

BC/17989

IB/80549



UNICAMP

ANÁLISE GENÉTICA DA CAPACIDADE DE
REGENERAÇÃO DE PLANTAS "IN VITRO"
EM TOMATE.

RICARDO TADEU DE FARIA

Orientador: Rolf Dieter Illg

SETEMBRO/1992

T/UNICAMP

F226_a

Este exemplar corresponde à redação final
da ~~tese~~ dissertação pelo (o) candidato (a)
Ricardo Tadeu de
Faria
e aprovada pela Comissão Julgadora.
Campinas, 11 de setembro de 1992



Rolf Dieter Illg

**ANÁLISE GENÉTICA DA CAPACIDADE DE REGENERAÇÃO DE PLANTAS
"IN VITRO" EM TOMATE**

RICARDO TADEU DE FARIA

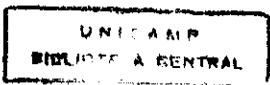
Orientador: Prof. Dr. Rolf Dieter Illg

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Genética

92/225/192

CAMPINAS - SP

1992



UNIFORME IP
N.° CARRAQUE: 127
EJETA
V. E.
PRECO 17939
FRUS 295 92
C. D. N.
PRECO 100 000,00
DASS 14/10/92
N.° LPO

CM.00033005-1

*Aos meus pais, Celso e Tereza
e aos irmãos Fábio, Eduardo e Mara,
dedico*

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Rolf Dieter Illg pela orientação da tese, estímulo, amizade e confiança.
- À minha família pelo incentivo, apoio e confiança durante todos estes anos.
- Aos pesquisadores MS.Walter José Siqueira e Dr. Luis Pedro Barrueto Cid, pelas valiosas sugestões apresentadas durante a execução deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Aquiles E. Piedrabuena, pela orientação na análise estatística dos dados.
- Aos Drs. William José da Silva e Ivanhoé Rodrigues Baracho, pelas discussões e sugestões apresentadas.
- Ao Sr. Pedro Maria (Formiga) pela amizade e auxílio nos experimentos de campo.
- Às técnicas de laboratório: Antonia Nadir Dallacqua e Edna Rosa dos Santos pela colaboração e amizade.
- Aos colegas: Eduardo Del Grossi, Pedro Barrueto e Antonio Tomaz Martins, pela amizade e convívio durante o curso.

- As secretárias: Silvia, Tereza, Célia e Patrícia, pela atenção e cordialidade.

- Ao Depto. de Genética e Evolução e à todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsas de aperfeiçoamento e mestrado, respectivamente.

CONTEÚDO

1.	INTRODUÇÃO.....	01
2.	REVISÃO DE LITERATURA	
2.1	Morfogênese de tomate "in vitro".....	03
2.2	Análise genética da regeneração de plantas em tomate.....	07
2.3	Análise genética da regeneração de plantas em outras espécies.....	11
2.4	Relações de compatibilidade entre algumas espécies de tomate.....	13
3.	MATERIAL E MÉTODOS	
3.1	Germoplasma.....	16
3.2	Multiplicação de sementes de tomate em campo e em casa de vegetação.....	17
3.3	Indução de calos e regeneração de plantas de tomate.....	18
3.3.1	Estabelecimento do protocolo para indução de calos e regeneração de plantas.....	18
3.3.2	Obtenção de explantes.....	18
3.3.3	Meios de cultura.....	19
3.3.3.1	Meio para germinação de sementes (MS-G).....	19
3.3.3.2	Meio para indução de calos (MS-I).....	19
3.3.3.3	Meio para regeneração de plantas (MS-R).....	20
3.3.3.4	Meio para crescimento dos "plantlets" (MS-C).....	20
3.3.4	Procedimento para indução de calos.....	20
3.3.5	Procedimento para regeneração de plantas.....	20
3.3.6	Avaliação da capacidade de regeneração de plantas a partir de calos de genótipos selvagens e cultivados de tomate....	21
3.4	Herança da capacidade de regeneração "in vitro".....	23
3.4.1	Famílias de cruzamento.....	23

3.4.2	Obtenção das progênies híbridas F_1 dos genótipos que apresentaram resultados contrastantes para a capacidade de regenerar plantas.....	26
3.4.3	Obtenção das progênies híbridas F_2 e retrocruzamentos com os genótipos com baixa capacidade para regeneração de plantas.....	27
3.4.4	Indução de calos e regeneração de plantas dos híbridos F_1 e dos cruzamentos recíprocos.....	27
3.4.5	Indução de calos e regeneração de plantas das gerações F_2 e dos retrocruzamentos com os genótipos com baixa capacidade para regeneração de plantas.....	28

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1	Multiplicação de sementes de tomate no campo e em casa de vegetação.....	30
4.2	Estabelecimento do protocolo para indução de calos e regeneração de plantas de tomate.....	30
4.2.1	Germinação de sementes.....	30
4.2.2	Obtenção de explantes.....	31
4.2.3	Indução de calos.....	31
4.2.4	Regeneração de plantas.....	32
4.2.5	Avaliação da capacidade de regeneração de plantas de genótipos selvagens e cultivados de tomate.....	33
4.3	Herança da capacidade de regeneração "in vitro".....	38
4.3.1	Obtenção das progênies híbridas F_1 dos genótipos que apresentaram resultados contrastantes para a capacidade de regenerar plantas.....	38
4.3.2	Obtenção das progênies híbridas F_2 e dos retrocruzamentos com os genótipos com baixa capacidade para regeneração de plantas.....	43
4.3.3	Indução de calos e regeneração de plantas dos híbridos F_1 e dos cruzamentos recíprocos.....	43

4.3.4	Indução de calos e regeneração de plantas das gerações F ₂ e dos retrocruzamentos com os genótipos com baixa capacidade para regeneração de plantas.....	47
5.	CONCLUSÕES.....	58
6.	RESUMO.....	59
7.	SUMMARY.....	61
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
9.	APÊNDICE.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	- ácido 3-indolilacético
BAP	- 6-benzilaminopurina
NAA	- ácido naftalenacético
PCNB	- pentacloronitrobenzeno
MS	- meio básico de MURASHIGE & SKOOG (1962)
BC	- retrocruzamento
AgNO ₃	- nitrato de prata
Ag ₂ SO ₄	- sulfato de prata

1. INTRODUÇÃO

O tomate (Lycopersicon esculentum) é considerado uma espécie que apresenta uma série de vantagens para estudos genéticos por possuir: grande variabilidade genética natural, alta taxa de autopolinização, facilidade de hibridizações controladas, falta de duplicação gênica na arquitetura genética da planta ($2n=24$), ciclo de vida curto, grande quantidade de sementes por fruto e mapas cromossômicos que situam-se entre os melhores obtidos para as plantas superiores (Rick, 1978).

Além disso, devido à sua palatabilidade e versatilidade na alimentação humana o tomate é uma das hortaliças mais difundidas em todo o mundo. No Brasil ocupa o 2º lugar entre as culturas olerícolas por ordem de importância econômica, sendo superado apenas pela batata (Filgueira, 1982).

Atualmente uma das maiores necessidades da cultura é a obtenção de variedades resistentes a pragas e doenças, pois a tomaticultura é uma das atividades agrícolas que mais utiliza fungicidas e inseticidas em pulverizações, devido a frequência e à gravidade dos ataques de fungos patogênicos e insetos transmissores de viroses que ocasionam doenças.

A cultura de células e tecidos "in vitro" vem a ser mais um instrumento auxiliar nos programas de melhoramento de plantas, permitindo a obtenção de linhagens selecionadas a diversos fatores causadores de estresse (Shepherd, 1986), haplóides (Him Him, 1987), híbridos somáticos (Wijbrandi et al, 1988), variantes somaclonais (Evans & Sharp, 1986; Illg, 1990) e transformação genética (Fischhoff

et al, 1987; Gielen et al, 1991).

No entanto, para se chegar à aplicação prática da cultura de tecidos é necessário às células apresentarem capacidade de regenerar plantas em alto rendimento, contudo o tomate cultivado (Lycopersicon esculentum) tem baixo potencial organogénético quando comparado com os genótipos selvagens (Delanghe & Bruijne, 1976).

Estudos da base genética da regeneração mostram que a diferenciação de plantas a partir da cultura de calos é uma característica altamente herdável, a qual pode ser analisada por técnicas de genética convencionais.

Programas de melhoramento voltados especialmente para a produção de genótipos favoráveis para regeneração de plantas tem sido reportados para várias espécies vegetais, sendo que a introgressão do gene que confere esta característica para linhagens cultivadas de tomate tem demonstrado resultados promissores (Koorneef et al, 1987).

Os objetivos do presente trabalho são:

- Avaliar a capacidade de regeneração de plantas em alguns genótipos de tomate (Lycopersicon esculentum) comerciais nacionais de uso mais difundido.
- Avaliar a capacidade de regeneração de plantas em algumas espécies selvagens (L. pimpinellifolium, L. hirsutum e L. esculentum var. cerasiforme), as quais não apresentam problemas de incompatibilidade embrião/endosperma com a espécie cultivada L. esculentum.
- Avaliar a capacidade de regeneração em híbridos inter-específicos e seus retrocruzamentos
- Estudar a base genética da regeneração de plantas "in vitro",

estabelecendo um modelo para herança desta característica .

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfogênese de tomate "in vitro"

A regeneração de plantas a partir da cultura de calos de tomate foi descrita pela primeira vez por Norton & Boll(1954). No entanto essa espécie é considerada em muitos laboratórios como recalcitrante para a diferenciação de plantas quando comparada com outras espécies de Solanaceas como por exemplo Nicotiana tabacum (Herman & Hass, 1978).

A regeneração de plantas a partir de calos de tomate geralmente ocorre via organogênese(Greer & Tabaeizadeh, 1991), no entanto Zapata & Sink (1981) reportaram a ocorrência de embriogênese somática a partir de protoplastos derivados de calos de L. peruvianum .

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 de tomate descritos por Monacelli et al (1988) deve envolver um grupo de células iniciais.

As maiores dificuldades encontradas em cultura de tecidos de tomate, de acordo com Kut et al (1984) são: controle da regeneração de plantas de cultura de células, estabelecimento da cultura de células em suspensão com número cromossômico estável, recuperação de plantas a partir de protoplastos isolados e obtenção de plantas haplóides por meio da cultura de anteras.

A regeneração de plantas em cultura de tecidos e células é determinada por muitos fatores como o tipo de explante, genótipo da

planta, composição do meio de cultura e condições de cultura(Handro & Floh, 1990).

O meio básico frequentemente usado para indução de calos e regeneração de plantas de tomate 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 a indução de calos e regeneração de plantas.

A estrutura química da auxina exerce também um papel importante no processo organogenético(Branca et al, 1990). Esses autores concluíram pelo estudo comparativo de duas auxinas sintéticas, benzisoxazole (BOA) e benzisothiazole (BIA), que a primeira foi particularmente eficiente na formação de brotos, enquanto a segunda foi mais eficiente na indução de alongamento celular.

De acordo com Garcia-Reina & Luque (1988), o aumento da concentração de 6-benziladenina (BAP)de 2mg para 5 mg/l propiciou um aumento na diferenciação de plantas, reforçando o conceito descrito previamente que BAP é um fitorregulador eficiente para a diferenciação de plantas a partir da cultura de calos em Lycopersicon (Behki & Lesley, 1980; Frankenberger et al, 1981a).

Por outro lado Behki & Lesley (1976) constataram que zeatina em combinação com NAA resultou na indução de um maior número de calos organogenéticos do que quando utilizado BAP.

A especificidade para auxinas e citocininas pode ser explicada pelos diferentes níveis de degradação dessa substâncias no tecido e no meio de cultura, ou por diferente aptidão das células para utilização e adaptação a esses fitorreguladores (Ohki et al, 1978).

É evidente que o balanço auxina e citocinina exercem um papel fundamental na diferenciação de plantas(Lazzeri et al, 1987), no entanto outros elementos básicos do meio 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 de tomate.

Em cultura de células de batata foi analisada a estabilidade e a utilização de componentes do meio de cultura, sendo constatado que ácido nicotínico e piridoxina foram completamente removidos do meio em 4 dias e toda a concentração de tiamina foi utilizada em 6 dias de cultura(Hagen et al, 1991).

O tipo e o estágio de desenvolvimento do tecido utilizado como fonte de explante alteram também a expressão de morfogênese de um determinado genótipo (Ohki et al, 1978; Frankenberger et al, 1981a; Matos & Cordeiro, 1988). Os explantes usualmente usados nos experimentos de cultura de tecidos de tomate com resultados favoráveis para a regeneração de plantas são disco foliar (Padmanabhan, 1974; Kartha et al, 1976; Pence & Caruso, 1984) e hipocótilos de plantas germinadas "in vitro"(Zelcer et al, 1984; Bulk et al, 1990).

A fonte de explante além de influenciar na resposta morfogênica, pode alterar a frequência de variantes somaclonais(Bulk et al, 1990) . Esses autores verificaram que houve uma correlação entre a porcentagem de células poliplóides presentes no explante e na frequência de plantas regeneradas com alteração no número cromossômico, constatando que mais de 50% dos regenerantes derivados de explantes de hipocótilos eram poliplóides.

