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 3. Avaliação do peso médio dos frutos do terceiro cacho das plantas resultantes do primeiro retrocruzamento com o parental recorrente Santa Rita (*L. esculentum* Mill.).

RC ₁ Santa Rita GENÓTIPOS	PESO MÉDIO DOS FRUTOS (gramas)
S-16	31,407 a
S-15	30,410 ab
S-09	29,084 b
S-48	25,362 c
S-56	21,404 d
S-07	19,127 e
S-72	16,212 f
S-11	16,034 f
S-23	15,115 fg
S-37	13,994 g
Média = 21,815	Santa Rita = 62,53g
D.M.S. 5% = 1,94	
C.V. = 4,20 %	

Médias seguidas por letras distintas diferem entre-si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 4. Avaliação do peso médio dos frutos do terceiro cacho das plantas resultantes do primeiro retrocruzamento com o parental recorrente VFN-8 (*L. esculentum* Mill.).

RC ₁ VFN-8 GENÓTIPOS	PESO MÉDIO DOS FRUTOS (gramas)
V-92	39,128 a
V-14	36,856 b
V-31	36,722 b
V-62	30,891 c
V-53	29,940 c
V-45	29,832 c
V-81	27,310 d
V-11	27,200 d
V-27	26,391 d
V-67	22,534 e
V-16	20,706 ef
V-06	20,373 ef
V-19	20,258 f
V-61	18,622 f

Média = 27,626

VFN-8 = 110,66g

D.M.S. 5% = 2,22

C.V. = 3,63 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre-si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.



Figura 5. Plantas resultantes do primeiro retrocruzamento mostrando características fenotípicas como arquitetura da planta e morfologia das folhas mais similares aos genótipos dos parentais recorrentes de *L. esculentum* do que com a espécie silvestre *L. pimpinellifolium*.

A direita: RC₁ com VFN-8.

A esquerda: RC₁ com Santa Rita.

4.9. AVALIAÇÃO DO PESO MÉDIO DOS FRUTOS RESULTANTES DO SEGUNDO RETROCRUZAMENTO COM OS PARENTAIS RECORRENTES DE *L. esculentum* Mill.

As plantas do segundo retrocruzamento selecionadas para a característica regeneração de plantas apresentaram diferenças significativas com relação ao peso médio dos frutos (TABELAS 5, 6 e 7).

As plantas resultantes do segundo retrocruzamento selecionadas para a característica regeneração de plantas e que produziram frutos de maior peso médio, denominadas: P-63-32 (46,569g) e P- 63-61 (43,957g), S-16-29 (55,687g) e S-15-33 (47,037g), V-92-66 (79,337g) e V-92-56 (70,017g) foram utilizadas como doadoras de pólen no terceiro retrocruzamento com os respectivos parentais recorrentes de *L. esculentum* Mill. (TABELAS 5, 6 e 7).

Os frutos obtidos do segundo retrocruzamento com os parentais recorrentes de *L. esculentum* Mill., selecionados para a característica regeneração de plantas apresentaram a coloração e a morfologia muito semelhante ao tomateiro cultivado (FIGURA 6).

Tabela 5. Avaliação do peso médio dos frutos do terceiro cacho das plantas resultantes do segundo retrocruzamento com o parental recorrente Petomech (*L. esculentum* Mill.).

RC ₂ Petomech GENÓTIPOS	PESO MÉDIO DOS FRUTOS (gramas)
P-63-32	46,569 a
P-63-61	43,957 a
P-63-09	42,566 ab
P-08-54	38,973 bc
P-09-12	37,303 cd
P-09-53	37,234 cde
P-63-57	36,154 cdef
P-08-31	36,108 cdef
P-09-30	34,685 cdefg
P-63-17	33,958 defgh
P-08-88	33,367 defghi
P-09-39	33,320 efghi
P-08-13	32,814 efghi
P-09-37	32,367 fghij
P-63-66	31,947 fghijk
P-08-76	31,889 fghijk
P-08-21	31,706 fghijk
P-09-15	30,978 ghijkl
P-08-63	30,400 ghijklm
P-63-52	30,145 hijklm
P-63-43	29,176 ijklmn
P-08-07	28,006 jklmno
P-08-46	27,712 klmno
P-08-16	27,072 lmno
P-08-23	25,985 mnop
P-09-25	25,323 nop
P-09-42	24,048 op
P-08-55	22,350 p
P-08-39	21,830 p

Média = 32,237

Petomech = 55,51g

D.M.S. 5% = 4,48

C.V. = 5,75 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre-si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 6. Avaliação do peso médio dos frutos do terceiro cacho das plantas resultantes do segundo retrocruzamento com o parental recorrente Santa Rita (*L. esculentum* Mill.).

RC ₂ Santa Rita GENÓTIPOS	PESO MÉDIO DOS FRUTOS (gramas)
S-16-29	55,687 a
S-15-33	47,037 b
S-16-52	46,027 b
S-16-23	44,774 bc
S-09-38	44,154 bcd
S-15-17	42,872 bcde
S-15-53	42,279 bcdef
S-09-34	40,937 cdef
S-09-27	39,647 defg
S-16-48	38,264 efgh
S-15-51	37,704 fghi
S-15-06	34,757 ghij
S-16-05	33,650 hij
S-15-37	33,230 ij
S-15-63	32,142 j
S-15-24	31,242 j
S-09-11	30,777 j
S-16-34	30,522 j
S-15-60	30,235 jk
S-09-52	25,537 kl
S-09-15	25,287 kl
S-09-45	22,995 l
S-16-12	21,967 l

Média = 36,162

Santa Rita = 62,53g

D.M.S. 5% = 4,96

C.V. = 5,15 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre-si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 7. Avaliação do peso médio dos frutos do terceiro cacho das plantas resultantes do segundo retrocruzamento com o parental recorrente VFN-8 (*L. esculentum* Mill.).

RC ₂ VFN-8 GENÓTIPOS	PESO MÉDIO DOS FRUTOS (gramas)
V-92-66	79,337 a
V-92-56	70,017 b
V-92-28	66,750 bc
V-92-34	63,177 c
V-92-69	62,810 cd
V-31-69	61,947 cd
V-92-73	61,165 cd
V-14-74	57,282 de
V-14-44	55,202 e
V-14-61	52,239 ef
V-92-03	49,344 fg
V-31-67	47,394 fgh
V-31-55	45,782 ghi
V-14-23	43,747 ghij
V-14-57	42,502 hij
V-92-58	41,570 ijk
V-31-19	41,512 ijk
V-31-78	41,345 ijk
V-14-21	41,297 ijk
V-31-41	40,490 ijkl
V-31-32	39,290 jkl
V-92-17	38,764 jkl
V-14-31	36,352 klm
V-14-11	35,350 lm
V-14-33	32,932 m
V-31-74	32,369 m

Média = 49,229

VFN-8 = 110,66g

D.M.S. 5% = 5,65

C.V. = 4,23 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre-si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.



Figura 6. Frutos resultantes do segundo retrocruzamentos com os três parentais recorrentes de *L. esculentum* Mill. (Petomech, Santa Rita e VFN-8) mostrando a coloração e a morfologia muito semelhante com os genótipos do tomateiro cultivado.

4.10. AVALIAÇÃO DO PESO MÉDIO DOS FRUTOS RESULTANTES DO TERCEIRO RETROCRUZAMENTO COM OS PARENTAIS RECORRENTES DE *L. esculentum* Mill.

As plantas do terceiro retrocruzamento selecionadas para a característica regeneração de plantas apresentaram diferenças significativas com relação ao peso médio dos frutos (TABELAS 8, 9 e 10).

As plantas resultantes do terceiro retrocruzamento selecionadas para a característica regeneração de plantas e que produziram frutos de maior peso médio, denominadas : P-63-61-03 (51,027g) e P- 63-32-59 (50,570g), S-15-33-39 (62,023g) e S-16-29-17 (61,688g), V-92-66-31 (96,832g) e V-92-66-52 (94,409g) foram utilizadas como doadoras de pólen no quarto retrocruzamento com os respectivos parentais recorrentes de *L. esculentum* Mill. (TABELAS 8, 9 e 10).

Tabela 8. Avaliação do peso médio dos frutos do terceiro cacho das plantas resultantes do terceiro retrocruzamento com o parental recorrente Petomech (*L. esculentum* Mill.).