Diferenças genotípicas para habilidade de formação de calos e regeneração de plantas tem sido reportadas com frequência em tomate(Torres & Romano,1987; Illg & Siqueira, 1984; Zelcer et al, 1984) e para muitas outras espécies vegetais como milho(Tomes & Smith, 1985; Prioli & Silva, 1989), arroz(Abe & Futsuhara, 1986), trevo(Bhojwani et al, 1984)e batata doce(Templeton-Somers & Collins, 1986).

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 tomate comestível (L. esculentum) são muito específicas, enquanto as exigências das células da espécie selvagem (L. peruvianum) são menores.

O tomate(L. esculentum) é considerado uma espécie particularmente sensível a variações tanto nos componentes do meio de cultura como ambientais para diferenciação de plantas "in vitro", havendo portanto dificuldade na repetibilidade de resultados descritos na literatura(Bellini et al, 1990). Para citar um exemplo dessa sensibilidade, Frankenberger et al (1981a) constataram que a capacidade de regeneração de plantas de um determinado genótipo foi geralmente maior em explantes de sementes crescidos "in vitro" do que em explantes de plantas crescidas em casa de vegetação.

Em algumas espécies vegetais como Nicotiana tabacum (Handro & Floh, 1990) e Kalanchoe blossfeldiana(Born, 1987) a neoformação de gemas vegetativas em calos pode ocorrer em baixas intensidades luminosas ou mesmo no escuro, no entanto Behki e Lesley (1980), demonstraram que calos de tomate induzidos no escuro não resultaram diferenciação de plantas em nenhum dos meios de cultura analisados.

Esses autores concluíram que a indução e a manutenção dos calos na presença de luz parece ser necessária para a subsequente resposta morfogênética.

A baixa frequência de regeneração apresentada por algumas espécies pode estar associada com a produção de etileno pelas células ou tecidos. Em cultura de calos de *Brassica campestris* ssp foi observado que a adição de inibidores de etileno no meio de cultura (AgNO_3 - Ag_2SO_4) propiciaram uma alta frequência de diferenciação de plantas (Chi & Pua, 1989).

É muito frequente após alguns meses de cultura, os calos apresentarem-se com coloração escura. De acordo com Cappadocia & Ramulu (1980), a senescência de calos de tomate pode ser revertida com o correto ajustamento da composição do meio de cultura. Esses autores verificaram que meio de cultura contendo água de côco(20% v/v), BAP (0,05mg/l) e na ausência de auxina, foi capaz de restaurar a capacidade de regeneração de plantas de calos de longa duração.

Finalmente pode concluir-se que a indução de calos organogênicos em alta frequência é resultado da interação de vários fatores como: meio de cultura, genótipo, tipo de explante, idade ontológica do tecido e das condições ambientais(pH, temperatura, umidade, luz, etc).

2.2 Análise genética da regeneração de plantas em tomate

A diferenciação de plantas a partir da cultura de calos de tomate tem sido reportada como uma característica dominante e que pode ser analisada pelos métodos clássicos de genética (Tabela 1).

Tabela 1. Alguns relatos sobre o controle genético da regeneração de plantas em tomate

Referências*	Tipo de herança	Dominância/ Recessividade	Efeito Cito-plasmático	Heterose
(1)	-	-	Sim	Sim
(2)	Qualitativa	Dominância e recessividade	Não	Não
(3)	-	Dominância	-	-
(4)	-	"	-	-
(5)	-	"	-	-
(6)	-	"	Sim	Não
(7)	Qualitativa	"	Não	Não
(8)	-	"	-	-

* Referências: (1) Ohki et al, 1978; (2) Frankenberger et al, 1981b; (3) Kut & Evans, 1982; (4) Adams & Quiros, 1985; (5) Koornneef et al, 1986; (6) Tan et al, 1987; (7) Koornneef et al, 1987; (8) Wijbrandi et al 1988.

De acordo com a análise dialélica para a regeneração de plantas de genótipos selecionados de tomate descritas por Frankenberger et al (1981b), foi demonstrado que houve uma alta herdabilidade para regeneração de plantas ($h^2 = 0,98$), sugerindo portanto um modelo de herança qualitativa para esta característica. Uma faixa da variabilidade na capacidade de diferenciação de plantas atribuiu-se à ação de genes aditivos, enquanto que a alta capacidade de regeneração pode estar associada com a presença de genes dominantes ou recessivos.

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 para 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 de L. peruvianum apresentar melhor resposta de regeneração quando comparado com L. esculentum havia sido descrito previamente tanto para cultura de calos (Morgan & Cocking, 1982; Locky, 1983) como para protoplastos (Zapata et al, 1977; Muhlbach, 1980; Thomas & Pratt, 1981).

Koornneef et al (1986), obtiveram um genótipo superior para diferenciação 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 por Agrobacterium tumefaciens, como também na

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 as variedades comerciais, dificultado deste modo a recuperação das características agrônômicas do fruto.

Mais recentemente, a transferência da característica regeneração de plantas de espécies selvagens para o tomate cultivado foi sugerida por Wijbrandi et al (1988), através da fusão de protoplastos de L. peruvianum e L. esculentum. Os híbridos somáticos 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 bandas adicionais.

2.3 Análise genética da regeneração de plantas em outras espécies

A análise genética da regeneração tem sido abordada como tema de estudo para outras culturas de importância econômica como alfafa, milho e trigo, por exemplo (Tabela 2).

Tabela 2. Alguns relatos sobre o controle genético da regeneração de plantas em outras espécies

Referências *	Cultura	Tipo Herança	Dominância/ Recessividade	Efeito Cito- plasmático	Hete- rose
(1)	Alfafa (<i>Medicago sativa</i>)	Qualitativa	Dominância	-	-
(2)	"	"	"	Sim	-
(3)	"	-	"	-	-
(4)	Milho (<i>Zea mays</i>)	-	-	Sim	Sim
(5)	"	-	Dominância	-	-
(6)	"	Qualitativa	Dominância, Recessividade	Não	-
(7)	"	"	Dominância	Sim	Sim
(8)	Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	-	-	"	-
(9)	"	Poligênica	-	-	-
(10)	"	Qualitativa	-	-	-
(11)	"	-	Dominância	-	-
(12)	"	-	"	Sim	-

* Referências: (1)Reish & Bingham, 1980; (2)Wan et al, 1988; (3)SeitzKris & Bingham, 1988; (4) Tomes & Smith, 1985; (5)Hodges et al, 1986; (6) Prioli, 1987; (7) Novak et al, 1988, (8) Lazar et al, 1984; (9)Galiba et al, 1986; (10)Higgins & Mathias, 1987;(11)Kaleikau et al, 1989;(12)Ou et al, 1989.

Em alfafa diplóide, Reish & Bingham(1980) concluíram que a diferenciação de plantas a partir de calos foi controlada por dois genes dominantes que foram denominados Rn1 e Rn2, sendo que a eficiência na capacidade de regenerar plantas foi dependente do número de alelos dominantes para esses dois "loci" gênicos. Wan et al (1988) estudaram a capacidade de regeneração de alfafa tetraplóide constatando também que a dosagem do gene influenciou a eficiência de regeneração.

O efeito do genótipo parental na iniciação de calos embriogênicos de germoplasma elite de milho foi demonstrado por Tomes & Smith (1985). Resultados apresentados posteriormente por Prioli (1987) mostraram que existe um controle genético para indução de calos embriogênicos em milho. Essa autora concluiu que a característica apresenta herança bastante simples, aparentemente condicionada por dois locos independentes com interação e por mais um terceiro loco que estaria envolvido em um processo de inibição da expressão dos genes que condicionam a embriogênese somática.

A possibilidade da ação de genes citoplasmáticos em adição a genes nucleares foi observada em alfafa(Wan et al, 1988), milho(Tomes & Smith, 1985; Novak et al, 1988) e trigo(Lazar et al, 1984; Ou et al, 1989).

Apesar da maioria dos estudos da genética da regeneração indicarem uma herança qualitativa para esta característica (Tabelas 1 e 2), Galiba et al (1986) demonstraram que a regeneração de plantas em trigo pode envolver um sistema poligênico. De acordo com esses autores , genes controlando a capacidade para regeneração de plantas estão primariamente

localizados nos cromossomos 7B, 7D e 1D, embora a possibilidade do efeito de outros cromossomos não pudesse ser excluída.

A transferência de genes de regeneração para germoplasmas elite via cruzamentos tem sido sugerida em alfafa (Bingham et al, 1975; Wan et al, 1988), milho (Prioli, 1987; Novak et al, 1988), trigo (Bullock et al, 1982; Lazar et al, 1984) e trevo (Bhojwani et al, 1984).

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.

De acordo com Wan et al (1988), 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.

2.4. Relações de compatibilidade entre algumas espécies do tomate

Segundo Warnock (1988), baseado na classificação de Muller, o gênero Lycopersicon possui dois subgêneros:



- Eulycopersicon: correspondente às espécies L. esculentum (tomate cultivado) e L. pimpinellifolium, ambos os frutos avermelhados quando maduros.

- Eriopersicon: compreendendo as espécies L. chilense, L. peruvianum, L. hirsutum, L. glandulosum, L. persissi e L. cheesemanii, de frutos verdes e arroxeados quando maduros.

Não existem barreiras nos cruzamentos entre L. pimpinellifolium e L. esculentum, facilitando deste modo a introgressão de genes entre

essas duas espécies (Rick, 1978). Por outro lado, de acordo com os estudos de Hogenboom (1972a, b, c, d, e) as espécies L. peruvianum e L. chilense apresentam sistemas de incompatibilidade nos cruzamentos interespecíficos com o tomate cultivado L. esculentum. (Tabela 3).

Tabela 3. Relações de compatibilidade no gênero Lycopersicon (Hogenboom, 1972)

 / 	<u>L. escu-</u> <u>lentum</u>	<u>L. pimpi-</u> <u>nellifolium</u>	<u>L. minu-</u> <u>tum</u>	<u>L. hir-</u> <u>sutum</u>	<u>L. chi-</u> <u>lense</u>	<u>L. peru-</u> <u>vianum</u>
<u>L. esc.</u>	+	+	+	+	AE	AE
<u>L. pim.</u>	+	+	+	+	AE	AE
<u>L. min.</u>	+,IU,AE	+,IU	+	AE	AE	AE
<u>L. hir.</u>	+,IU	+,IU	+,IU	+,AI,IU	?	AE
<u>L. chi.</u>	IU	IU	IU	?	AI	AE
<u>L. peruv.</u>	IU	IU	IU	IU	AE	AI

Legenda: + = sem barreira séria; AI = auto-incompatibilidade

IU = incompatibilidade unilateral; AE = aborto do embrião;

? = sem resultados conhecidos

O tomate (L. esculentum) é um exemplo típico de planta cultivada que foi beneficiada com a introgressão experimental de germoplasma de espécies selvagens, 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 o 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 a revisão de literatura apresentada por Rick (1982) com respeito ao potencial do germoplasma exótico no melhoramento do tomateiro são citadas algumas prováveis fontes de resistência e características desejáveis presentes nessas espécies:

- L. hirsutum: resistência a insetos e a baixas temperaturas;
- L. pimpinellifolium: resistência a murcha de Stemphiliium solani, murcha de fusarium raça 1, altas temperaturas e a característica pigmentação;
- L. cheesmanii: resistência a salinidade;
- L. peruvianum: resistência a nematóides, vírus do vira-cabeça e fungo Verticilium;
- L. esculentum cerasiforme: resistência à seca;
- L. chmielewskii: alta concentração de sólidos solúveis.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Germoplasma

Os genótipos selvagens e cultivados do gênero Lycopersicon analisados quanto a capacidade de regeneração de plantas "in vitro" estão descritos na Tabela 4 .

TABELA 4 . Genótipos selvagens e cultivados de tomate (L. esculentum) avaliados quanto à capacidade de regeneração de plantas "in vitro"

Genótipo	Espécie	Coloração Fruto	Porte	Procedência
LA444/1	<u>L. peruvianum</u>	verde	Indeterminado	IAC**
CNPH-402	"	"	"	CNPH***
PI126449	<u>L. hirsutum</u>	"	"	IAC
PI365904	"	"	"	"
WV-700	<u>L. pimpinellifolium</u>	vermelho	"	"
WV-106	"	"	"	"
CNPH-382	"	"	"	CNPH
CNPH-80	<u>L. esc.</u> Var.cerasiforme*	"	"	"
Red Cherry	"	"	"	IAC
Chiguara	"	"	"	"
Santa Clara	<u>L. esculentum</u>	"	"	"
Angela	"	"	"	"
Santa Rita	"	"	"	"
VFN-8	"	"	Determinado	"
Petomech	"	"	"	"
Rio Grande	"	"	"	"
CS8064	"	"	"	"

* Provável ancestral do tomate comercial L. esculentum (Rick, 1978)

** Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas

*** Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças - EMBRAPA

3.2 Multiplicação de sementes de tomate em campo e em casa de vegetação

Tendo em vista a necessidade da multiplicação de sementes dos genótipos selvagens e comerciais (Tabela 4), procedeu-se ao plantio das sementes em condições de campo e estufa na Área Experimental do Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais do Departamento de Genética da Universidade Estadual de Campinas, no período de Fevereiro de 1989 a Março de 1990.

A produção de mudas foi realizada com a sementeira de 5 sementes por copo plástico com 10 cm de altura (capacidade 500g), totalizando 6 copos para cada genótipo. Após a germinação foi realizado um desbaste deixando-se apenas duas plantas por copo plástico.

O transplante das mudas para o campo, o espaçamento, as adubações e as pulverizações com fungicidas e inseticidas foram realizadas de acordo com as recomendações técnicas para a cultura (Nagai, 1987).

As espécies selvagens que apresentam problemas de auto-incompatibilidade (L. peruvianum, L. chilense e L. hirsutum) de acordo com os estudos realizados por Hogenboom (1972a, b, c, d, e), foram polinizadas manualmente através da transferência de pólen de uma planta para outra.

A colheita dos frutos foi feita quando estes apresentaram-se maduros. Procedeu-se a fermentação das sementes por um período de 72 horas em vasilhame plástico a uma temperatura média de 21° C, com a finalidade de facilitar a separação das sementes das outras partes do fruto. Esse tratamento de acordo com Silva & Casali (1980), também constitui um eficiente método para o controle do cancro bacteriano.

Com a utilização de uma peneira e com auxílio de água foi feita a separação das sementes da polpa dos frutos. As sementes foram colocadas sobre papel de filtro para secagem, sendo posteriormente tratadas com fungicida (PCNB) e armazenadas em embalagem permeável em geladeira.

3.3 Indução de calos e regeneração de plantas de tomate

3.3.1 Estabelecimento do protocolo para indução de calos e regeneração de plantas

A definição do explante, meio de cultura e a concentração de fitorreguladores para as fases de indução de calos e regeneração de plantas foram estabelecidas de acordo com a metodologia revista e conforme os resultados de experimentos realizados previamente.

3.3.2 Obtenção de explantes

Os explantes utilizados em todos os experimentos foram segmentos de hipocótilos com 5mm de comprimento, de sementes germinadas "in vitro", já que na literatura existem vários trabalhos mostrando que esse tecido é favorável para indução de calos e regeneração de plantas de tomate (Gunay & Rao, 1980; Zelcer et al, 1984; Torres & Romano, 1987; Bulk et al, 1990).

A assepsia das sementes para obtenção dos explantes de hipocótilos foi feita através de esterilização superficial com solução aquosa de hipoclorito de sódio comercial com 2,5% de cloro ativo (Qboa) a 33% v/v, sob agitação por um período de 20 minutos. Em seguida foram

realizadas diversas lavagens em água autoclavada na câmara de fluxo laminar e 15 sementes foram dispostas em cada placa de petri contendo 20 ml de meio de germinação. As placas de petri foram vedadas com filme PVC 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 $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Estas condições de luz e temperatura são mantidas para todos os próximos experimentos.

3.3.3 Meios de cultura

3.3.3.1 Meio para germinação de sementes(MS-G)

Para o meio de cultura foram utilizados os sais de Murashige & Skoog(1962), com a metade da concentração dos macronutrientes e ausência de sacarose e mio-inositol. O pH foi ajustado para 5.6 antes da adição do agar(7g/l) com gotas de KOH(0.5M) ou HCl(1N). O meio foi autoclavado a 120°C , 1 atm por 20 minutos e em seguida 20 ml foram distribuídos por placa de petri em câmara de fluxo laminar. O ajuste do pH e a distribuição do meio de cultura em placas de petri são mantidos em todos os experimentos.

3.3.3.2 Meio para indução de calos(MS-I)

Para o meio de cultura foram utilizados os sais de MS com a metade da concentração dos macronutrientes, acrescido de mio-inositol (100mg/l), sacarose (20g/l), tiamina (10mg/l), piridoxina (1mg/l), caseína hidrolizada (0.5mg/l), agar (7g/l) e suplementado com a seguinte combinação de fitorreguladores: ácido 3-indolilacético (AIA)

1mg/l e 6-benzilaminopuriana (BAP) 2.25mg/l, de acordo com Illg & Siqueira (1984). Os explantes foram mantidos nesse meio por um período de 15 dias.

3.3.3.3 Meio para regeneração de plantas(MS-R)

Foram utilizados os sais de MS como descrito para a fase de indução de calos e a concentração de fitorreguladores empregada foi a descrita por Garcia-Reina & Luque (1988): ácido 3-indolilacético (AIA) 0,5 mg/l e 6-benzilaminopurina (BAP) 5,0 mg/l. Os calos foram mantidos no meio de regeneração por dois períodos de 30 dias, com a renovação do meio entre cada período.

3.3.3.4 Meio para crescimento dos plantlets (MS-C)

O meio utilizado foi o mesmo descrito para a indução de calos(MS-I), porém sem fitorreguladores. Os calos foram mantidos no meio de crescimento dos "plantlets" por um período de 30 dias.

3.3.4 Procedimento para indução de calos

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

3.3.5 Procedimento para regeneração de plantas

Calos uniformes de cada grupo de 80, provenientes do meio de

indução foram transferidos para placa de petri contendo o meio de regeneração (MS-R), perfazendo um total de 3 repetições com 20 calos cada. O cultivo no meio de regeneração de plantas foi de 2 períodos de 30 dias cada, com renovação do meio entre cada período. Decorridos os dois períodos, os calos foram transferidos para o meio de crescimento dos "plantlets"(MS-C) onde permaneceram por mais 30 dias.

Os calos foram avaliados quanto à capacidade de regenerar plantas aos 30, 60 e 90 dias de cultura após a primeira transferência para o meio MS-R.

A frequência de calos que regeneraram plantas foi obtida pela contagem do número de calos que emitiram pelo menos uma planta completa (com eixo caulinar e meristema apical)após 105 dias do início da cultura.(FIGURA 1)

3.3.6 Avaliação da capacidade de regeneração de plantas a partir de calos de genótipos selvagens e cultivados de tomate

Os genótipos selvagens de L. pimpinellifolium (WV-700, WV-106 e CNPH-382); de L. peruvianum (LA444/1, CNPH-402); de L. hirsutum (PI-126449, PI-365904); de L. esculentum var. cerasiforme(CNPH-80, Red Cherry, Chiguara), além de sete variedades comerciais de tomate L. esculentum (Santa Clara, Angela G-5100, Santa Rita, VFN-8, CS8064, Petomech e Rio Grande) da Coleção de Espécies e Variedades do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Genética(UNICAMP), foram avaliados quanto à capacidade de regeneração de plantas "in vitro" a partir de calos, com o objetivo de selecionar

genótipos contrastantes para esta característica.



Figura 1.

Calo organogénético do genótipo Petomech (*L. esculentum*). Diferenciação de planta com eixo caulinar e meristema apical (A) e diferenciação de folhas (B) aos 60 dias de cultura.

Meio MS-R: MS + BAP 5,0mg/l + AIA 0,5mg/l

3.4 Herança da capacidade de regeneração "in vitro"

3.4.1 Famílias de cruzamento

O controle genético da capacidade de regeneração de plantas a partir da cultura de calos de tomate foi estudado em 5 conjuntos familiares envolvendo o genótipo selvagem WV-700 (L. pimpinellifolium) que nos experimentos previamente realizados (item 3.3.6) apresentou uma alta capacidade para regeneração de plantas e cinco genótipos de L. esculentum (VFN-8, Petomech, Santa Rita, CNPH-80 e Santa Rita) que apresentaram uma baixa capacidade para regeneração de plantas nas condições de cultivo pré-estabelecidas.

Esses cinco genótipos apresentam também características distintas quanto ao grupo (Caqui, Quadrado e Santa Cruz) e ao hábito de crescimento (determinado/indeterminado), permitindo deste modo verificar se essas diferenças estão relacionadas com a expressividade do gene da regeneração (Tabela 5).

O genótipo selvagem WV-700 (L. pimpinellifolium) possui: hábito de crescimento indeterminado e frutos vermelhos, com diâmetro médio de 2cm e sabor agradável.

TABELA 5 . Descrição do grupo, tipo de crescimento e utilização comercial dos genótipos que não regeneraram plantas e que foram utilizados para estudo da genética da regeneração

Genótipo	Grupo	Tipo crescimento	Utilização comercial
VFN-8	Caqui	Determinado	Consumo "in natura" nacional
Santa Rita	Santa Cruz	Indeterminado	Consumo "in natura" nacional
Petomech	Quadrado	Determinado	Indústria
CNPH- 80	Cereja	Indeterminado	Consumo "in natura" internacional
Red Cherry	Cereja	Indeterminado	Consumo "in natura" internacional

Na Tabela 6 estão representados os conjuntos familiares que foram analisados quanto a capacidade de regenerar plantas.

TABELA 6. Progênes derivadas dos cruzamentos de genótipos que regeneram (R) e não regeneram plantas(NR) utilizadas para o estudo da análise genética da regeneração

Genótipos		Gerações		
Regenera	Não regeneram	F ₁	F ₂	BC
Plantas (R)	Plantas (NR)	(♂)x(♀)		(♂)x(♀)
(<u>L.pimpinellifolium</u>)	(<u>L. esculentum</u>)			
WV-700	VFN-8	WV-700xVFN-8	F ₁ (x)*	F ₁ xVFN-8
	Petomech	WV-700xPetomech	F ₁ (x)	F ₁ xPetomech
	Santa Rita	WV-700xS. Rita	F ₁ (x)	F ₁ xS. Rita
		S. RitaxWV-700		
	CNPH-80	WV-700xCNPH-80	F ₁ (x)	F ₁ xCNPH-80
	Red Cherry	WV-700xR. Cherry	F ₁ (x)	F ₁ xR. Cherry
		Red CherryxWV-700		

* O sinal (x) indica progênie obtida por autofecundação

3.4.2 Obtenção das progênies híbridas F_1 dos genótipos que apresentaram resultados contrastantes para a capacidade de regenerar plantas

O genótipo WV-700(L. pimpinellifolium) com alta capacidade para regeneração de plantas utilizado como doador de pólen foi cruzado com os genótipos de L. esculentum recalcitrantes para esta característica: VFN-8, Petomech, Santa Rita, além de dois genótipos da var. cerasiforme: CNPH-80 e Red Cherry para a produção dos híbridos F_1 . Procedeu-se também o cruzamento recíproco dos genótipos Santa Rita e Red Cherry para verificar a ocorrência de provável efeito materno e/ou citoplasmático para a característica regeneração de plantas.

O genótipo selvagem WV-700 (L. pimpinellifolium) não apresenta problemas de incompatibilidade com as linhagens de L. esculentum (Hogenboom, 1972a; Rick, 1982; Warnock, 1988), e portanto não houve a necessidade da cultura de embriões imaturos para a obtenção dos híbridos inter-específicos.

Foram cultivadas em casa de vegetação 10 plantas de cada genótipo, que fizeram parte das famílias de cruzamento para a realização das hibridizações em ambiente controlado.

Com auxílio de um aparelho vibrador foi coletado pólen de flores abertas, em vidros de relógio de 5 cm de diâmetro, o qual, foi armazenado em geladeira a uma temperatura de 8-10°C. O pólen foi, então, utilizado por um período máximo de uma semana.

Flôres prestes a se abrirem de cada uma das plantas dos germoplasmas de L. esculentum foram emasculadas com auxílio de uma

pinça e os estigmas polinizados com pólem do genótipo WV-700. A polinização foi repetida novamente 8 horas após a emasculação. Finalmente, as flôres polinizadas foram marcadas com lãs de diferentes cores para identificação dos frutos originados pelos cruzamentos.

3.4.3 Obtenção das progênies híbridas F_2 e retrocruzamentos com os genótipos com baixa capacidade para regeneração de plantas

Os híbridos F_1 foram cultivados em casa de vegetação para produção por autofecundação da geração F_2 e através de cruzamentos artificiais, foram realizados os retrocruzamentos com os genótipos com baixa capacidade para regeneração de plantas (< 10%).

A metodologia utilizada para a realização dos retrocruzamentos foi a mesma que a descrita para a obtenção dos híbridos F_1 .

3.4.4 Indução de calos e regeneração de plantas dos híbridos F_1 e dos cruzamentos recíprocos

Explantes de hipocótilos, provenientes de uma amostra de 6 frutos de cada híbrido F_1 , foram cultivados no meio de indução de calos (MS-I) e posteriormente transferidos para o meio de regeneração de plantas (MS-R). A composição dos meios MS-I e MS-R foi descrita anteriormente.

Após 75 dias de cultura os calos foram transferidos para o meio MS modificado com apenas a metade da concentração dos macronutrientes e na ausência de fitorreguladores (MS-C), por mais 30 dias, para que houvesse a alongação das gemas e conseqüente crescimento dos

"plantlets".

Em cada placa de petri foram inoculados 20 explantes e o número total de calos analisados para cada genótipo está descrito nas Tabelas 9 a 13 (pág. 50-54).

A cada de 30, 60 e 90 dias as culturas foram avaliadas quanto a porcentagem de calos organogénéticos e aos 90 dias de cultura foi avaliada a frequência de regeneração, ou seja, o número de "plantlets" por calo.