RC ₃ Petomech GENÓTIPOS	PESO MÉDIO DOS FRUTOS (gramas)
P-63-61-03	51,027 a
P-63-32-59	50,570 a
P-63-09-29	50,545 a
P-63-09-42	49,925 a
P-63-61-35	49,587 ab
P-63-32-42	49,420 ab
P-63-61-47	48,653 abc
P-63-32-06	48,320 abcd
P-63-61-19	48,312 abcd
P-63-61-30	48,118 abcde
P-63-61-54	47,719 abcde
P-08-54-10	46,344 bcdef
P-63-61-39	45,585 cdefg
P-63-61-25	45,454 defgh
P-63-32-34	45,435 defgh
P-63-32-64	45,017 efghi
P-63-32-09	43,692 fghij
P-63-61-43	43,472 fghijk
P-63-09-41	43,291 fghijk
P-63-09-23	42,947 ghijk
P-63-32-27	42,937 ghijk
P-63-61-03	42,330 hijkl
P-08-54-25	42,002 ijklm
P-08-54-23	41,865 ijklm
P-63-09-35	41,484 jklm
P-08-54-17	41,382 jklm
P-63-09-14	41,276 jklm
P-63-09-48	40,307 klmn

Média = 43,876

Petomech = 55,51 g

D.M.S. 5% = 5,26

C.V. = 4,96 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre-si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 9. Avaliação do peso médio dos frutos do terceiro cacho das plantas resultantes do terceiro retrocruzamento com o parental recorrente Santa Rita (*L. esculentum* Mill.).

RC ₃ Santa Rita GENÓTIPOS	PESO MÉDIO DOS FRUTOS (gramas)
S-15-33-39	61,731 a
S-16-29-17	61,688 a
S-15-33-31	61,350 a
S-16-29-21	61,147 a
S-09-38-36	60,844 a
S-16-29-35	60,581 a
S-09-38-33	60,539 a
S-16-29-42	60,482 a
S-15-33-59	59,666 ab
S-09-38-16	57,840 bc
S-15-33-26	56,926 cd
S-16-29-39	56,606 cd
S-16-29-47	55,057 de
S-16-29-13	55,007 de
S-16-29-17	53,641 ef
S-09-38-11	52,147 fg
S-15-33-38	51,794 fg
S-09-38-27	51,642 fgh
S-15-33-56	51,278 gh
S-09-38-41	51,116 gh
S-15-33-42	51,020 gh
S-15-33-19	50,929 gh
S-15-33-45	50,048 gh
S-15-33-61	49,189 h

Média = 56,035

Santa Rita = 62,53g

D.M.S. 5% = 3,93

C.V. = 2,07 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre-si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 10. Avaliação do peso médio dos frutos do terceiro cacho das plantas

resultantes do terceiro retrocruzamento com o parental recorrente

VFN-8 (*L. esculentum* Mill.).

RC ₃ VFN-8 GENÓTIPOS	PESO MÉDIO DOS FRUTOS (gramas)
V-92-66-31	96,832 a
V-92-66-52	94,409 ab
V-92-28-32	93,062 bc
V-92-28-09	92,559 bcd
V-92-66-41	92,400 bcd
V-92-56-22	91,706 bcd
V-92-66-30	91,535 cd
V-92-28-37	90,909 cd
V-92-66-39	90,247 cd
V-92-56-21	89,992 d
V-92-66-16	84,633 e
V-92-66-47	83,598 e
V-92-66-12	83,452 ef
V-92-88-27	83,216 ef
V-92-28-05	82,526 ef
V-92-56-16	82,412 ef
V-92-66-24	81,906 ef
V-92-56-29	80,579 f
V-92-66-38	77,270 g
V-92-28-16	73,425 h
V-92-28-39	70,426 i

Média = 86,009

VFN-8 = 110,66g

D.M.S. 5% = 4,57

C.V. = 2,27 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre-si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

4.11. AVALIAÇÃO DO PESO MÉDIO DOS FRUTOS RESULTANTES DO QUARTO RETROCRUZAMENTO COM OS PARENTAIS RECORRENTES DE *L. esculentum* Mill.

As plantas do quarto retrocruzamento selecionadas para a característica regeneração de plantas apresentaram diferenças significativas com relação ao peso médio dos frutos (TABELAS 11, 12 e 13).

As plantas resultantes do quarto retrocruzamento selecionadas para a característica regeneração de plantas e que produziram frutos de maior peso médio foram denominadas : P-63-61-03-27 (53,741g) e P- 63-32-59-41 (53,464g), S-15-33-39-46 (61,615g) e S-16-29-17-09 (61,526g), V-92-66-52-45 (108,721g) e V-92-66-52-33 (107,069g).

Os resultados mostram que o peso médio dos frutos do quarto retrocruzamento (TABELAS 11, 12 e 13) estão muito próximos do peso médio dos frutos dos genótipos parentais recorrentes Petomech (55,51g), Santa Rita (62,53g) e VFN-8 (110,66g). Essas plantas apresentam os genes relacionados com a regeneração de plantas provenientes do tomateiro selvagem *L. pimpinellifolium* (FIGURA 7).

GRANDILLO & TANKSLEY, 1996 usaram marcadores moleculares para mapear e caracterizar locos de características quantitativas (QTLs) para várias características agronômicas do cruzamento interespecífico entre *L. pimpinellifolium* e *L. esculentum* Mill. . Os resultados mostraram que a espécie *L. pimpinellifolium* é muito próxima do tomateiro cultivado (*L. esculentum*) e que a diferença no peso dos frutos está sob o controle de um único QTL principal, o que explica de certa maneira a rapidez com que se recupera a característica produtividade.

Tabela 11. Avaliação do peso médio dos frutos do terceiro cacho das plantas

resultantes do quarto retrocruzamento com o parental recorrente

Petomech (*L. esculentum* Mill.).

RC 4 Petomech GENÓTIPOS	PESO MÉDIO DOS FRUTOS (gramas)
P-63-61-03-27	53,741 a
P-63-32-59-41	53,464 ab
P-63-61-03-33	53,117 abc
P-63-61-03-47	52,792 abcd
P-63-09-29-29	52,509 abcd
P-63-09-03-12	52,488 abcd
P-63-09-29-56	52,442 abcd
P-63-32-59-32	52,088 abcd
P-63-61-03-61	51,913 abcd
P-63-09-29-18	51,788 bcd
P-63-09-59-18	51,765 bcd
P-63-61-03-12	51,744 bcd
P-63-32-59-23	51,416 cd
P-63-61-03-44	51,397 cd
P-63-61-03-26	51,354 cd
P-63-61-03-19	51,350 cd
P-63-32-59-16	51,314 cd
P-63-09-29-41	51,144 d
P-63-09-29-38	51,003 d
P-63-61-03-40	50,988 d

Média = 51,991

Petomech = 55,51g

D.M.S. 5% = 1,86

C.V. = 1,54 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre-si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 12. Avaliação do peso médio dos frutos do terceiro cacho das plantas

resultantes do quarto retrocruzamento com o parental recorrente

Santa Rita (*L. esculentum* Mill.).

RC 4 Santa Rita GENÓTIPOS	PESO MÉDIO DOS FRUTOS (gramas)
S-15-33-39-46	62,315 a
S-16-29-17-09	61,526 a
S-16-29-17-16	61,467 a
S-15-33-39-21	61,399 a
S-15-33-39-33	61,233 a
S-16-29-17-27	61,176 a
S-15-33-31-34	61,176 a
S-16-29-17-18	61,168 a
S-16-29-17-25	61,156 a
S-15-33-39-12	61,112 a
S-15-33-39-41	60,921 a
S-15-33-39-18	60,820 a
S-15-33-31-10	60,671 a
S-15-33-31-16	60,594 a
S-15-33-31-39	60,515 a
S-16-29-17-39	58,414 b
S-15-33-31-43	58,533 b

Média = 61,017

Santa Rita = 62,53g

D.M.S. 5% = 1,66

C.V. = 1,19 %

Médias seguidas por letras distintas diferem entre-si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade

Tabela 13. Avaliação do peso médio dos frutos do terceiro cacho das plantas
resultantes do quarto retrocruzamento com o parental recorrente
VFN-8 (*L. esculentum* Mill.).