3.4.5 Indução de calos e regeneração de plantas das gerações F_2 e dos retrocruzamentos com os genótipos com baixa capacidade para regeneração de plantas

Os procedimentos realizados nessa fase foram os mesmos que os descritos no item anterior, porém para a análise da segregação na geração F_2 e retrocruzamentos, as sementes provenientes de cada fruto foram analisadas separadamente. Dois frutos de cada progênie foram selecionados aleatoriamente e tiveram todas as suas sementes germinadas "in vitro" para a obtenção dos explantes hipocotiledonares. De cada hipocótilo, foram cultivados 5 explantes no meio de indução de calos. Após a fase de indução de calos foram selecionados os 3 explantes que resultaram calos mais uniformes. Estes foram transferidos para o meio de regeneração de plantas de modo a obter-se 3 repetições de cada semente. Em cada placa de petri foram inoculados 20 explantes e o

número total de calos analisados para cada genótipo está descrito nas Tabelas 9 a 13 (pág. 50-54).

As condições de cultura e os intervalos de avaliação foram os mesmos que os empregados para os genótipos parentais e para os híbridos F_1 .

A análise genética foi realizada usando o Teste de Qui-Quadrado (X^2) para modelos de segregação conhecidos para um e dois locos nas gerações F_2 e retrocruzamentos, pois na literatura existem vários trabalhos indicando que a capacidade de regeneração de plantas é uma característica qualitativa (Reish & Bingham, 1980; Prioli, 1987; Novak et al, 1988; Wan et al, 1988) e que apresenta uma alta herdabilidade (Frankenberger et al, 1981b, Lazar et al, 1984; Koornneef et al, 1987).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Multiplicação de sementes de tomate no campo e em casa de vegetação

A multiplicação de sementes na área experimental do Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais do Departamento de Genética(UNICAMP) resultou na produção de sementes de boa qualidade e com alto poder germinativo(95-98%) de genótipos selvagens e comerciais fornecidos pelos centros e institutos de pesquisa em hortaliças já mencionados.

A transferência de pólen manualmente de uma planta para outra resultou na formação de frutos com uma grande quantidade de sementes nas espécies com problemas de auto-incompatibilidade(L. peruvianum, L. chilense e L. hirsutum).

A colheita dos frutos somente quando maduros e a subsequente fermentação das sementes por um período de 72h facilitou a separação das sementes das outras partes do fruto.

4.2. Estabelecimento do protocolo para indução de calos e regeneração de plantas de tomate

4.2.1 Germinação de sementes

As sementes germinaram de forma homogênea num intervalo de 3-5 dias e foi notado que a germinação na presença de luz,propiciou o crescimento de hipocótilos mais vigorosos do que as sementes germinadas

no escuro, de modo a optar-se pela utilização das sementes germinadas na luz..

4.2.2. Obtenção de explantes

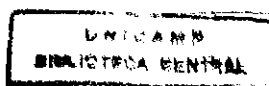
O uso de hipocótilos como fonte de explantes para a indução de calos e regeneração de plantas mostrou-se favorável de modo a possibilitar uma grande uniformidade na realização dos experimentos.

A frequência de contaminação das sementes por fungos e bactérias durante a fase de germinação para obtenção dos explantes de hipocótilo foi inferior a 5% para todos genótipos testados. Este fato pode ser atribuído à utilização de sementes provenientes de plantas em ótimo estado fitossanitário, conjuntamente ao tratamento de esterilização superficial das sementes com solução 33,3% v/v de água sanitária comercial (Q-Boa - 2,5% de cloro ativo).

4.2.3 Indução de calos

A secção dos hipocótilos com auxílio de uma tesoura mostrou-se adequada, tornando-se possível cortar um grande número de explantes de tamanho uniforme e num curto intervalo de tempo, sem ocasionar a desidratação dos hipocótilos devido ao calor da chama e a ventilação da câmara de fluxo laminar. Cada hipocótilo resultou em média 5 explantes de aproximadamente 5mm depois da retirada da região próxima ao cotilédone e à raiz.

O meio MS suplementado com AIA(1 mg/l) e BAP(2,25mg/l) mostrou-se adequado para a indução de calos para todos os genótipos



analisados. 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.

4.2.4 Regeneração de plantas

O cultivo no meio de regeneração de plantas em 2 períodos de 4 semanas cada, e a subsequente transferência dos calos para meio sem fitorreguladores, propiciou o crescimento dos "plantlets" possibilitando, deste, modo a determinação da porcentagem de calos organogênicos e a frequência do número de plantas por calo a olho nú.

A frequência de regeneração de plantas foi variável de acordo com o genótipo analisado. A concentração de fitorreguladores utilizada AIA (0.5mg/l) e BAP (5mg/l) induziu uma alta frequência de diferenciação de plantas para determinados genótipos, enquanto outros genótipos não apresentaram nenhum indício de organogênese. Os resultados das avaliações da capacidade de regeneração de plantas de genótipos selvagens e comerciais de tomate serão mais detalhadamente abordados no item 4.2.5 .

A ocorrência de rizogênese na concentração de fitorreguladores empregada, foi praticamente nula para os genótipos analisados, facilitando deste modo o subcultivo dos calos a cada período 30 dias

como estabelecido previamente.

A transferência dos calos do meio de regeneração de plantas para meio de crescimento dos "plantlets" após 60 dias de cultivo foi essencial para a distinção da frequência de calos que efetivamente diferenciaram plantas com eixo caulinar e meristema apical, dos calos que apenas apresentaram diferenciação de órgãos como folhas (normais ou anormais), as quais via de regra não originam plântulas completas quando transferidas para o meio de enraizamento. (Gavazzi et al, 1987).

4.2.5 Avaliação da capacidade de regeneração de plantas de genótipos selvagens e cultivados de tomate

Diferenças significativas na diferenciação de plantas a partir de calos originados a partir de explantes de hipocótilo foi notada para os 17 genótipos testados.

Houve variação na frequência de regeneração de "plantlets" dentro de cada espécie, como por exemplo em L. pimpinellifolium, onde foram constatadas frequências que variaram de 0% (genótipos WV-106 e CNPH- 382) até 92% (genótipo WV-700). Variação semelhante observou-se também para as espécies L. peruvianum, L. hirsutum e L. esculentum (TABELA 7).

TABELA 7. Frequência de indução de calos organogenéticos e de calos que regeneraram "plantlets" em 17 genótipos de diferentes espécies de tomate. Foram avaliados 60 calos de cada genótipo.

Genótipo		calos organogenéticos*	calos regeneraram "plantlets"
		%	%
<u>L. peruvianum</u> :	LA444/1	88	63
	CNPH-402	86	18
<u>L. hirsutum</u> :	PI126449	0	0
	PI365904	17	17
<u>L. pimpinellifolium</u> :	WV-700	95	92
	WV-106	5	0
	CNPH-382	0	0
<u>L. esculentum</u> cerasiforme :	CNPH-80	5	2
	Red Cherry	10	4
	Chiguara	75	28
<u>L. esculentum</u> :	Santa Clara	41	22
	Angela G-5100	38	20
	VFN-8	2	0
	Petomech	15	3
	Rio Grande	27	12
	Santa Rita	9	6
	CS8064	16	6

* Calos organogenéticos : calos com indícios de regeneração de "plantlets" e/ou folhas.

Esta variabilidade intra-específica já foi descrita pioneiramente por Tal et al (1977), os quais demonstraram que a resposta morfogênica de espécies selvagens e cultivadas de tomate sob as mesmas condições de cultura podem variar de um genótipo para outro. A ocorrência deste fenômeno tem sido descrito frequentemente, não apenas em tomate (Muhlbach, 1980; Behki & Lesley, 1980; Kut & Evans, 1982; Illg & Siqueira, 1984; Tan et al, 1987), mas para uma série de outras culturas como milho (Green & Phillips, 1975; Hodges et al 1986, Prioli & Silva, 1989), arroz(Abe & Futsuhara,1986), trigo(Lazar et al, 1984), soja(Parrot et al, 1989), trevo (Bhojwani et al, 1984) e alfafa (Reish & Bingham, 1980).

No presente trabalho, o genótipo selvagem WV-700 de L. pimpinellifolium, apresentou a melhor resposta morfogênica em relação aos demais genótipos silvestres (Figura 2), em contraposição aos resultados descritos por Kut & Evans (1982), os quais, estudando a capacidade de regeneração de 8 genótipos de diferentes espécies de tomate observaram que a máxima frequência de regeneração ocorreu para o genótipo L. chilense, enquanto que L. pimpinellifolium não apresentou bons resultados para esta característica. A divergência desses resultados pode ser atribuída a diferenças nas condições de cultivo e também à variabilidade intra-específica encontrada para a regeneração de plantas dos diferentes genótipos da espécie L. pimpinellifolium constatadas no presente trabalho para os acessos WV-700, WV-106 e CNPH-382.

Os dados da Tabela 7 ainda mostram que embora teoricamente seja possível induzir regeneração em qualquer genótipo, é aparente que

alguns genótipos respondem melhor do que outros para esta característica. Resultados similares foram descritos anteriormente por Tal et al (1977) e Muhlbach (1980) onde foi demonstrado que a regeneração obtida com L. peruvianum não pode ser reproduzida por nenhum cultivar da espécie L. esculentum nos mesmos meios de cultura utilizados.



Figura 2.

Calos organogénicos do genótipo WV-700

(L. pimpinellifolium) com alta capaci-

dade para regeneração de plantas aos

60 dias de cultura.

Meio MS-R: MS + BAP 2,25mg/l + AIA 0,5mg/l

A importância do genótipo em estudos de regeneração tem sido cada vez mais enfatizada e de acordo com os resultados obtidos por Oelck & Schieder (1983), foi sugerido que o efeito do genótipo é maior que a influência do meio de cultura na capacidade de regeneração de plantas em alfafa.

No presente trabalho foi observado que houve a formação de calo para os 17 genótipos analisados, enquanto a regeneração de plantas em alta frequência foi verificada somente para o genótipo WV-700 e L. peruvianum LA444/1, indicando portanto que a indução de calos não está correlacionada com a diferenciação de plantas .

De acordo com os resultados de regeneração em alfafa, Wan et al (1988) concluíram que a produção de calos e a regeneração de plantas a partir de calos são controlados por fatores genéticos distintos.

O fato dos genótipos CNPH402 e Chiguara terem apresentado uma alta frequência de calos organogênicos, porém com uma baixa frequência de calos que regeneraram plantas mostra que muitos dos pontos verdes que formaram-se no início da cultura não resultaram em plantas completas, mas sim na diferenciação de folhas normais e anormais.

A diferenciação frequente de brotos anormais e de folhas em cultura de calos de tomate, já havia sido descrita em dois estudos realizados anteriormente (Gavazzi et al, 1987; Monacelli et al, 1988), demonstrando que os inícios de diferenciação foram muito mais numerosos do que os brotos desenvolvidos e contados a olho nú.

A senescência dos calos foi variável de acordo com os genótipos testados, sendo que os genótipos Angela G-5100, Santa Clara e WV-700

permaneceram verdes até a avaliação final dos experimentos (105 dias de cultura), enquanto os genótipos CNPH-382 e PI126449 começaram a apresentar calos com coloração escura, 45 dias após o início da cultura.

Foi descrita por Meredith (1979) e Koblitz & Koblitz (1982) a manutenção de calos de tomate por longa duração de genótipos específicos e em determinadas condições de cultura sem que houvesse a perda da capacidade de regeneração .

4.3. Herança da capacidade de regeneração "in vitro"

4.3.1 Obtenção das progênes híbridas F_1 dos genótipos que apresentaram resultados contrastantes para a capacidade de regenerar plantas

No presente trabalho está sendo descrito na literatura pela primeira vez a utilização de um genótipo selvagem da espécie L. pimpinellifolium , com alta capacidade para regeneração de plantas, para o estudo do controle genético da regeneração (Figura 3).

Uma das principais vantagens do emprego da espécie L. pimpinellifolium para o estudo do controle genético da regeneração é que esta espécie cruza-se facilmente com as variedades comerciais de L. esculentum, enquanto as espécies L. peruvianum e L. chilense apresentam problemas de incompatibilidade com a espécie L. esculentum, sendo necessário o resgate dos embriões híbridos em F_1 e até em gerações mais avançadas, F_2 e retrocruzamentos (Hogenboom, 1972a).

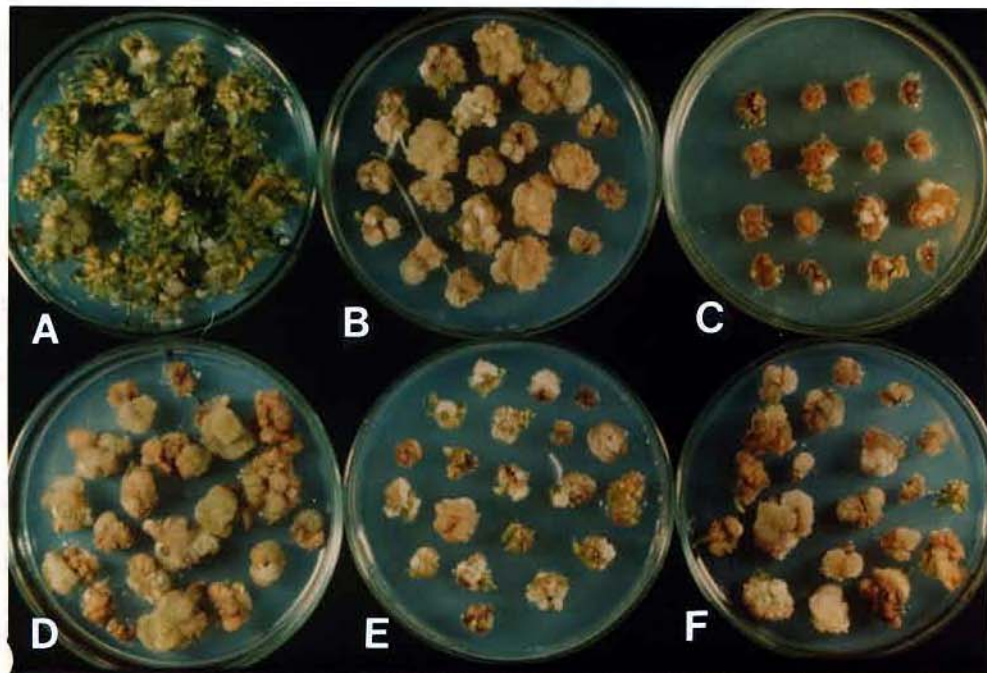


Figura 3. Aspecto morfológico aos 60 dias de cultura dos calos dos 6 genótipos parentais selecionados para o estudo da herança da capacidade de regeneração "in vitro" (A)WV-700, (B)Santa Rita, (C)Petomech (D)VFN-8, (E)Red Cherry , (F)CNPB-80. Meio MS-R: MS + BAP 2,25mg/l + AIA 0,5mg/l

Nos resultados das análises de RFLP descritas por Miller e Tanksley (1990), foi constatado que o nível de DNA polimórfico dos acessos e espécies é altamente correlacionado com o sistema de reprodução e que a espécie L. pimpinellifolium é uma das espécies relatadas mais próxima do tomate cultivado, sugerindo portanto que a variação genética encontrada nesta espécie é facilmente utilizável para o melhoramento do tomate.

No presente trabalho, foi confirmado que não há problemas no pegamento das polinizações realizadas entre a espécie selvagem L. pimpinellifolium, com as variedades comerciais de L. esculentum (Figura 4). Os frutos híbridos tiveram um crescimento normal e as sementes foram produzidas em grande quantidade por não ocorrerem problemas de incompatibilidade no desenvolvimento dos tubos polínicos durante a fecundação (Tabela 8).

A produção de frutos nos cruzamentos recíprocos quando o material WV-700(L. pimpinellifolium) foi utilizado como receptor de pólen foi dificultada, devido às flores apresentarem tamanho menor e por serem mais sensíveis ao toque da mão, durante o processo de emasculação, que os genótipos da espécie L. esculentum.

As sementes híbridas foram colocadas para germinar em placas de petri e foi observada uma frequência de germinação superior a 95% para todos genótipos testados.

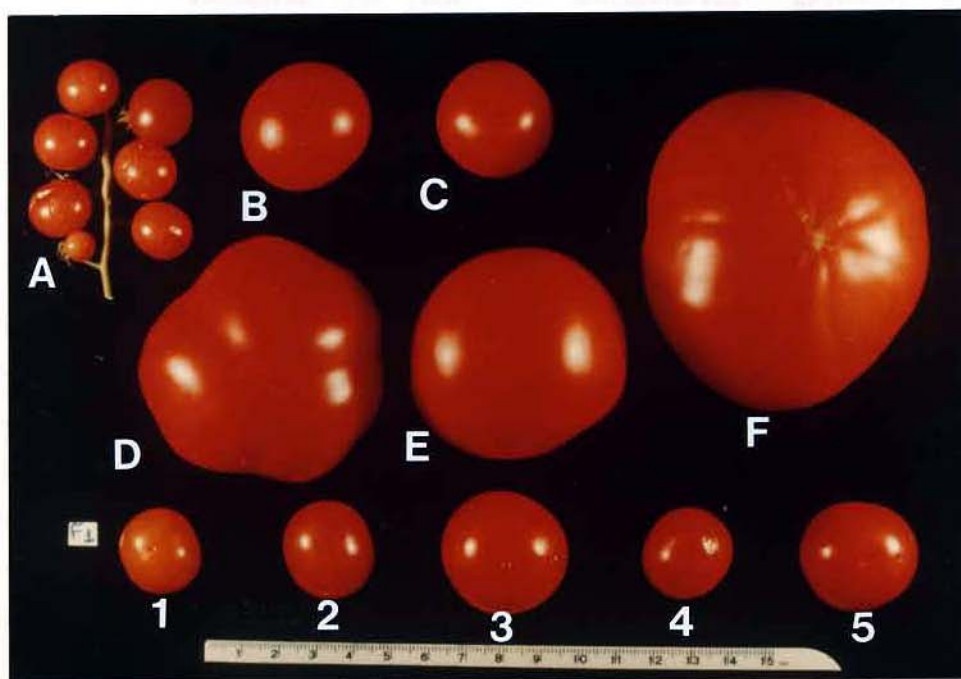


Figura 4. Aspecto morfológico dos frutos dos genótipos parentais e dos respectivos híbridos F_1 . Parentais : (A)WV-700, (B)Red Cherry, (C)CNPH-80, (D)Petomech, (E)Santa Rita e (F)VFN-8.
 F_1 : (1) (A)x(B), (2) (A)x(C), (3) (A)x(D)
 (4) (A)x(E), (5) (A)x(F).

Tabela 8. Número de frutos híbridos e número médio de sementes por fruto dos cruzamentos efetuados para obtenção da geração F_1 .

Cruzamentos σ/O	Nº Frutos	Nº médio de sementes por fruto
WV-700 x VFN-8	25	75
WV-700 x Santa Rita	23	64
WV-700 x Petomech	30	32
WV-700 x Red Cherry	32	51
WV-700 x CNPH- 80	20	33
Santa Rita x WV-700	11	55
Red Cherry x WV-700	9	39

4.3.2 Obtenção das progênes híbridas F_2 e dos retrocruzamentos com os genótipos com baixa capacidade para regeneração de plantas

A produção de frutos na geração F_2 por autofecundação foi abundante, ocorrendo, porém, uma redução média de 10-12 vezes no tamanho dos frutos para os genótipos comerciais Santa Rita, VFN 8 e Petomech .

Os retrocruzamentos com os genótipos recalcitrantes para a característica regeneração de plantas foram bem sucedidos, sendo que as sementes foram produzidas em grande quantidade e com uma alta frequência de germinação(95-98%).

O retrocruzamento com o genótipo do grupo caqui(VFN 8),foi facilitado devido este genótipo apresentar flôres maiores e com estigma mais desenvolvido em relação aos genótipos Petomech, Santa Rita, Red Cherry e CNPH-80, os quais possuem flôres menores e mais sensíveis ao processo de emasculação .

4.3.3 Indução de calos e regeneração de plantas dos híbridos F_1 e dos cruzamentos recíprocos

Foi observada a formação de calos para todos os genótipos híbridos analisados. Os calos começaram a apresentar os primeiros sinais de morfogênese aos 30 dias de cultura, no entanto, a avaliação final dos experimentos traduzida pela frequência de calos que regeneraram e não regeneraram "plantlets" foi realizada após 105 dias do início da cultura.

A transferência dos calos após 75 dias de cultura do meio de

regeneração de plantas para o meio de crescimento dos "plantlets", resultou no alongamento das plantas regeneradas, favorecendo-se assim a contagem a olho nú dos calos que efetivamente regeneraram plantas, dos calos que apenas diferenciaram órgãos como folhas.

Os resultados dos cruzamentos mostrando o número de calos que regeneraram (R) e não regeneraram plantas(NR), com os respectivos número médio de brotos por calo dos híbridos F_1 e dos cruzamentos recíprocos estão descritos nas Tabelas 9 a 13 (pág. 50-54).

Os híbridos F_1 demonstraram alta capacidade para regeneração de plantas (75-90%) nos 5 conjuntos familiares analisados, com efeito de dominância (Figura 5), não tendo sido constatadas diferenças significativas nos cruzamentos recíprocos. A dominância para a característica regeneração de plantas a partir da cultura de calos, havia sido reportada previamente na literatura para tomate(Thomas & Pratt, 1981; Kut & Evans, 1982; Koornneef et al, 1986; Tan et al, 1987; Koornneef et al, 1987; Wijbrandi et al, 1988) e outras culturas como milho (Hodges et al, 1986, Prioli, 1987; Novak et al, 1988), alfafa(Reish & Bingham , 1980; Wan et al, 1988) e trigo (Kaleikau et al, 1989).

Wijbrandi et al (1988), observaram que a fusão de protoplastos de L. peruvianum que possui alta capacidade para regeneração de plantas com genótipos de L. esculentum recalcitrantes para esta característica propiciou a formação de calos com habilidade para a regeneração de plantas, propondo portanto que a capacidade para regeneração de plantas pode ser usada como um marcador dominante para seleção de híbridos somáticos.

O envolvimento de genes recessivos para capacidade de regeneração de plantas em híbridos F_1 de tomate, foi relatado por Frankenberger et al (1981b) que, embora tivessem constatado um baixo nível de dominância, verificaram que genótipos particulares mostraram dominância ou comportamento recessivo para a diferenciação de plantas.

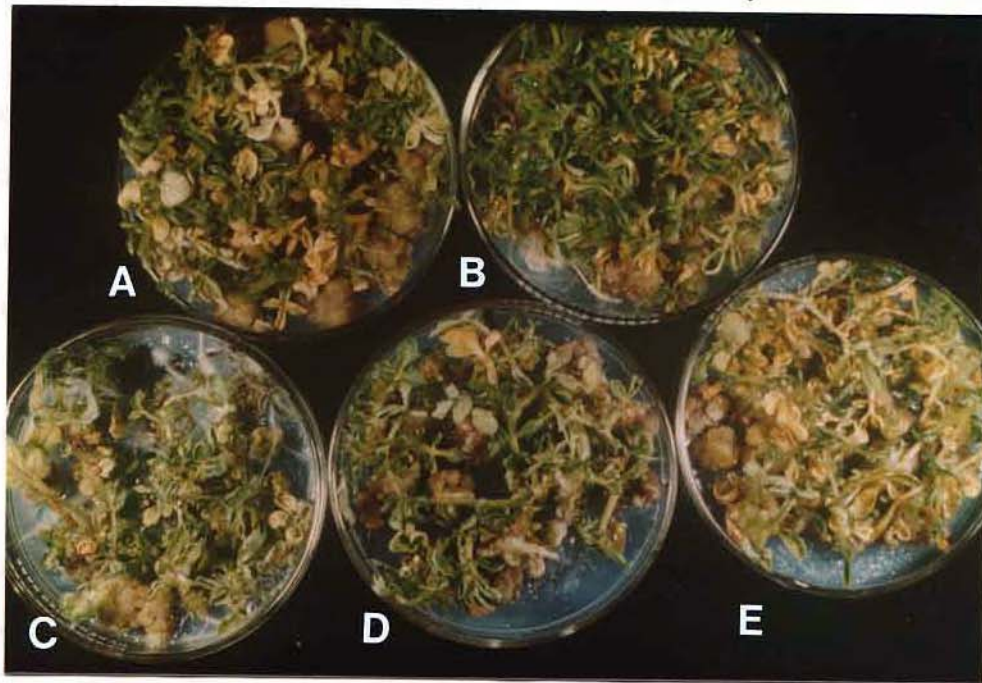


Figura 5. Alta frequência de calos organogénéticos para os híbridos F_1 , mostrando dominância para a capacidade regeneração de plantas. (A) WV-700 x Red Cherry, (B) WV-700x CNPH-80, (C) WV-700 x Petomech, (D)WV-700 x Santa Rita,(E) WV-700 x VFN-8.

Meio MS-C: MS sem fitorreguladores.

A análise dialélica de híbridos F_1 , de linhagens de trigo de inverno, mostraram que efeitos genéticos aditivos e não aditivos foram significativos no controle da embriogênese somática, sugerindo portanto, que dominância e epistasia podem apresentar um papel na expressão dessa característica (Ou et al, 1989).

A ausência de efeito materno e/ou citoplasmático observada através dos cruzamentos recíprocos, confirmam os resultados descritos em dois estudos realizados anteriormente com tomate (Frankenberger et al, 1981b; Koornneef et al, 1987), no entanto a influência de efeito genético citoplasmático foi significativo no controle da embriogênese somática em trigo (Lazar et al, 1984; Ou et al, 1989) e milho (Tomes & Smith, 1985).

No presente trabalho a frequência de regeneração dos híbridos F_1 não foi superior à do genótipo WV-700 (*L. pimpinellifolium*), não tendo sido portanto constatado efeito de heterose. Resultados similares foram obtidos por Frankenberger et al, (1981b), em contraste, Ohki, (1978), reportou que híbridos entre 2 cultivares de tomate exibiram heterose num certo meio de cultura e Novak et al (1988), observaram que a capacidade embriogênica de calos de milho em combinações de híbridos específicos excederam a dos seus parentais.

Houve uma redução do número médio de brotos por calo dos híbridos F_1 (1.83 ± 0.22) em relação ao genótipo parental WV-700 (3.5 ± 1.5). Isto pode ser explicado pelo fato da capacidade de regeneração dos híbridos, em comparação com este parental, dependerem da concentração dos fitorreguladores adicionados ao meio de cultura (Ohki et al, 1978) e

decorrentes de diferenças no background genético (Reish & Bingham, 1980).