RC ₄ VFN-8 GENÓTIPOS	PESO MÉDIO DOS FRUTOS (gramas)
V-92-66-52-45	108,721 a
V-92-66-52-33	107,069 ab
V-92-66-52-17	106,998 ab
V-92-66-31-55	105,409 bc
V-92-66-31-48	104,307 c
V-92-66-52-53	101,785 d
V-92-66-31-42	101,315 d
V-92-66-31-61	101,273 d
V-92-66-52-08	100,901 d
V-92-66-52-25	100,615 d
V-92-66-31-20	100,596 d
V-92-66-52-42	100,480 d
V-92-66-31-34	100,445 d
V-92-66-31-22	100,300 d
V-92-66-52-51	100,238 d
V-92-66-31-12	99,984 d
Média = 102, 528	VFN-8 = 110,66g
D.M.S. 5% = 2,31	
C.V. = 1,99 %	

Médias seguidas por letras distintas diferem entre-si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

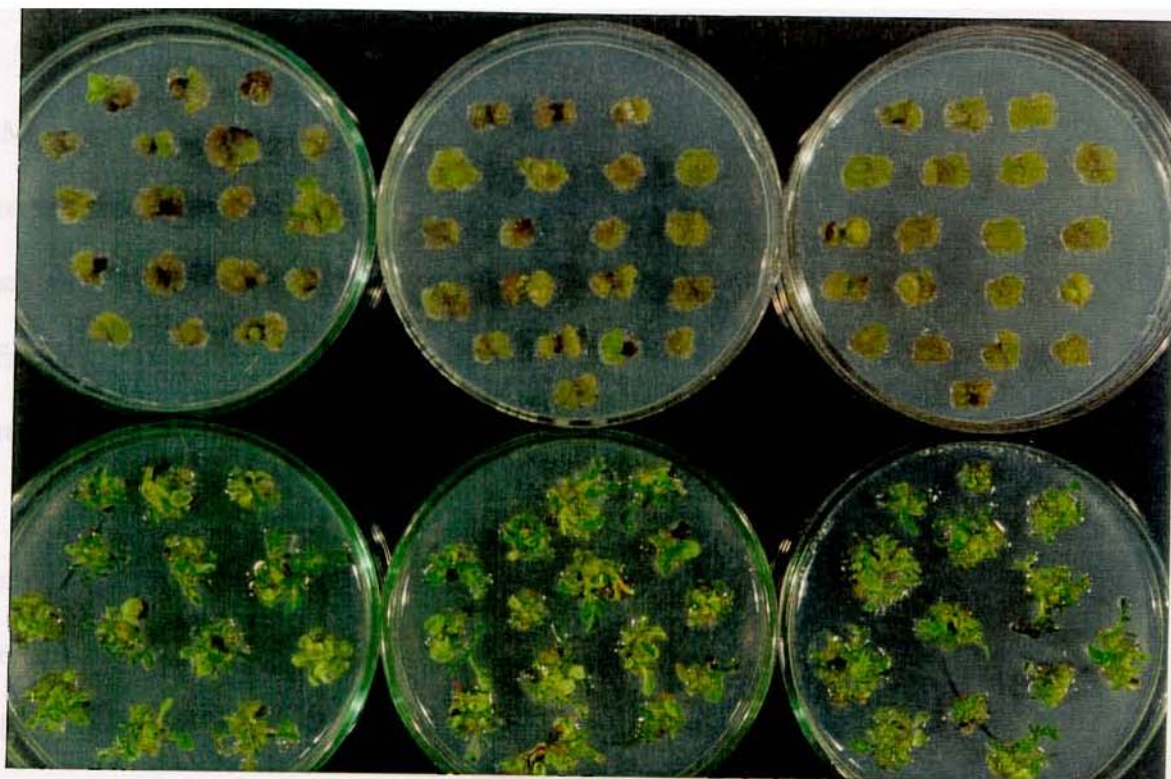


Figura 7. Acima: Baixa frequência de calos organogenéticos do tomateiro cultivado Petomech (*L. esculentum* Mill.). Abaixo: alta frequência de calos organogenéticos resultantes do quarto retrocruzamento com o parental recorrente de Petomech (*L. esculentum* Mill.) selecionados para a característica “regeneração de plantas”.

Meio de regeneração: MS + 6-BA (5,0 mg/l) + AIA (0,5mg/l).

O método dos retrocruzamentos tem sido utilizado quase que exclusivamente para transferir genes de parentais doadores para recorrentes. Entretanto, a sua utilização para a introgressão de germoplasma exótico no germoplasma elite também tem sido comprovada por diversos autores (LAWRENCE & FREY, 1975; EATON et al. 1986, CARPENTER & FEHR, 1986; SINGH et al., 1993; ESHED & ZAMIR, 1994).

CARPENTER e FEHR (1986) cruzaram dois cultivares de soja (*Glicine max* L. Merrill) com dois acessos silvestres e retrocruzaram os híbridos F₁ com os respectivos parentais recorrentes da espécie *G. max* L. Merrill. Foram obtidas populações com até cinco retrocruzamentos. Esses autores concluíram que dois ou três retrocruzamentos são suficientes para elevar a produtividade das populações sem perder demasiadamente as características dos tipos silvestres.

A característica para regeneração de plantas, a partir de calos do tomateiro, é controlada por dois genes complementares dominantes e apresenta uma alta herdabilidade (FRANKENBERGER, 1981b), facilitando desse modo a sua transferência pelo método dos retrocruzamentos. Por outro lado, quando o número de genes envolvidos no programa de retrocruzamentos é elevado, é necessária a manipulação de grandes populações. Dessa forma, esse método torna-se complexo para a transferência de características quantitativas controladas por grande número de genes.

Não é necessário que o programa de retrocruzamentos seja conduzido no ambiente a que o parental recorrente esteja adaptado. A única exigência é que a característica em transferência possa ser expressada. Uma vez que a seleção durante o programa é realizada

apenas para a característica em transferência, a incorporação das demais características do parental recorrente ocorre automaticamente durante o procedimento, permitindo que o melhorista conduza tantas gerações de retrocruzamentos por ano quanto possível.

Os indivíduos da geração RC_4 apresentam em média 96,88% do genoma do parental recorrente. O termo média de recuperação é adotado porque em cada geração de retrocruzamentos existe uma variação entre indivíduos para o número de genes do parental recorrente que eles possuem.

Os frutos do quarto retrocruzamento apresentaram um peso médio muito próximo ao dos genótipos dos parentais recorrentes do tomateiro cultivado. Observou-se que do segundo para o terceiro retrocruzamento com os cultivares de *L. esculentum* Mill. houve um rápido incremento no peso médio dos frutos (FIGURAS 8, 9 e 10).

O número de retrocruzamentos necessários depende: do grau de recuperação desejado do parental recorrente, do mérito agrícola do parental doador, da intensidade de seleção para as características do progenitor recorrente durante o programa e da existência de ligação gênica entre o gene em transferência e outros indesejáveis (BORÉM, 1997).

O uso de marcadores moleculares podem acelerar os programas de retrocruzamentos ao permitir a identificação, na fase de plântula, dos indivíduos com maior proporção do genoma do parental recorrente (OPENSHAW et al., 1994; PHILLIPS et al., 1994; GRANDILLO & TANKSLEY, 1996; TORELLI et al., 1996).

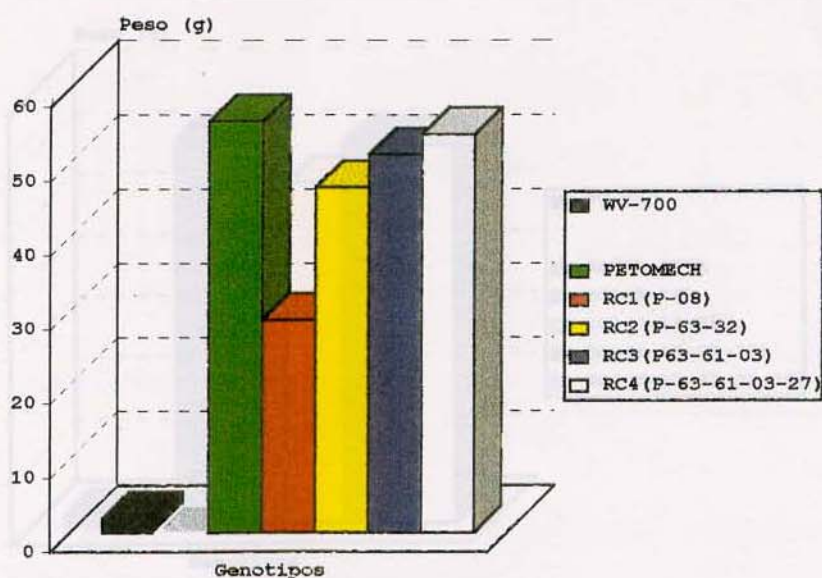


Figura 8. Incremento no peso médio dos frutos após os quatro ciclos de retrocruzamentos com o parental recorrente Petomech (*L. esculentum* Mill.) durante a seleção para a característica regeneração de plantas. O genótipo selvagem WV-700 (*L. pimpinellifolium*) apresenta frutos com peso médio de 1,87g.

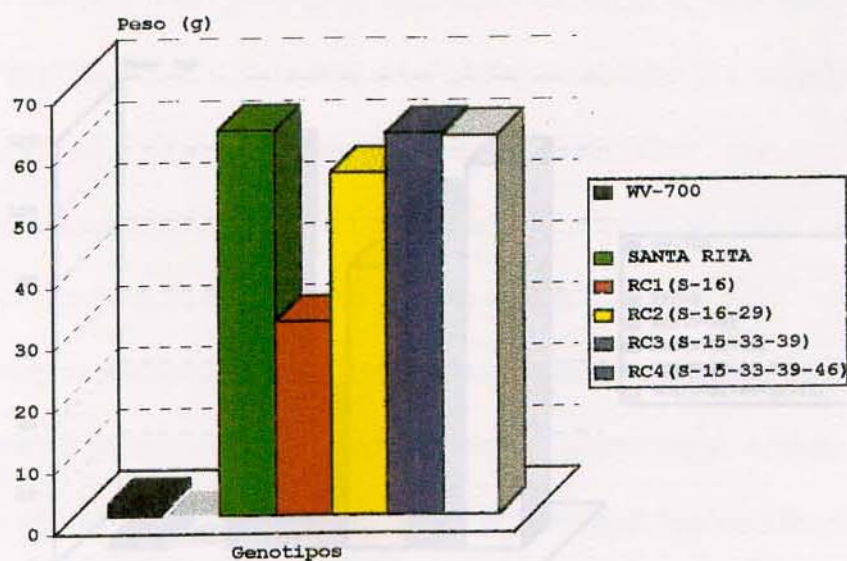


Figura 9. Incremento no peso médio dos frutos após os quatro ciclos de retrocruzamentos com o parental recorrente Santa Rita (*L. esculentum* Mill.) durante a seleção para a característica regeneração de plantas. O genótipo selvagem WV-700 (*L. pimpinellifolium*) apresenta frutos com peso médio de 1,87g.

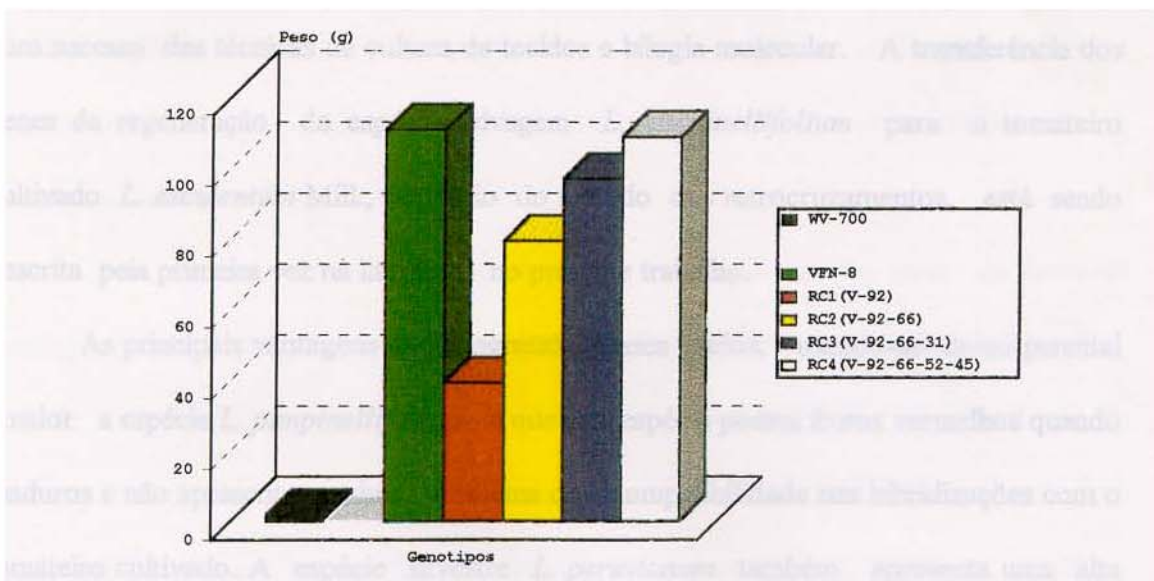


Figura 10. Incremento no peso médio dos frutos após os quatro ciclos de retrocruzamentos com o parental recorrente VFN-8 (*L. esculentum* Mill.) durante a seleção para a característica regeneração de plantas. O genótipo selvagem WV-700 (*L. pimpinellifolium*) apresenta frutos com peso médio de 1,87g.

Progênes de programas de retrocruzamentos com elevada recuperação do parental recorrente não requerem os extensivos testes comparativos de comportamento antes de serem lançadas. Nessas progênes, a quase totalidade dos seus genes é do parental recorrente, cujo comportamento é conhecido. Entretanto, recomenda-se que pelo menos uma avaliação do comportamento agrônômico dessas progênes seja realizada antes da sua distribuição aos produtores rurais (FEHR, 1987).

A incorporação dos alelos da regeneração em genótipos elite é de grande importância no melhoramento genético do tomateiro e de outras culturas para aplicação com sucesso das técnicas de cultura de tecidos e biologia molecular. A transferência dos genes da regeneração da espécie selvagem *L. pimpinellifolium* para o tomateiro cultivado *L. esculentum* Mill., por meio do método dos retrocruzamentos, está sendo descrita pela primeira vez na literatura no presente trabalho.

As principais vantagens da introgressão desses alelos, usando-se como parental doador a espécie *L. pimpinellifolium*, é que esta espécie possui frutos vermelhos quando maduros e não apresenta nenhum problema de incompatibilidade nas hibridizações com o tomateiro cultivado. A espécie silvestre *L. peruvianum* também apresenta uma alta capacidade para regeneração de plantas, porém, os frutos dessa espécie são verdes quando maduro, tem sabor desagradável, além de apresentar problemas de incompatibilidade com o tomateiro cultivado (*L. esculentum* Mill.). Nas hibridizações entre a espécie *L. peruvianum* e *L. esculentum* Mill. é necessário fazer o resgate dos embriões híbridos em F₁, F₂ e até em gerações mais avançadas (HOGENBOOM, 1972 a; FONSECA, 1987).

KOORNNEEF et al. (1986), obtiveram um genótipo superior para diferenciação de plantas “in vitro” a partir do cruzamento de *L. peruvianum* com *L. esculentum* Mill.. O genótipo denominado MsK93, apresentou ótimos resultados de regeneração nos experimentos de transformação de disco foliar mediada pela *Agrobacterium tumefaciens*, como também pela transferência direta de genes para protoplastos derivados de calos. Apesar desses resultados satisfatórios, foi verificado que o aborto de embriões continuou a ocorrer nos sucessivos retrocruzamentos com os cultivares comerciais, dificultando, deste modo, a recuperação das características agronômicas do fruto. Esse fato não ocorre quando se usa o *L. pimpinellifolium* como progenitor selvagem, pois essa espécie não apresenta nenhum sistema de incompatibilidade nos cruzamentos com o tomateiro cultivado (*L. esculentum* Mill.).

A transferência da característica regeneração de plantas, por meio da fusão de protoplastos de *L. peruvianum* e *L. esculentum*, foi descrita por WIJBRABDI et al. (1988). Os híbridos somáticos apresentaram uma alta capacidade de regeneração de plantas. Porém, os frutos produzidos não apresentaram as características agronômicas do tomateiro cultivado e nos retrocruzamentos com *L. esculentum* continuou a ocorrer o aborto de embriões. Esses autores concluíram que a habilidade para regeneração de plantas a partir de calos pode ser usada como um marcador dominante para a seleção de híbridos somáticos.

A introgressão de alelos das espécies selvagens tem sido uma das principais contribuições para o melhoramento do tomateiro nos últimos anos com relação a resistência a doenças e pragas (KOBAYASHI et al., 1996).

O controle genético da regeneração de plantas “in vitro” foi estudado por BIRHMAN et al., 1994 em batata (*Solanum chacoense*). Os resultados mostraram que essa característica é qualitativa e apresenta uma alta herdabilidade. Esses autores sugerem que a incorporação dessa característica em programas de melhoramento de cultivares de batata deve ser conseguido facilmente.

Em alfafa, BINGHAM et al. (1975) demonstraram que cultivares que apresentavam uma frequência de aproximadamente 10% de regeneração de plantas, aumentaram para 67 % em apenas 2 ciclos de seleção recorrente.

A realização de estudos complementares objetivando a identificação de genes marcadores ligados à regeneração de plantas são de fundamental importância para auxiliar nos programas de seleção e melhoramento para esta característica favorável nos trabalhos de cultura de tecidos e transformação de plantas.