Prioli (1987), enfatiza a importância da realização de mais experimentos com o objetivo de produzir linhagens isogênicas que apresentem diferenças apenas para a capacidade para regeneração de plantas, para melhor entendimento dos fatores genéticos e fisiológicos, envolvidos na expressão desta característica.

4.3.4 Indução de calos e regeneração de plantas das gerações F_2 e dos retrocruzamentos com os genótipos com baixa capacidade para regeneração de plantas

Os resultados do Teste de Homogeneidade do X^2 , demonstraram que os desvios observados na frequência de calos que regeneraram e não regeneraram plantas, para as 3 repetições, de segmentos de hipocótilo provenientes da mesma semente, foram não significativos ao nível de 5% de probabilidade, permitindo portanto que as repetições fossem analisadas no conjunto, ou seja, como uma única repetição (Apêndice). A frequência de calos que regeneraram plantas(R) e não regeneraram plantas(NR) das gerações F_2 e retrocruzamentos estão apresentados nas Tabelas 9 a 13 (pág. 50-54).

A proporção observada na geração F_2 , para todas progênes analisadas, foi próxima de 9:7(R:NR) e nos retrocruzamentos foi próxima de 1:3(R:NR), ambas não significativas ao nível de 5% de probabilidade, no Teste Qui-Quadrado, sugerindo portanto o envolvimento de dois genes independentes com interação, na expressão da regeneração de plantas (Figura 6) .

Em apenas um fruto da geração F_2 (WV-700 x VFN-8) (x) houve um desvio significativo da segregação 9:7(R:NR), porém para todos os retrocruzamentos, o desvio na segregação 1:3 (R:NR), foi não significativa ao nível de 5% no Teste Qui-Quadrado.



Figura 6. À esquerda segregação observada na geração F_2 (WV-700xSanta Rita) próxima de 9:7(R:NR) e à direita no retrocruzamento com a variedade Santa Rita próxima de 1:3(R:NR). Notar a redução na frequência de calos organogênicos no retrocruzamento. Calos com 105 dias de cultura. Meio MS-C: MS sem fitorreguladores.

TABELAS 9 a 13 . Herança da capacidade de indução de calos organogénéticos, a partir de explantes de hipocótilos, em 5 conjuntos familiares envolvendo genótipos de tomate, com e sem capacidade de regeneração de plantas. Os meios utilizados foram MS-I, MS-R, e o meio MS na ausência de fitorreguladores. A avaliação final do número de calos que regeneram (R) e não regeneram plantas (NR) foi realizada aos 105 dias de cultura. Regeneração refere-se a calos que originaram em pelo menos um "plantlet" com eixo caulinar e meristema apical. O teste aplicado, foi o do Qui-Quadrado. A análise de segregação testou a hipótese de 9:7(R:NR) em F_2 e de 1:3(R:NR), no retrocruzamento com o genótipo que não regenera plantas, ao nível de 5% de probabilidade

$$(X^2_{0,05} = 3,84).$$

1GL

TABELA 9. Conjunto familiar envolvendo os genótipos WV-700 (*L. pimpinellifolium*) e CNPH-80 (*L. esculentum* var. *cerasiforme*).

Genótipo	Geração	N° de calos cultivados	N° médio de brotos por calo \pm s	Calos reg. "plantlets" %	Observado		Esperado		χ^2
					R ^{***}	NR	R	NR	
WV-700(R)	P	60	3.5 \pm 1.5	92	55	5	1	0	
CNPH-80(NR)	P	60	1.2 \pm 0.4	8	5	55	0	1	
WV-700xCNPH-80	F-1	60	2.2 \pm 1.2	90	54	6	1	0	
(WV-700xCNPH-80)(x)	F-2(A) ^{**}	192	1.3 \pm 0.5	51	97	95	9	7	2.56NS
	(B)	201	1.2 \pm 0.4	60	120	81	9	7	0.97NS
(WV-700xCNPH-80)	BC(A)	129	1.4 \pm 0.4	23	29	100	1	3	0.44NS
x	(B)	144	1.6 \pm 0.3	24	34	110	1	3	0.15NS
CNPH-80									

* autofecundação

** (A) e (B) são diferentes frutos da mesma geração

*** (R) regenera e (NR) não regenera plantas

TABELA 10. Conjunto familiar envolvendo os genótipos WV-700(L. pimpinellifolium) e Red Cherry (L. esculentum var. cerasiforme).

Genótipo	geração	N° de calos cultivados	N° médio de brotos por calo \pm s	Calos reg. "plantlets" %	Observado		Esperado		X ²
					R ^{***}	NR	R	NR	
WV-700(R)	P	60	3.5 \pm 1.5	92	55	5	1	0	
Red Cherry(NR)	P	60	1.3 \pm 0.6	5	3	57	0	1	
WV-700xRed Cherry	F-1	60	1.8 \pm 0.9	78	47	13	1	0	
Red Cherryx WV-700	F-1	60	2.1 \pm 1.2	73	44	16	1	0	
(WV-700xRed Cherry) (x) [*]	F-2(A) ^{**}	189	1.4 \pm 0.6	54	102	87	9	7	0.40NS
	(B)	171	1.4 \pm 0.5	53	92	79	9	7	0.42NS
(WV-700xRed Cherry)	BC(A)	114	1.2 \pm 0.4	23	26	88	1	3	0.29NS
x	(B)	138	1.3 \pm 0.5	20	27	111	1	3	2.17NS
Red Cherry									

* autofecundação

** (A) e (B) são diferentes frutos da mesma geração

*** (R) regenera e (NR) não regenera plantas

TABELA 11. Conjunto familiar envolvendo os genótipos WV-700(L. pimpinellifolium) e Petomech (L. esculentum).

Genótipo	Geração	Nº de calos cultivados	Nº médio de brotos por calo \pm s	Calos reg. "plantlets" %	Observado		Esperado		X ²
					R ^{***}	NR	R	NR	
WV-700(R)	P	60	3.5 \pm 1.5	92	55	5	1	0	
Petomech(NR)	P	60	1.3 \pm 0.5	7	4	56	0	1	
WV-700xPetomech	F-1	60	1.8 \pm 0.8	82	49	11	1	0	
(WV-700xPetomech)(x) [*]	F-2(A) ^{**}	162	1.3 \pm 0.6	57	98	64	9	7	1.19NS
	(B)	168	1.3 \pm 0.4	55	93	75	9	7	0.05NS
(WV-700xPetomech)	BC (A)	123	1.4 \pm 0.5	22	27	96	1	3	0.61NS
x	(B)	138	1.2 \pm 0.4	21	30	108	1	3	0.78NS
Petomech									

* autofecundação

** (A) e (B) são diferentes frutos da mesma geração

*** (R) regenera e (NR) não regenera plantas

TABELA 12. Conjunto familiar envolvendo os genótipos WV-700 (*L. pimpinellifolium*) e VFN-8 (*L. esculentum*).

Genótipo	Geração	Nº de calos cultivados	Nº médio de brotos por calo $\pm s$	Calos reg. "plantlets" %	Observado		Esperado		χ^2
					R ^{***}	NR	R	NR	
WV-700(R)	P	60	3.5 \pm 1.5	92	55	5	1	0	
VFN-8(NR)	P	60	1.3 \pm 0.6	5	3	57	0	1	
WV-700xVFN-8	F-1	60	1.6 \pm 0.8	75	45	15	1	0	
(WV-700xVFN-8) (x)	F-2(A) ^{**}	195	1.3 \pm 0.6	59	115	80	9	7	0.59NS
	(B)	210	1.2 \pm 0.4	53	136	74	9	7	6.18 *
(WV-700xVFN-8)xVFN-8	BC(A)	138	1.3 \pm 0.5	19	26	112	1	3	2.79NS
	(B)	126	1.2 \pm 0.4	25	25	101	1	3	1.78NS

* autofecundação

** (A) e (B) são diferentes frutos da mesma geração

*** (R) regenera e (NR) não regenera plantas

TABELA 13. Conjunto familiar envolvendo os genótipos WV-700 (*L. pimpinellifolium*) e Santa Rita (*L. esculentum*).

Genótipo	Geração	Nº de calos cultivados	Nº médio de brotos por calo + s	Calos reg. "plantlets" %	Observado		Esperado		X ²
					R ^{***}	NR	R	NR	
WV-700(R)	P	60	3.5±1.5	92	55	5	1	0	
Santa Rita(NR)	P	60	0	0	0	60	0	1	
WV-700 x Santa Rita	F-1	60	1.7±0.8	87	52	8	1	0	
Santa Rita x WV-700	F-1	60	1.9±0.9	90	54	6	1	0	
(WV-700 x Santa Rita) (x) [*]	F-2(A) ^{**}	174	1.3±0.6	57	100	74	9	7	0.11NS
	(B)	186	1.4±0.5	58	108	78	9	7	0.25NS
(WV-700 x S. Rita) x S. Rita	BC (A)	111	1.3±0.6	18	20	91	1	3	2.89NS
	(B)	156	1.6±0.5	22	34	122	1	3	0.86NS

* autofecundação

** (A) e (B) são diferentes frutos da mesma geração

*** (R) regenera e (NR) não regenera plantas

Os resultados de segregação observados no presente trabalho indicando que a capacidade para regeneração de plantas de tomate é uma característica condicionada por poucos genes, concorda com os resultados descritos previamente em outros estudos do controle genético da regeneração em tomate (Koornneef et al, 1987; Frankenberger et al, 1981b).

No estudo do controle genético da regeneração em híbridos de L. peruvianum x L. esculentum foi observado que essa característica, quando analisada como uma característica qualitativa, segregou como dois genes mendelianos (Koornneef et al, 1987).

Em alfafa foi sugerido que a regeneração a partir da cultura de calos está sob controle de 2 genes complementares e que alelos dominantes nos dois loci controlam a capacidade para regeneração de plantas (Reish & Bingham, 1980; Wan et al, 1988). Ma & Liang (1987), reportaram resultados similares para regeneração de plantas a partir da cultura de embriões imaturos de sorgo (Sorghum vulgare).

No presente trabalho, o número médio de brotos por calo na geração F_2 , foi de 1.32 ± 0.04 e nos retrocruzamentos foi de 1.26 ± 0.06 , para os 5 conjuntos familiares analisados.

O fato de, usualmente, somente um broto desenvolver-se por calo, pode ser atribuído ao excesso de auxina endógena, dos explantes que facilmente diferenciam raízes, em adição ao efeito apical dominante do primeiro broto. Cassells (1979), verificou que, a excisão do primeiro broto formado, resultou em contínua desdiferenciação, provavelmente pela redução da dominância apical. A segregação nas gerações F_2 e

retrocruzamentos, não foram alteradas pela utilização de genótipos pertencentes a grupos distintos e com diferentes tipos de crescimento.

A não relação do gene que determina o tipo de crescimento para a capacidade de regenerar plantas foi, relatada previamente por Frankenberger et al (1981a), através da utilização de linhagens isogênicas que diferiam apenas para essa característica.

Em trigo foi verificado que genes controlando a habilidade de regeneração, estão primariamente localizados nos cromossomos 7B, 7D e 1D, tendo sido concluído pelos experimentos de regeneração, que essa característica é determinada por um sistema poligênico (Galiba et al, 1986). Por outro lado, Kaleikau et al (1989), analisando a capacidade de regeneração de linhagens aneuplóides e euplóides de trigo, verificaram que alguns cruzamentos definiram que possivelmente um ou dois genes dominantes controlam a característica regeneração de plantas, enquanto outros cruzamentos indicaram que genes modificadores em adição aos genes principais estão envolvidos. Esses resultados são similares aos sugeridos para o controle da embriogênese somática em milho (Prioli, 1987).

A presença de genes modificadores em adição aos genes principais para regeneração de plantas, foi descrito previamente por Hodges et al (1986), nos estudos de regeneração a partir de calos de milho.

De acordo com os resultados obtidos em alfafa, foi proposto que fatores genéticos adicionais aos que controlam regeneração, devem influenciar a formação de brotos, pois embora todos genótipos tivessem regenerado embriões, houve uma baixa conversão desses embriões em

plantas (Seitzkris & Bingham, 1988).

Os dados apresentados neste trabalho, indicando que a característica regeneração de plantas é controlada por poucos genes, sugerem que deve ser relativamente fácil a transferência da capacidade de regeneração de plantas de L. pimpinellifolium para as espécies comerciais de L. esculentum, para maximizar a resposta "in vitro", como foi descrito em alfafa (Bingham et al, 1975; Reish & Bingham, 1980) e milho (Novak et al, 1988; Petolino et al 1988).

A transferência da capacidade de regeneração de plantas de genótipos selvagens para variedades comerciais, foi reportada por Wijbrandi et al (1986), através da fusão de protoplastos de L. peruvianum x L. esculentum porém, nos retrocruzamentos com as variedades comerciais foi observado que continuou a ocorrer o aborto de embriões, conjuntamente com a dificuldade de recuperar as características de fruto desejáveis agronomicamente, pelo fato da espécie L. peruvianum, apresentar frutos pequenos e verdes mesmo quando maduros. (Koornneef et al, 1987).

Por outro lado de acordo com os resultados descritos no presente trabalho a transferência da capacidade de regeneração de L. pimpinellifolium para L. esculentum, através de sucessivos retrocruzamentos, deve ser conseguido sem grandes dificuldades, pelo fato desta espécie hibridizar-se facilmente com o tomate cultivado e por apresentar frutos com coloração vermelha.