5. CONCLUSÕES

- Confirmou-se a existência do controle genético na regeneração de plantas a partir da cultura de calos do tomateiro;
- O sucesso obtido nos cruzamentos interespecíficos da espécie selvagem *Lycopersicon pimpinellifolium* e *Lycopersicon esculentum* Mill., mostraram que essas espécies são próximas e que os genes de interesse agrônômico presentes na espécie *L. pimpinellifolium* tem um grande potencial no melhoramento genético do tomateiro cultivado por meio de cruzamentos e seleção;
- A introgressão da característica regeneração de plantas do tomateiro selvagem (*Lycopersicon pimpinellifolium*) para cultivares comerciais de *Lycopersicon esculentum* Mill. é possível de se realizar por meio de poucos retrocruzamentos com os parentais recorrentes, obtendo-se assim genótipos com alta capacidade de regeneração de plantas e com as características agrônômicas do tomateiro cultivado (*L. esculentum* Mill.).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, T.L. & Quiros, C.F. (1985). Somatic hibridization between *Lycopersicon peruvianum* and *L. penelli* : regenerating ability and antibiotic resistance as selection systems. **Plant Sci.**, 40: 209-219.
- Allard, R. W. (1971). Princípios do melhoramento genético das plantas. Ed. Edgard Blucher. 381p.
- Asakura, N., Misoo, S.; Kamijima, O . & Sawano, M. (1995). High frequency regeneration of diploids from apical end of cultured hypocotyl tissue in tomato. **Breed. Sci.**, 45: 455-459.
- Behki, R.M. & Lesley, M. (1976). In vitro plant regeneration from leaf of *L. esculentum* (tomato). **Can. J. Bot.**, 54: 2409-2414.
- Bellini, C.; Chupeau, M.C.; Gervasis, M.; Vastra, G. & Chupeau, Y. (1990). Importance of myo-inositol, calcium and ammonium for the viability and division of tomato protoplasts. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 23: 27-37.
- Birhman, R.K.; Laublin, G. & Cappadocia, M. (1994). Genetic control of in vitro shoot regeneration from leaf explants in *Solanum chacoense* Bitt. **Theor. Appl. Genet.**, 88: 535-540.
- Bhojwani, S.; Mullins, K. & Cohed, D. (1984). Intra varietal variation for in vitro plant regeneration in the genus *Trifolium*. **Euphytica** 33: 915-921.
- Bingham, E. T.; Hurley, D. M. & Saunders, J. W. (1975). Breeding alfalfa wich regenerates from callus tissue in culture. **Crop. Sci.** 15: 719-721.

- Borém, A . (1997). Método dos retrocruzamentos. In: Melhoramento de plantas, Viçosa, Ed. UFV. p. 357-379.
- Branca, C.; Torelli, A. & Bassy, M. (1990). Effects of benzisoxazole on tomato plant regeneration in vitro. **Plant Cell Tiss. and Org. Cult.** 21: 17-19.
- Bulk, R. W. ; Loffler, H.M.; Lindhout, T.W.H. & Koornneef, M. (1990). Somaclonal variation in tomato: effect of explant source and a comparison with chemical mutagenesis. **Theor. Appl. Genet.** 80: 817-825.
- Bullock, W. P.; Baenziger, P.S.; Schaeffer, G.W. & Bottino, J.P. (1982). Anther culture of wheat (*Triticum aestivum*) F-1 's and their reciprocal crosses. **Theor. Appl. Genet.** 62: 155-159.
- Cappadocia, M. & Ramulu, K.S.(1980). Plant regeneration from in vitro cultures of anthers and stem internodes in na interespecific hybrid , *L. esculentum* x *L. peruvianum* Mill. and citogenetic analysis of the regenerated plants. **Plant Sci. Lett.** 20: 157-166.
- Carpenter, J. A . & Fehr, W.R. (1986). Genetic variability for desirable agronomic traits in populations containing *Glycine max* germoplasm. **Crop Sci.** 26: 681-686.
- Chen, L. Z. & Adachi, T. (1994). Plant regeneration via somatic embryogenesis from cotyledon protoplasts of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Breed. Sci.** 44: 257-262.
- Chi, G.L. & Pua, E. C. (1989). Ethylene inhibitors enhanced de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* in vitro. **Plant Sci.** 64: 243-250.

- Crino, P.; Lai, A.; Di-Bonito, R.; Veronese, P. & Saccardo, F. (1994). Genetic variability in tomato plants regenerated from irradiated cotyledons. **J. Genet. Breed.** 48: 281-289.
- Davies, D.R. (1972). Speeding up the commercial propagation of freesias. **Grower** 77: 711-712.
- Derks, F.H.M.; Zelcer, A. & Colijn-Hooymans, C.M. (1990). Plant regeneration of mesophyll protoplasts from a cytoplasmic albino mutant of *L. esculentum* cv. large Red Cherry. **Plant Cell tiss. and Org. Cult.** 21: 211-216.
- Earle, E.D. & Langhans, R.W. (1974). Propagation of *Chrysanthemum* in vitro. II. Production, growth and flowering of plantlets from tissue cultures. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 99: 352-358.
- Eaton, D.L.; Busch, R.H. & Youngs, V.L. (1986). Introgression of unadapted germoplasm into adapted spring wheat. **Crop Sci.** 26: 473-478.
- Eshed, Y. & Zamir, D. (1994). Introgressions from *Lycopersicon pennellii* can improve the soluble-solids yield of tomato hybrids. **Theor. Appl. Genet.** 88: 891-897.
- Faria, R. T. (1992). Análise genética da capacidade de regeneração de plantas in vitro em tomate. Campinas, 84p. Tese de Mestrado em Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Campinas.
- Faria, R.T. and Illg, R.D. (1991). Regeneração in vitro de genótipos selvagens e de variedades comerciais de tomate. Resumos. II Feira e Congresso Nacional de Biotecnologia, p. 22.
- Faria, R. T. & Illg, R.D. (1996). Inheritance of in vitro plant regeneration ability in the tomato. **Rev. Bras. Genet.** 19: 113-116.

- Fehr, W.R. (1987). Backcross method. In: Fehr, W.R. (ed.). Principles of cultivar development . V 1. 536p.
- Filgueira, F. A .R.. (1982). Tomate: a mais universal das hortaliças . In: Manual de Olericultura, Cap. 8., p. 223-300.
- Fischhoff, D. A .; Bowdish, K.S.; Perlak, F.J.; Marrone, P. J.; McCormick, S.M.; Dean, D. A .; Rochester, D.E.; Rogers, S.G. & Fraley, R.T. (1987). Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio-Technol.** 5: 807-813.
- Fonseca, M. I. S. (1987). Cultura de embriões imaturos para obtenção de híbridos interespecíficos em tomateiro. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas.. Universidade Estadual de Campinas. 157p.
- Frankenberger, E.A., Hasegawa, P.M. & Tigghelaar, E.C. (1981a). Influence of environment and developmental state on the shoot-forming capacity of tomato genotypes. **Z. Pflanzenphysiol** 102: 221-232.
- Frankenberger, E.A., Hasegawa, P.M. & Tigghelaar, E.C. (1981b). Diallel analysis of shoot forming capacity among selected tomato genotypes. **Z. Pflanzenphysiol** 102: 233-242.
- Garcia-Reina, G. & Luque, A. (1988). Analysis of the organogenetic potential of calli of three Canary Islands *Lycopersicon esculentum* land races. **Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.** 12: 279-283.
- Gielen, J.L.C.; Haan, P.; Koll, A . J.Peters, D.; Grinsven, M.Q.J. & Goldbach, R.W.(1991). Engineered resistance to tomato spotted virus, a negative strand RNA virus. **Bio-Technol.** 9: 1363-1367.

- Gill, R.; Malik, K. A .; Sanago, M.H.M. & Saxena, P.K. (1995). Somatic embryogenesis and plant regeneration from seedling cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **J. of Plant Physiol.** 147: 273-276.
- Grandillo, S. & Tanksley, S.D. (1996). Genetic analysis of RFLPs, GATA microsatellites and RAPDs in a cross between *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*. **Theor. Appl. Genet.** 92: 957-965.
- Grandillo, S. & Tanksley, S.D. (1996). QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. **Theor. Appl. Genet.** 92: 935-951.
- Greer, A.F. & Tabeizadeh, Z. (1991) Characterization and plant regeneration of cell suspension cultures of *Lycopersicon chilense*. **Can. J. Bot.** 69: 2257-60.
- Gunay, A . L. & Rao, P.S.(1980). In vitro propagation of hybrid tomato plants (*L. esculentum*) using hypocotyl and cotyledon explants. **Ann. Bot.** 45: 205-207. .
- Heiser, C.B. (1977). Semente para a civilização. São Paulo. Ed. Univ. de São Paulo. 253p.
- Hespanhol, R. A . (1991). O tomate a caminho da indústria: a influência da CICA na Alta Sorocabana de Presidente Prudente. Tese de Mestrado. UNESP, Rio Claro. 97p.
- Hoffmann, R. (1985). As mudanças no processo de trabalho nas culturas de tomate envarado e rasteiro no Estado de São Paulo. Piracicaba. FEALQ. V. 4.
- 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* Mill. **Euphytica** 21: 228-243.
- Hospital, F.; Chevalet, C. & Mulsant, P. (1992). Using markers in gene introgression in breeding programs. **Genetics** 132: 1199-1210.
- Illg, R.D. & Siqueira, W. J. (1984). High frequency of plant regeneration of leaf explants in six *Lycopersicon esculentum* Mill cultivars. *Revta. Brasil. Bot.* 7: 1-4.
- Jenkins, J.A. (1948). The origin of the cultivated tomato. **Economic Botany** 2: 379-392.
- Kaleikau, E.K., Sears, R.G. & Gill, B.S. (1989). Control of tissue culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theor. Appl. Genet.** 78: 783-787.
- Kartha, K.K.; Gamborg, O. L. & Constabel. (1976). Morphogenetic investigation on in vitro leaf culture of tomato (*L. esculentum*) and high frequency plant regeneration. **Z. Pflanzenphys.** 77: 292-301.
- Kinsara, A. ; Patnaik, S.N.; Cocking, E.C. & Power, J.B. (1986). Somatic hybrid plants of *Lycopersicon esculentum* Mill. and *L. peruvianum* Mill. **J. Plant Physiol.** 125: 225-234.
- Kobayashi, R.S.; Stommel, J.R. & Sinden, S.L. (1996). Somatic hybridization between *Solanum ochroanthum* and *Lycopersicon esculentum*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 45: 73-78.
- Koornneef, M.; Jongsma, M.; Toma, I.; Weide, R.; Zabel, P. & Hilli, J. (1986). Breeding of a tomato genotype readily accessible to genetic manipulation. **Plant Sci.** 45: 201-208.