5. CONCLUSÕES

- Confirmou-se a existência de variabilidade genotípica intra e inter-específica para a regeneração de plantas a partir da cultura de calos de tomate;

- Os genótipos selvagens WV-700(L. pimpinellifolium) e LA444/1(L. peruvianum) apresentaram uma alta capacidade para regeneração de plantas quando comparado ao tomate cultivado(L. esculentum);

- O sucesso obtido nos cruzamentos inter-específicos de L. pimpinellifolium e L. esculentum mostram a possibilidade da introgressão da característica regeneração de plantas utilizando métodos convencionais de melhoramento;

- Houve um controle genético para a indução de calos organogênicos, a partir de explantes hipocotiledonares de tomate, sendo que os híbridos F_1 nos 5 conjuntos familiares analisados, apresentaram dominância para a característica regeneração de plantas;

- As segregações observadas na geração F_2 (9:7) e nos retrocruzamentos (1:3) para os 5 conjuntos familiares analisados, sugerem que essa característica é controlada por dois genes independentes com interação. Esses resultados indicam que a transferência da alta capacidade de regeneração de plantas do genótipo WV-700(L. pimpinellifolium) para variedades de interesse agrônomico(L. esculentum) deve ser relativamente fácil já que essa característica é dominante e controlada qualitativamente.

6. RESUMO

Com o objetivo de estudar o controle genético da regeneração de plantas "in vitro" em tomate, genótipos com alta e baixa capacidade de regeneração de plantas foram, identificados para um determinado meio de cultura. Para a indução de calos, o meio de cultura contendo os sais de Murashige & Skoog (MS) foi suplementado com 1 mg/l de AIA e 2,25 mg/l de BAP; para a regeneração de plantas adicionou-se 0,5 mg/l de AIA e 5mg/l de BAP.

Como explante utilizaram-se segmentos de hipocótilo de plantas germinadas "in vitro", inoculados por 15 dias no meio de indução de calos e subcultivados a cada 30 dias em meio de regeneração por um período de 2 meses. Após esse período os calos foram transferidos, por mais 30 dias, para meio MS sem fitorreguladores, para alongamento das gemas e crescimento dos "plantlets".

O genótipo WV-700 (Lycopersicon pimpinellifolium) que apresentou uma alta capacidade de regeneração de plantas (92%), utilizado como doador de pólen, foi cruzado com os genótipos de L. esculentum recalcitrantes para esta característica: VFN-8(5%), Petomech(7%), Santa Rita(0%), além de dois genótipos da variedade cerasiforme: CNPH-080(8%) e Red Cherry(5%). Os cultivares VFN-8 e Santa Rita destinam-se ao consumo "in natura" e Petomech à indústria.

A análise estatística dos dados, obtidos pela freqüência de calos que regeneram (R), envolveu resultados das gerações F_1 , F_2 , cruzamentos recíprocos, além de retrocruzamentos com os 5 genótipos que não regeneram plantas(NR).

Os híbridos F_1 apresentaram alta capacidade de regeneração de plantas (75–90%), com efeito de dominância, não tendo sido observado diferenças nos cruzamentos recíprocos.

A segregação na geração F_2 foi próxima de 9:7 (R:NR) e nos retrocruzamentos próximo de 1:3(R:NR), ambas não significativas ao nível de 5% no teste X^2 , sugerindo, portanto, o envolvimento de dois genes dominantes com interação na expressão da regeneração.

Esses resultados indicam que a transferência da capacidade de regeneração de genótipos selvagens para variedades comerciais do tomateiro, deve ser relativamente fácil, já que essa característica é dominante e controlada qualitativamente.

7. Summary

With the objective of studying the genetic control of in vitro plant regeneration ability in tomato, high and low expressing genotypes for that trait were initially identified, using a previously defined culture medium. For callus induction, the utilized medium was that of Murashige & Skoog (MS), supplemented with IAA (1 mg/l) and BAP (2,25 mg/l); for plant regeneration IAA (0,5 mg/l) and BAP (5 mg/l) was added to the same MS medium.

Hypocotyl segments were inoculated for 15 days in callus induction medium and thereafter, subcultured every 30 days in regeneration medium, for two months.. Subsequently calli were transferred to MS medium without growth regulators for one month more, to promote bud elongation and plantlet growth.

Lycopersicon pimpinellifolium, genotype WV-700, with high plant regeneration ability (92%) used as polen donor, was crossed to 5 different recalcitrant L. esculentum genotypes for that character, namely: VFN-8 (5%), Petomech (7%), Santa Rita (0%), beyond two cerasiforme genotypes of L. esculentum, namely CNPH-080 (8%) and Red Cherry (5%). VFN-8 and Santa Rita cultivars are used in salads or for consumption 'in natura', whereas Petomech is destined for industry; cerasiforme genotypes have no economic importance.

Statistical analysis were based upon frequency data of calli that regenerated plants (R) in F_1 , F_2 , reciprocal crosses and backcrosses, with all five genotypes that did not regenerate plants (NR).

F_1 hybrids showed high plant regeneration ability (75-90%) with an

effect of dominance; no differences were observed in reciprocal crosses.

Segregation ratio in F_2 generation was near to 9 : 7 (R:NR) and in backcrosses the ratio expressed was near to 1 : 3 (R:NR), both not significant at the 5% level, in X^2 Tests, suggesting an interaction of two dominant genes in the expression of the trait studied.

These results indicate that the transfer of plant regeneration ability from wild tomato genotypes to commercial ones, must be relatively easy once a qualitatively inherited dominant trait is involved.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, T.E. & FUTSUHARA, A. 1986. Genotípica variabilidade for callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 72: 3-10.
- ADAMS, T.L. & QUIROS, C.F. 1985. Somatic hibridization between *Lycopersicon peruvianum* and *L. pennellii*: regenerating ability and antibiotic resistance as selection systems. *Plant Sci.* 40 : 209-219.
- BEHKI, R.M. & LESLEY, M. 1976. In vitro plant regeneration from leaf of *L. esculentum* (tomato). *Can. J. Bot.* 54: 2409-2414.
- 1980. Shoot regeneration from leaf callus of *L. esculentum*. *Z. Pflanzenphysiol.* 98: 83-87.
- BELLINI, C.; CHUPEAU, M. C.; GERVAIS, M.; VASTRA, G. & CHUPEAU, Y. 1990. Importance of myo-inositol, calcium and ammonium for the viability and division of tomato (*L. esculentum*) protoplasts. *Plant Cell Tiss. and Org. Culture* 23: 27-37.
- 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.
- BORN, G.C.C. 1987. Aspectos do controle da morfogênese em tecidos de *Kalanchoe blossfeldiana* cultivados "in vitro". São Paulo, 109p. Tese de Mestrado em Botânica - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

- 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.
- BULLOCK, W.P.; BAENZIGER, P.S.; SCHAEFFER, G.W.; BOTTINO, P.J. 1982. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum*) F₁'s and their reciprocal crosses. *Theor. Appl. Genet.* 62: 155-159.
- 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.
- CAPPADOCIA, M. & RAMULU, K.S. 1980. Plant regeneration from in vitro cultures of anthers and stem internodes in an interspecific hybrid, *L. esculentum* x *L. peruvianum* Mill. and cytogenetic analysis of the regenerated plants. *Plant Sci. Lett.* 20: 157-166.
- CASSELLS, A.C. 1979. The effect of 2,3,5 - triiodobenzoic acid on caulogenesis in callus cultures of tomato and pelargonium. *Physiol. Plant.* 46: 159-164.
- 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.
- DELANGHE, E. & BRUIJNE, E. 1976. Continuous propagation of tomato plants by means of callus cultures. *Sci. Hort.* 4: 221-227.
- 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.

- EVANS, D.A. & SHARP, W.R. 1986. Applications of somaclonal variation .
Bio-Technology 4: 528-531.
- FISCHHOFF, D.A.; BOWDISH, K.S.; PERLAK, F.J.; MARRONE, P.J.;
McCORMICK, S.M. NIEDREMEYER, J.G.; DEAN, D.A.; MAYER, E.J.; ROCHESTER,
D.E.; ROGERS, S.G. & FRALEY, R.T. 1987. -Insect tolerant transgenic
tomato plants. *Bio/Technology* 5: 807-813.
- FILGUEIRA, F.A.R. 1982. Tomate: a mais universal das hortaliças. In:
Manual de Olericultura, Cap. 8, p. 223-300.
- FONSECA, M.I.S. 1987. Cultura de embriões imaturos para obtenção de
híbridos inter-específicos em tomateiro. Campinas, 157p . Tese de
Mestrado em Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Campinas.
- 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. Bd.* 102: 221-232.
- 1981b. Diallel analysis of shoot forming capacity among
selected tomato genotypes. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 102: 233-242.
- GALIBA, G.; KOVACS, G. & SUTKA, J. 1986. Substitution analysis of
plant regeneration from callus culture in wheat. *Plant Breeding* 97:
261-263.
- GARCIA-REINA, G. & LUQUE, A. 1988. Analysis of the organogenetic
potential of calli of three Canary Island *Lycopersicon esculentum* land
races. *Plant Cell. Tiss. and Org. Cult.* 12: 279:283.
- GAVAZZI, G.; TONELLI, C.; TODESCO, G.; BARBUZZI, G.; BIASINI, M.G. &
SALA, F. 1987. Somaclonal variation versus chemically induced
mutagenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Theor. Appl. Genet.*
74: 733-738.

- GIELEN, J.J.L.; HAAN, P.; KOOL, A.J.; PETERS, D.; GRINSVEN, M. Q. J. M. & GOLDBACH, R.W. 1991. Engineered resistance to tomato spotted with virus, a negative strand RNA virus. *Bio/Technology* 9: 1363-67.
- GREEN, C.E. & PHILLIPS, R.L. 1975. Plant regeneration from tissue culture of maize . *Crop. Sci.* 15: 417-421.
- GREER, A.F. & TABAEIZADEH, 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* L.) using hypocotyl and cotyledon explants. *Ann. Bot.* 45: 205-207.
- HANDRO, W. & FLOH, E.S. 1990. Aspectos básicos do controle da morfogênese "in vitro". In: Torres, A.C. & CALDAS, L.S. (Eds.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, ABCTP e EMBRAPA/CNPH, p. 203-212.
- HAGEN, S.G.; MUNETA, P.; AUGUSTIN, J. & LETOURNEAU, D. 1991. Stability and utilization of picloram, vitamins and sucrose in a tissue culture medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25: 45-48.
- HERMAN, E.B. & HASS, G.J. 1978. Shoot formation in tissue cultures of *L. esculentum* Mill. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 89: 467-470.
- HIGGINS, P. & 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.
- HIM HIM, P.V. 1987. Estudos citológicos, organogênese e radiosensibilidade na cultura de antera de tomate (*L. esculentum*) como uma estratégia para a obtenção de planta haplóide.

- Piracicaba, 175 p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- HODGES, T.K.; KAMO, K.K.; IMBRIE, C.M. & BECWAR, M.R. 1986. Genotype specific of somatic embryogenesis and regeneration in maize. *Bio/Technology* 4: 219-223.
- 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.
- 1972b. Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*. 2. Breaking of self-incompatibility in *L. peruvianum* Mill. *Euphytica* 21: 228-243.
- 1972c. Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*. 3. Inheritance of self compatibility in *L. peruvianum* Mill. *Euphytica*, 21: 244-256.
- 1972d. Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*. 4. Breakdown of unilateral incompatibility between *L. peruvianum* Mill and *L. esculentum* Mill. *Euphytica* 21: 397-404.
- 1972e. Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*. 5. The inheritance of the unilateral incompatibility between *L. esculentum* Mill and the genetic of its breakdown. *Euphytica* 21: 405-414.
- ILLG, R.D. 1990. Variação somaclonal. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (Eds) Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, ABCTP e EMBRAPA/CNPH, p. 287-295.
- 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.