- Koornneef, M., Hanhart, C.J. & Martinelli, L. (1987). A genetic analysis of cell culture traits in tomato. **Theor. Appl. Genet.** 74: 633-641.
- Koornneef, M., Bade, J., Hanhart, C., Horsman, K., Schel, J., Soppe, W., Vekerk, R. & Zabel, P. (1993). Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. **Plant J.** 3: 131-141.
- Krikorian, A. D.; Staicu, S.A. & Kann, R.P. (1981). Karyotype analysis of a daylily clone reared from aseptically cultured tissues. **Ann. Bot.** 47: 121-131.
- Kut, S.A. & Evans, D.A. (1982). Plant regeneration from cultured leaf explants of eight wild tomato species and two related *Solanum* species. **In vitro** 18: 593-598.
- Larkin, P.J. & Scowcroft, W.R. (1981). Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theor. Appl. Genet.** 60: 197-214.
- Lazar, M.D., Baenziger, P.S. & Shaeffer, G.W. (1984). Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther cultures. **Theor. Appl. Genet.** 68: 131-134.
- Lazzeri, P.A.; Hildebrand, D.F. & Collins, G.B. (1987). Soybean somatic embryogenesis: effects of nutritional, physical and chemical factors. **Plant Cell Tiss. and Org. Cult.** 10: 209-220.
- Lawrence, P. K. & Frey, K.J. (1975). Backcross variability for grain yield in oats species crosses (*Avena sativa* x *A. sterilis* L.). **Euphytica** 24: 77-86.
- Locky, R. D. (1983). Callus formation and organogenesis by explants of six *Lycopersicon* species. **Can. J. Bot.** 61: 1072-1079.

- Marcenaro, S.; Voyiatzi, C. & Lercari, B. (1994). Photocontrol of in vitro bud regeneration: A comparative study of the interaction between light and IAA in a wild type and na aurea mutant of *Lycopersicon esculentum*. **Physiol. Plantarum** 91: 329-333.
- Matos, N. O. & Cordeiro, A. R. (1988). Regeneração de Cubiu (*Solanum sessiliflorum*) - tomate do índio - por cultura de tecidos. 40^a. SBPC. Resumos. p.805.
- Miller, J.C. & Tanksley, S.D. (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. **Theor. Appl. Genet.** 80: 437-448.
- Minami, K. & Fonseca, H. (1982). Tomate - produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. São Paulo. Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. Extensão Agroindustrial. V. 8.
- Monacelli, B.; Altamura, M. M.; Pasqua, G.; Biasini, M.G. & Sala, F. (1988). The histogenesis of somaclones from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cotyledons. **Protoplasma** 142: 156-163.
- Montalván, R. & Destro, D. (1997). Método dos retrocruzamentos. In: Destro, D.; Montalván, R. Melhoramento Genético de Plantas. Londrina, Pr. Ed. UEL, Londrina, PR. p. 256-277.
- Morgan, A. & Cocking, E.C. (1982). Plant regeneration from protoplasts of *Lycopersicon esculentum* Mill. **Z. Pflanzenphys.** 106: 97-104.
- Muhlbach, H. P. (1980). Different regeneration potentials of mesophyll protoplasts from cultivated and a wild species of tomato. **Planta** 148: 89-96.

- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473-497.
- Nadolska-Orczyk, A. and Malepszy, S. (1989). In vitro culture of *Cucumis sativus* L. Genes controlling plant regeneration. **Theor. Appl. Genet.** 78: 836-840.
- Nagai, H. (1993). Tomate. In: Furlani, A .M.C. (ed.). O melhoramento de plantas no Instituto Agronômico de Campinas. V. 1. p.301-313.
- Newman, P. O ., Krishnaraj, S. & Saxena, P. K. (1996). Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): Somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl explants induced with 6-benzyladenine. **J. of Plant Sciences** 157: 554-560.
- Novak, F.J., Daskalov, S., Herichova, A. & Hermelin, T. (1988). Somatic embryogenesis in maize and comparison of genetic variability induced by gamma radiation and tissue culture techniques. **Plant Breed.** 101: 66-79.
- Nuevo, P. S.(1994). Aspectos da cadeia agroindustrial do tomate no Brasil. **Informações Econômicas de São Paulo.** 24: 31-44.
- Ohki, S., Bigot, C. & Mousseau, J. (1978). Analysis of shoot forming capacity in vitro in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) and their hybrids. **Plant Cell Physiol** 19: 27-42.
- Openshaw, S.J.; Jarboe, S.G. & Beavis, W.D. (1994). Marker-assisted selection in backcross breeding. In: Lower, R. (ed.) ASHS/CSSA Joint Plant Breeding Symposium on Analysis of Molecular Marker Data. Corvallis, OR. Oregon State University.

- Ou, G., Wang, W.C. and Nguyen, H.T. (1989). Inheritance of somatic embryogenesis and organ regeneration from immature embryo cultures of winter wheat. **Theor. Appl. Genet.** 78: 137-142.
- Padmanabhan, V.; Paddock, E.F. & Sharp, W.R. (1974). Plantlet formation from *Lycopersicon esculentum* leaf callus. **Can. J. Bot.** 52: 1429-1432.
- Párraga, M. (1963). Estudo de heritabilidade e correlações fenotípicas em tomateiro. Tese de Mestrado Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, Viçosa. 90p.
- Pence, V.C. & Caruso, J.L. (1984). Effects of IAA and four IAA conjugates on morphogenesis and callus growth from tomato leaf discs. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 3: 101-110.
- Phillips, W.J.; Chapman, C.D. & Jack, P.L. (1994). Molecular cloning and analysis of one member of a polymorphic family of GACA-hybridising DNA repeats in tomato. **Theor. Appl. Genet.** 88: 845-851.
- Pinto, C.M.F. & Casali, V.W.D. (1980). Origem e botânica do tomateiro. **Inf. Agropec.** 6: 8-9.
- Pratta, G.; Zorzoli, R. & Picardi, L.A. (1997). Intra and interespecific variability of in vitro culture response in *Lycopersicon* (tomatoes). **Braz. J. Genet.** 20: 75-78.
- Prioli, L.M. (1987). Cultura de tecidos e células, controle genético da embriogênese somática e variação somaclonal em milho (*Zea mays* L.). Campinas, 232p. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, UNICAMP.
- Reish, B. & Bingham, E.T. (1980). The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfalfa. **Plant Sci. Lett.** 20: 71-77.

- Rick, C.M. (1958). The role of natural hybridization in the derivation of cultivated tomatoes of western South America. **Economic Botany** 12: 346-367.
- Rick, C.M. (1978) . El tomate. **Sci. Amer.** 45-55.
- Rick, C.M. & Yoder, J.I. (1988). Classical and molecular genetics of tomato: highlights and perspectives. **Ann. Rev. Genet.** 22: 281-300.
- Rick, C.M. (1982). The potential of exotic germoplasm for tomato improvement. In: Vasil, I.K., Scowcroft, W.R. and Frey, K.J. Plant improvement and somatic cell genetics. Acad. Press, New York, p. 1-28.
- Seresinhe, P. S. J. & Oertli, J. J. (1991). Effects of boron on growth of tomato cell suspensions. **Phys. Plant.** 81: 31-36.
- Sheridan, W.F. (1968). Tissue culture of the monocot *Lilium*. **Planta** 82: 189-192.
- Singh, R.J.; Kollipara, K.L. & Hymowitz, T. (1993). Backcross derived fertile lants from Glycine max and G. tomentella intersubgeneric hybrids. **Crop. Sci.** 33: 1002-1007.
- Smith, J.R. (1968). The new world centers of origin of cultivated plants and the archaeological evidence. **Economic Botany** 22: 253-266.
- Tan, M.M.C., Colijin-Hooymans, C.M., Lindhout, W.H. & Kool, A.J. (1987). A comparison of shoot regeneration from protoplasts and leaf discs of difference genotypes of the cultivated tomato. **Theor. Appl. Genet.** 75: 105-108.
- Templeton-Somers, K.M. & Collins, W.W. (1986). Heritability of regeneration in tissue culture of sweet potato (*Ipomea batatas* L.). **Theor. Appl. Genet.** 71: 835-841.

- Thomas, B. R. & Pratt, D. (1981). Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryo callus. **Theor. Appl. Genet.** 59: 215-219.
- Tomes, D.T. & Smith, O.S. (1985). The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays L.*) germoplasm. **Theor. Appl. Genet.** 70: 505-509.
- Torelli, A.; Soragni, E.; Bochi, A.; Ottonello, S. & Branca, C. (1996). New potential markers of in vitro tomato morphogenesis identified by mRNA differential display. **Plant Molecular Biology** 32: 891-900.
- Torres, C.C. & Romano, E. (1987). Capacidade de regeneração “in vitro” de cultivares de tomateiro. 39^a. SBPC. Resumos. p. 793.
- Vencovsky, R. & Barriga, P. (1992). Genética biométrica no fitomelhoramento. Sociedade Brasileira de Genética, ed., 446p.
- Wan, Y., Sorensen, E.L. & Liang, G.H. (1988). Genetic control of in vitro regeneration in alfalfa (*Medicago sativa L.*). **Euphytica** 39: 3-9.
- Warnock, S. J. (1988). A review of taxonomy and phylogeny of the genus *Lycopersicon*. **Hort. Sci.** 23: 669-673.
- Wijbrandi, J., Vos, J.G.M. & Koornneef, M. (1988). Transfer of regeneration capacity from *Lycopersicon peruvianum* to *L. esculentum* by protoplast fusion. **Plant Cell Tiss. Cult.** 12: 193-196.
- Zapata, F.J.; Evans, P.K.; Power, J.B. & Cocking. (1977). The effect of temperature on the division of leaf protoplasts of *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. **Plant Sci. Lett.** 8: 119-124.

- Zapata, F.J. & Sink, K.C. (1981). Somatic embryogenesis from *L. peruvianum* leaf mesophyll protoplasts. **Theor. Appl. Genet.** 59: 265-268.
- Zelcer, A.; Soferman, O. & Izhar, S. (1984). An in vitro screening for tomato genotypes exhibiting efficient shoot regeneration. **J. Plant. Physiol.** 115: 211-215.
- Zorzoli, R.; Mroginski, L. A . & Picardi, L.A . (1994). Evaluation of the capacity for in vitro dedifferentiation and redifferentiation of four genotypes of *Lycopersicon esculentum* Mill. **AgriScientia** 11: 55-60.

7. APÊNDICE

. LISTA DE ABREVIATURAS

AIA - ácido 3-indolilacético

6 -BA - 6-benzilaminopurina

NAA - ácido naftalenacético

MS - meio básico de Murashige & Skoog (1962)

RC - retrocruzamento

PD - parental doador

PC - parental recorrente

Inheritance of *in vitro* plant regeneration ability in the tomato

Ricardo T. Faria and Rolf D. Illg

ABSTRACT

Lycopersicon pimpinellifolium, with high plant regeneration ability, used as a pollen donor, was crossed with five recalcitrant *L. esculentum* genotypes. Statistical analysis was based upon frequency data of calluses that regenerated plants (R) in F₁, F₂, BC₁ and on reciprocal crosses, with genotypes that did not regenerate plants (NR). F₁ hybrids showed a dominance effect; no differences were observed in reciprocal crosses. The F₂ rate was close to 9:7 (R:NR) and BC₁ expressed a 1:3 (R:NR) rate. The results suggest an interaction of two dominant genes, indicating that the transfer of high plant regeneration ability from wild to commercial varieties would be relatively easy, since a qualitatively inherited dominant trait is involved.

INTRODUCTION

Studies on the genetics of regeneration in tomatoes have demonstrated that this trait is highly heritable (Frankenberger *et al.*, 1981) with a dominance effect (Ohki *et al.*, 1978; Adams and Quiros, 1985; Wijbrandi *et al.*, 1988). Models of qualitative inheritance of plant regeneration have been described for alfalfa (Wan *et al.*, 1988; Seitzkris and Bingham, 1988), corn (Tomes and Smith, 1985; Hodges *et al.*, 1986) and wheat (Galiba *et al.*, 1986; Higgins and Mathias, 1987; Kaleikau *et al.*, 1989; Ou *et al.*, 1989). In studies with rye, it was concluded that plant regeneration ability is determined by a polygenic system and has a recessive character (Rakoczy-Trojanowska and Malepszy, 1993). Despite the various studies carried out on plant regeneration, only a few papers have proposed in detail the mode of inheritance of regeneration ability using F₁, F₂, back crosses (BC) and reciprocal crosses (Reish and Bingham, 1980; Nadolska-Orczyk and Malepszy, 1989).

The objective of the present study was to establish a model for the inheritance of the plant

regeneration trait on the basis of the F₁, F₂ and BC₁ generations obtained from crosses between the wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and five cultivars of *L. esculentum*. The choice of *L. pimpinellifolium* was due to the high regeneration capacity presented by one of its accessions and to the fact that this species crosses easily with cultivated tomato plants, producing fertile and viable seeds.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

To initiate genetic studies of regeneration, genotypes with high and low regeneration potential were identified and cross-pollinated in the greenhouse after emasculation. The high regeneration genotype *L. pimpinellifolium*, WV-700 (P1), was selected previously by Faria and Illg (1991), as were the five low *L. esculentum* regeneration parents known as: VFN-8 (P2), Petomech (P3), Santa Rita (P4), CNPH-080 (P5) and Red Cherry (P6). The F₁, F₂ and BC₁ generations were analyzed for plant regeneration capacity.

In vitro procedures

Hypocotyl segments (3 mm) from seedlings germinated *in vitro* were utilized as explant sources. Culture medium (mg) was based on Murashige and Skoog (1962), with the salt concentration reduced by half in all experiments. Calluses were induced for two weeks on MS medium supplemented with 1 mg/l IAA and 2.25 mg/l BA. Plant regeneration from callus was achieved by transfers for two months to the same basic medium, but containing 0.5 mg/l IAA and 5 mg/l BA, as described by Garcia-Reina and Luque (1988).

Data analysis

Genetic analysis was done on the basis of the frequency of calluses that regenerated (R) and did not regenerate (NR) plants in segregating generations F₂ and BC₁. For segregation analysis, two fruits of each progeny were selected at random and all of their seeds were germinated *in vitro* to obtain one callus per individual hypocotyl explant. A randomized complete-block design was used in all experiments. Chi-square analyses, with the level of significance set at 0.05, were used for testing the goodness of fit for the appropriate genetic model for plant regeneration capacity.

RESULTS AND DISCUSSION

The interspecific crosses of *L. pimpinellifolium* with *L. esculentum* genotypes were successful as these species do not show any type of incompatibility (Hogenboom, 1972; Rick, 1982). The results of the crosses, showing the number of calluses that effectively regenerated plants (R) or not (NR) in the F₁, F₂, and BC generations, are presented in Table I. The F₁ hybrids demonstrated a high plant regeneration ability (73-90%) in the five family sets analyzed, with dominance effects. Dominance for plant regeneration from calluses culture has been previously reported in the tomato literature (Kut and Evans, 1982; Tan *et al.*, 1987; Wijbrandi *et al.*, 1988) and for other crops such as corn (Hodges *et al.*, 1986; Prioli, 1987; Novak *et al.*, 1988), alfalfa (Reish and Bingham, 1980; Wan *et al.*, 1988; Seitzkris and Bingham, 1988) and wheat (Kaleikau *et al.*, 1989; Ou *et al.*, 1989). Wijbrandi *et al.* (1988) observed that fusion of protoplasts from *L. peruvianum*, which has a high plant regeneration ability, with genotypes of *L. esculentum*, in which this trait is not present, favored the formation of calluses with plant regeneration ability. These investigators suggested that plant regeneration can be

used as a dominant marker for the selection of somatic hybrids. Recently, a gene controlling shoot regeneration in the tomato has been mapped on chromosome 3 of *L. peruvianum* (Koorneef *et al.*, 1993). The frequency of plant regeneration for F₁ hybrids did not exceed that of the parental genotype WV-700 (*L. pimpinellifolium*), indicating the absence of a heterosis effect on the crosses performed (Table I). In contrast, Ohki *et al.* (1978) reported that hybrids between two tomato cultivars showed heterosis for plant regeneration. The observed proportion of calluses that regenerated plants (R) or not (NR) was close to 9:7 (R:NR) in the F₂ generation and to 1:3 (R:NR) in BC₁. Neither value was significant at the 5% level of probability by the chi-square test for the five family sets analyzed (Table I). These results suggest the involvement of two independent genes interacting in the expression of plant regeneration.

The segregation results obtained in the present study indicate that plant regeneration ability is a qualitative trait, agreeing with results reported by other studies on the genetic control of regeneration in the tomato (Frankenberger *et al.*, 1981; Koorneef *et al.*, 1987).