- 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.; SHYLUK, J.P. & CONSTABEL, F. 1976. Morphogenetic investigation on in vitro leaf culture of tomato (*L. esculentum* Mill cv. Starfire) and high frequency plant regeneration. *Z. Pflanzenphysiol Bd.* 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.
- KOBLITZ, H. & KOBLITZ, D. 1982. Shoot formation from protoplasts of tomato long term cell cultures. *Plant Cell Rep.* 1: 147-150.
- KOORNNEEF, M.; JONGSMA, M.; TOMA, I.; WEIDE, R.; ZABEL, P. & HILLI, J. 1986. Breeding of a tomato genotype readily accessible to genetic manipulation. *Plant Science* 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.
- 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.
- KUT, S.A.; BRAVO, J.E. & EVANS, D.A. 1984. Tomato. In: Handbook of plant cell culture , vol. 3. Crop species (P.V. AMIRATO, D.A. EVANS, W.R. SHARP & YAMADA, eds.) Chapter 10, Macmillan Publishing, p. 247-289.
- 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. Org. Cult.* 10: 209-220.
- LOCKY, R.D. 1983. Callus formation and organogenesis by explants of six *Lycopersicon* species. *Can. J. Bot.* 61: 1072-1079.
- MA, H.M. & LIANG, G.H. 1987. Plant regeneration from cultured immature embryos of *Sorghum bicolor* L. *Theor. Appl. Genet.* 73: 389-394.
- MATOS, N.O. & CORDEIRO, A.R., 1988. Regeneração de Cubiu (*Solanum sessiliflorum*) - tomate do índio - por cultura de tecidos. 40a. SBPC, Resumos, p. 805.
- MEREDITH, C.P. 1979. Shoot development in established callus cultures of cultivated tomato (*L. esculentum*). *Z. Pflanzenphysiol* 95: 405-411.
- 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.
- 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.
- MORGAN, A.; & COCKING, E.C. 1982. Plant regeneration from protoplasts of *Lycopersicon esculentum* Mill. *Z. Pflanzenphysiol* 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 biossays with tabac c o t i s s u e cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NAGAI, H. 1987. Tomate (*Lycopersicon esculentum*). In: Boletim 200, Instituto Agronômico de Campinas, p. 195-198.
- NORTON, J.P. & BOLL, W.G., 1954. Callus and shoot formation from roots in vitro. *Science* 119: 220-221.
- NOVAK, F.J.; DASKALOV, S.; BRUNNER, H.; NESTICKY, M.; AFZA, R.; DOLEZELOVA, M.; LUCRETTI, 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.
- OELCK, M.M. & SCHIEDER, O. 1983. Genotypic differences in some legume species affecting the redifferentiation ability from callus to plants. *Z. Pflanzenzuchtg* 91: 312-321.
- OHKI, S.; BIGOT, C. & MOUSSEAU, J. 1978. Analysis os 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. & 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.
- PARROT, W.A.; WILLIAMS, E.G.; HILDEBRAND, D.F. & COLLINS, G.B. 1989. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 16: 15-21.

- 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.
- PETOLINO, J.F.; JONES, A.M. & THOMPSON, S.A. 1988. Selection for increased anther culture response in maize. *Theor. Appl. Genet.* 76: 157-159.
- 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. Universidade Estadual de Campinas.
- PRIOLI, L.M. & SILVA, W.J. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in tropical maize inbreds. *Rev. Bras. Genet.* 12: 553-566.
- 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. 1978. El tomate. *Scientific American* 32: 45-55.
- 1982. The potential of exotic germoplasm for tomato improvement. In: VASIL, I.K.; SCOWCROFT, W.R. & FREY, K.J. (eds) Plant improvement and somatic cell genetics. Acad. Press, New York; p. 1-28.
- RICK, C.M. & YODER, J.I. 1988. Classical and molecular genetics of tomato: highlights and perspectives. *Ann. Rev. Genet.* 22: 281-300.
- SEITZKRIS, H.E. & 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.

- SERESINHE, P.S.J.W. & OERTLI, J.J. 1991. Effects of boron on growth of tomato cell suspensions. *Phys. Plant.* 81: 31-36.
- SHEPHERD, S.L.K. 1986. Utilização das técnicas de cultura de tecidos e testes de resistência/suceptibilidade ao fungo *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout em plantas de tomate. Tese de Doutorado- Universidade Estadual de Campinas.
- SILVA, R.F. & CASALI, V.W. 1980. Produção de sementes do tomateiro. *Inf. Agropec.* 6: 35-36.
- TAL, M.; DEHAM, K. & KEIKIN, H. 1977. Morphogenetic potential of cultured leaf sections of cultivated and wild species of tomato. *Ann. Bot.* 41: 937-941.
- 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 different genotypes of the cultivated tomato. *Theor. Appl. Genet.* 75: 105-108.
- TEMPLENTON-SOMERS, K.M. & COLLINS, W.W. 1986. Heritability of regeneration in tissue cultures 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 embriogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germoplasm. *Theor. Appl. Genet.* 70: 505-509.
- TORRES, C.C. & ROMANO, E. 1987. Capacidade de regeneração "in vitro" de cultivares de tomateiro. 39a. SBPC, Resumos, p. 793.

- 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: 669-671.
- 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, E.C. 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 *Lycopersicon 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.

9. APÊNDICE

Dados relativos ao Teste de X^2 e Teste de Homogeneidade, para análise de segregação esperada de 9:7 (N:NR) em F_2 e de 1:3 (R:NR) no retrocruzamento, com o genótipo que não regenera plantas, ao nível de 5% de probabilidade ($X^2_{1GL} = 3,84$; $X^2_{2GL} = 5,99$; $X^2_{3GL} = 7,81$). (A) e (B) são sementes provenientes de diferentes frutos da mesma geração. (R) : frequência de calos que regeneraram pelo menos um "plantlet" com eixo caulinar e meristema apical. (NR): não regnerou nenhum "plantlet".

- Geração F_2 : (WV-700xCNPH 80) (x)

(A)

Amostras	R	NR	Total	GL	X^2
R_1	31	33	64	1	1,5873 NS
R_2	32	32	64	1	1,0159 NS
R_3	34	30	64	1	0,2540 NS
Total	97	95	192	3	2,8572 NS

Contrastes	GL	X^2
Conjunto	1	2,5608 NS
Heterogeneidade	2	0,2964 NS
Total	3	2,8572 NS

(B)

Amostras	R	NR	Total	GL	X^2
R_1	40	27	67	1	0,3243 NS
R_2	37	30	67	1	0,0287 NS
R_3	43	24	67	1	1,7171 NS
Total	120	81	201	3	2,0647 NS

Contrastes	GL	X^2
Conjunto	1	0,9730 NS
Heterogeneidade	2	1,0917 NS
Total	3	2,0647 NS

- Geração BC: (WV-700xCNPH 80) x CNPH 80

(A)

Amostras	R	NR	Total	GL	X ²
R ₁	13	30	43	1	0,6279 NS
R ₂	9	34	43	1	0,3798 NS
R ₃	7	36	43	1	1,7442 NS
Total	29	100	129	3	2,7519 NS

Contrastes	GL	X ²
Conjunto	1	0,4367 NS
Heterogeneidade	2	2,3152 NS
Total	3	2,7519 NS

(B)

Amostras	R	NR	Total	GL	X ²
R ₁	7	41	48	1	2,7778 NS
R ₂	14	34	48	1	0,4444 NS
R ₃	13	35	48	1	0,1111 NS
Total	34	110	144	3	3,3333 NS

Contrastes	GL	X ²
Conjunto	1	0,1481 NS
Heterogeneidade	2	3,1852 NS
Total	3	3,3333 NS

- Geração F_2 : (WV-700xRed Cherry) (x)

(A)

Amostras	R	NR	Total	GL	X^2
R_1	38	25	63	1	0,1229 NS
R_2	33	30	63	1	0,3832 NS
R_3	31	32	63	1	1,2701 NS
Total	102	87	189	3	1,7752 NS

Contrastes	GL	X^2
Conjunto	1	0,3998 NS
Heterogeneidade	2	1,3754 NS
Total	3	1,7752 NS

(B)

Amostras	R	NR	Total	GL	X^2
R_1	30	27	57	1	0,3033 NS
R_2	28	29	57	1	1,1766 NS
R_3	34	23	57	1	0,2676 NS
Total	92	79	171	3	1,7475 NS

Contrastes	GL	X^2
Conjunto	1	0,4167 NS
Heterogeneidade	2	1,3308 NS
Total	3	1,7475 NS

- Geração BC: (WV-700xRed Cherry)xRed Cherry

(A)

Amostras	R	NR	Total	GL	X ²
R ₁	8	30	38	1	0,3158 NS
R ₂	6	32	38	1	1,7193 NS
R ₃	12	26	38	1	0,8772 NS
Total	26	88	114	3	2,9123 NS

Contrastes	GL	X ²
Conjunto	1	0,2924 NS
Heterogeneidade	2	2,6199 NS
Total	3	2,9123 NS

(B)

Amostras	R	NR	Total	GL	X ²
R ₁	8	38	46	1	1,4203 NS
R ₂	10	36	46	1	0,2609 NS
R ₃	9	37	46	1	0,7246 NS
Total	27	111	138	3	2,4058 NS

Contrastes	GL	X ²
Conjunto	1	2,1739 NS
Heterogeneidade	2	0,2319 NS
Total	3	2,4058 NS

- Geração F₂: (WV-700xPetomech) (x)

(A)

Amostras	R	NR	Total	GL	X ²
R ₁	28	26	54	1	0,4245 NS
R ₂	37	17	54	1	3,3003 NS
R ₃	33	21	54	1	0,5185 NS
Total	98	64	162	3	4,2433 NS

Contrastes	GL	X ²
Conjunto	1	1,1855 NS
Heterogeneidade	2	3,0578 NS
Total	3	4,2433 NS

(B)

Amostras	R	NR	Total	GL	X ²
R ₁	26	30	56	1	2,1950 NS
R ₂	35	21	56	1	0,8889 NS
R ₃	32	24	56	1	0,0181 NS
Total	93	75	168	3	3,1020 NS

Contrastes	GL	X ²
Conjunto	1	0,0544 NS
Heterogeneidade	2	3,0476 NS
Total	3	3,1020 NS

- Geração BC: (WV-700xPetomech)xPetomech

(A)

Amostras	R	NR	Total	GL	X ²
R ₁	9	32	41	1	0,2033 NS
R ₂	7	34	41	1	1,3740 NS
R ₃	11	30	41	1	0,0732 NS
Total	27	96	123	3	1,6505 NS

Contrastes	GL	X ²
Conjunto	1	0,6098 NS
Heterogeneidade	2	1,0407 NS
Total	3	1,6505 NS

(B)

Amostras	R	NR	Total	GL	X ²
R ₁	9	37	46	1	0,7246 NS
R ₂	13	33	46	1	0,2609 NS
R ₃	8	38	46	1	1,4203 NS
Total	30	108	138	3	2,4058 NS

Contrastes	GL	X ²
Conjunto	1	0,7826 NS
Heterogeneidade	2	1,6232 NS
Total	3	2,4058 NS

- Geração F_2 : (WV-700xVFN-8) (x)

(A)

Amostras	R	NR	Total	GL	X^2
R_1	39	26	65	1	0,3714 NS
R_2	36	29	65	1	0,0198 NS
R_3	40	25	65	1	0,7387 NS
Total	115	80	195	3	1,1299 NS

Contrastes	GL	X^2
Conjunto	1	0,5881 NS
Heterogeneidade	2	0,5418 NS
Total	3	1,1299 NS

(B)

Amostras	R	NR	Total	GL	X^2
R_1	39	31	70	1	0,0080 NS
R_2	52	18	70	1	9,2526 *
R_3	45	25	70	1	1,8400 NS
Total	136	74	210	3	11,1008 *

Contrastes	GL	X^2
Conjunto	1	6,1826 *
Heterogeneidade	2	4,9182 NS
Total	3	11,1008 *

- Geração BC: (WV-700xVFN-8)xVFN-8

(A)

Amostras	R	NR	Total	GL	X ²
R ₁	8	38	46	1	1,4203 NS
R ₂	7	39	46	1	2,3478 NS
R ₃	11	35	46	1	0,0289 NS
Total	26	112	138	3	3,7971 NS

Contrastes	GL	X ²
Conjunto	1	2,7923 NS
Heterogeneidade	2	1,0048 NS
Total	3	3,7971 NS

(B)

Amostras	R	NR	Total	GL	X ²
R ₁	10	32	42	1	0,0317 NS
R ₂	7	35	42	1	0,5185 NS
R ₃	8	34	42	1	0,2646 NS
Total	25	101	126	3	0,8148 NS

Contrastes	GL	X ²
Conjunto	1	1,7803 NS
Heterogeneidade	2	0,9735 NS
Total	3	0,8148 NS

- Geração F₂: (WV-700xSanta Rita) (x)

(A)

Amostras	R	NR	Total	GL	X ²
R ₁	30	28	58	1	0,4828 NS
R ₂	36	22	58	1	0,7980 NS
R ₃	34	24	58	1	0,1325 NS
Total	100	74	174	3	1,4133 NS

Contrastes	GL	X ²
Conjunto	1	0,1055 NS
Heterogeneidade	2	1,3078 NS
Total	3	1,4133 NS

(B)

Amostras	R	NR	Total	GL	X ²
R ₁	39	23	62	1	1,1152 NS
R ₂	33	29	62	1	0,2304 NS
R ₃	36	26	62	1	0,0830 NS
Total	108	78	186	3	1,4286 NS

Contrastes	GL	X ²
Conjunto	1	0,2488 NS
Heterogeneidade	2	1,1798 NS
Total	3	1,4286 NS

- Geração BC: (WV-700xSanta Rita)xSanta Rita

(A)

Amostras	R	NR	Total	GL	X ²
R ₁	5	32	37	1	2,6036 NS
R ₂	8	29	37	1	0,2252 NS
R ₃	7	30	37	1	0,7297 NS
Total	20	91	111	3	3,5585 NS

Contrastes	GL	X ²
Conjunto	1	2,8859 NS
Heterogeneidade	2	0,6726 NS
Total	3	3,5585 NS

(B)

Amostras	R	NR	Total	GL	X ²
R ₁	10	42	52	1	0,9231 NS
R ₂	15	37	52	1	0,4103 NS
R ₃	9	43	52	1	1,6410 NS
Total	34	122	156	3	2,9744 NS

Contrastes	GL	X ²
Conjunto	1	0,8547 NS
Heterogeneidade	2	2,1197 NS
Total	3	2,9744 NS