In RFLP analyses, Miller and Tanksley (1990) concluded that *L. pimpinellifolium* is one of the closest species to *L. esculentum*, thus suggesting that the genetic variation detected in this species can be easily utilized for tomato improvement.

On the basis of the present results, indicating that plant regeneration is controlled by two independent interacting genes, we suggest that it should be relatively easy to transfer plant regeneration ability from *L. pimpinellifolium* to commercial *L. esculentum* varieties, in order to maximize the plant regeneration response *in vitro*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Walter Siqueira (I.A.C.) for supplying seeds of wild and commercial genotypes of tomato. We also would like to thank Dr. Aquiles Piedrabuena (UNICAMP) for his assistance in the statistical analysis of the results.

Publication supported by FAPESP.

RESUMO

O genótipo WV-700 (*Lycopersicon pimpinellifolium*) com uma alta capacidade para regeneração de plantas foi cruzado com cinco genótipos de *L. esculentum* recalcitrantes para esta característica. As análises estatísticas foram

Table I - Genetic analysis for plant regeneration ability in the five tomato cross families.

Genotype	Generation	Explant number	Observed		Expected		χ^2 value ⁴
			R ²	NR ³	R	NR	
P1		60	55	5	1	0	
P2		60	5	55	0	1	
P1 x P2	F ₁	60	54	6	1	0	
	F ₂ (A) ¹	192	97	95	9	7	2.56
	(B)	201	120	81	9	7	0.97
	BC (A)	129	29	100	1	3	0.44
	(B)	144	34	110	1	3	0.15
P3		60	3	57	1	0	
P1 x P3	F ₁	60	47	13	1	0	
P3 x P1	F ₁	60	44	16	1	0	
	F ₂ (A)	189	102	87	9	7	0.40
	(B)	171	92	79	9	7	0.42
	BC (A)	114	26	88	1	3	0.29
	(B)	138	27	111	1	3	2.17
P4		60	3	57	1	0	
P1 x P4	F ₁	60	45	15	1	0	
	F ₂ (A)	195	115	80	9	7	0.59
	(B)	210	131	79	9	7	3.19
	BC (A)	138	26	112	1	3	2.79
	(B)	126	25	101	1	3	1.78
P5		60	0	60	1	0	
P1 x P5	F ₁	60	52	8	1	0	
P5 x P1	F ₁	60	54	6	1	0	
	F ₂ (A)	174	100	74	9	7	0.11
	(B)	186	108	78	9	7	0.25
	BC (A)	111	20	91	1	3	2.39
	(B)	156	34	122	1	3	0.86
P6		60	4	56	0	1	
P1 x P6	F ₁	60	49	11	1	0	
	F ₂ (A)	162	98	64	9	7	1.19
	(B)	168	93	75	9	7	0.05
	BC (A)	123	27	96	1	3	0.61
	(B)	138	30	108	1	3	0.78

¹A and B: Are progenies in different fruits from the same generation.

²R: Regenerated plants.

³NR: No regenerated plants.

⁴Differences not significant at the level of 0.05.

P1 = *Lycopersicon pimpinellifolium*, WV-700; P2-6 = *L. esculentum*, P2 = VFN-8, P3 = Petomech, P4 = Santa Rita, P5 = CNPH-080, P6 = Red Cherry.

baseadas na frequência de calos que regeneraram plantas (R) nas gerações F₁, F₂ e retrocruzamentos (RC) com os genótipos que não regeneram plantas (NR). Os híbridos F₁ apresentaram uma alta capacidade de regeneração de plantas, mostrando um efeito de dominância. A frequência de regeneração na geração F₂ foi próxima a 9:7 (R:NR) e nos RC próximo de 1:3 (R:NR). Esses resultados sugerem a interação de dois genes dominantes, indicando que a transferência da capacidade de regeneração de plantas do tomateiro selvagem para variedades comerciais deve ser relativamente fácil, já que essa característica é dominante e controlada qualitativamente.

REFERENCES

- Adams, T.L. and Quiros, C.F. (1985). Somatic hybridization between *Lycopersicon peruvianum* and *L. penellii*: regenerating ability and antibiotic resistance as selection systems. *Plant Sci.* 40: 209-219.
- Faria, R.T. and Illg, R.D. (1991). Regeneração *in vitro* de genótipos selvagens e de variedades comerciais de tomate. Resumos. II Feira e Congresso Nacional de Biotecnologia, pp. 22.
- Frankenberger, E.A., Hasegawa, P.M. and Tigghelaar, E.C. (1981). Influence of environment and developmental

- state on the shoot-forming capacity of tomato genotypes. *Z. Pflanzenphysiol* 102: 221-232.
- Galiba, G., Kovacs, G. and Sutka, J. (1986). Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat. *Plant Breed.* 97: 261-263.
- Garcia-Reina, G. and Luque, A. (1988). Analysis of the organogenetic potential of calli of three Canary Islands *Lycopersicon esculentum* land races. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 12: 279-283.
- Higgins, P. and Mathias, R.J. (1987). The effect of the 4B chromosomes of hexaploid wheat on the growth and regeneration of callus cultures. *Theor. Appl. Genet.* 74: 439-444.
- Hodges, T.K., Kamo, K.K., Imbrie, C.M. and Becwar, M.R. (1986). Genotype specific of somatic embryogenesis and regeneration in maize. *Bio-Technology* 4: 219-223.
- Hogenboom, N.G. (1972). Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*. 1. The genus *Lycopersicon*, its breeding barriers and the importance of breaking these barriers. *Euphytica* 21: 221-227.
- Kaleikau, E.K., Sears, R.G. and Gill, B.S. (1989). Control of tissue culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 78: 783-787.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J. and Martinelli, L. (1987). A genetic analysis of cell culture traits in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 74: 633-641.
- Koornneef, M., Bade, J., Hanhart, C., Horsman, K., Schel, J., Soppe, W., Vekerk, R. and Zabel, P. (1993). Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. *Plant J.* 3: 131-141.
- Kut, S.A. and Evans, D.A. (1982). Plant regeneration from cultured leaf explants of eight wild tomato species and two related *Solanum* species. *In vitro Cel. Develop. Biol.* 8: 593-598.
- Miller, J.C. and Tanksley, S.D. (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 80: 437-448.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nadolska-Orczyk, A. and Malepszy, S. (1989). *In vitro* culture of *Cucumis sativus* L. Genes controlling plant regeneration. *Theor. Appl. Genet.* 78: 836-840.
- Novak, F.J., Daskalov, S., Herichova, A. and Hermelin, T. (1988). Somatic embryogenesis in maize and comparison of genetic variability induced by gamma radiation and tissue culture techniques. *Plant breed.* 101: 66-79.
- Ohki, S., Bigot, C. and Mousseau, J. (1978). Analysis of shoot forming capacity *in vitro* in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) and their hybrids. *Plant Cell Physiol.* 19: 27-42.
- Ou, G., Wang, W.C. and Nguyen, H.T. (1989). Inheritance of somatic embryogenesis and organ regeneration from immature embryo cultures of winter wheat. *Theor. Appl. Genet.* 78: 137-142.
- Prioli, L.M. (1987). Cultura de tecidos e células, controle genético da embriogênese somática e variação somaclonal em milho (*Zea mays* L.). Doctoral thesis, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- Rakoczy-Trojanowska, M. and Malepszy, S. (1993). Genetic factors influencing regeneration ability in rye (*Secale cereale* L.) I. Immature inflorescences. *Theor. Appl. Genet.* 86: 406-410.
- Reish, B. and Bingham, E.T. (1980). The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfalfa. *Plant Sci. Lett.* 20: 71-77.
- Rick, C.M. (1982). The potential of exotic germoplasm for tomato improvement. In: *Plant Improvement and Somatic Cell Genetics* (Vasil, I.K., Scowcroft, W.R. and Frey, K.J., eds.). Academic Press, New York, pp. 1-28.
- Seitzkris, H.E. and Bingham, E.T. (1988). Interactions of highly regenerative genotypes of alfalfa (*Medicago sativa*) and tissue culture protocols. *In Vitro Cel. Develop. Biol.* 24: 1047-1051.
- Tan, M.M.C., Colijin-Hooymans, C.M., Lindhout, W.H. and Kool, A.J. (1987). A comparison of shoot regeneration from protoplasts and leaf discs of different genotypes of the cultivated tomato. *Theor. Appl. Genet.* 75: 105-108.
- Tomes, D.T. and Smith, O.S. (1985). The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germoplasm. *Theor. Appl. Genet.* 70: 505-509.
- Wan, Y., Sorensen, E.L. and Liang, G.H. (1988). Genetic control of *in vitro* regeneration in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Euphytica* 39: 3-9.
- Wijbrandi, J., Vos, J.G.M. and Koornneef, M. (1988). Transfer of regeneration capacity from *Lycopersicon peruvianum* to *L. esculentum* by protoplast fusion. *Plant Cell Tiss. Cult.* 12: 193-196.

(Received January 12, 1995)