

I. BIOTECNOLOGIA E FISILOGIA DE PLANTAS

REGENERAÇÃO DE PLANTAS HÍBRIDAS ENTRE *LYCOPERSICON ESCULENTUM* E *L. PERUVIANUM* A PARTIR DE CALOS COM DOIS ANOS DE CULTURA IN VITRO (1)

WALTER JOSÉ SIQUEIRA (2,4), MONIQUE INES SEGEREN FONSECA (2,5)
e MARO R. SONDHAL (3,5)

RESUMO

Calos obtidos da cultura in vitro de embrião imaturo do cruzamento interespecífico *L. esculentum* x *L. peruvianum*, praticamente perderam a capacidade morfogênica, após dois anos de subcultura. Na tentativa de recuperação do processo de organogênese desses calos, realizaram-se dois experimentos, utilizando-se os fitorreguladores ácido indolacético (IAA) e 6-benziladenina (6-BA), cujas concentrações foram combinadas em dialélicos de 5 x 5 e 3 x 3. A composição de sais minerais e vitaminas baseou-se no meio de Murashige e Skoog, adicionando-se sacarose a 3% e ágar a 0,8%, e ajustando-se o pH final dos meios de cultura para 5,5. As condições para o dialélico 5 x 5 foram fotoperíodo de 16 horas de luz a 600 lux e temperatura de 25 ± 3°C. No dialélico 3 x 3, os tratamentos foram mantidos em câmara de crescimento a 2.000 lux, sob a mesma variação de temperatura e fotoperíodo. Em cada frasco, inoculou-se um calo com cerca de 1cm³, totalizando quinze repetições. Avaliaram-se o desenvolvimento de calos, atri-

(1) Trabalho apresentado na 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), realizado em Belo Horizonte, MG, no período de 10 a 17 de julho de 1985. Recebido para publicação em 30 de abril de 1987 e aceito em 14 de março de 1988.

(2) Seção de Genética, Instituto Agrônomo (IAC), Caixa Postal 28, 13.001 Campinas (SP).

(3) Seção de Genética, IAC. Atualmente na DNA Plant Technology Corporation, Cinamminson, New Jersey, EUA.

(4) Com bolsa de pesquisa do CNPq.

(5) Com bolsa de pesquisa da FAPESP.

buindo-se uma escala de notas de 1 a 5, e a presença de plantas (organogênese) após 30 dias de cultura. Observou-se o número total de plantas por tratamento, bem como o desenvolvimento das plantas em centímetro. No dialético 5 x 5, a organogênese foi apenas incipiente em três tratamentos, porém as melhores combinações para o desenvolvimento dos calos foram de 0,5, 2,5 e 5,0 μ M de IAA com 2,5 μ M de 6-BA. No dialético 3 x 3, houve a indução de plantas em sete tratamentos, sendo mais eficientes 25 e 50 μ M de 6-BA, sem auxina. O tratamento de 0,5 e 10,0 μ M de IAA e 6-BA, respectivamente, permitiu simultaneamente o crescimento de calos e a regeneração de plantas. Nota-se a influência das condições ambientais de manutenção das culturas, principalmente da intensidade de luz.

Termos de indexação: cultura de tecidos, tomate, organogênese, híbrido interespecífico.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as múltiplas aplicações da técnica da cultura de tecidos vegetais, destaca-se a cultura artificial de embriões imaturos, principalmente para a obtenção de híbridos entre espécies que normalmente apresentam incompatibilidade pós-zigótica. Do ponto de vista do melhoramento genético, essa hibridação é necessária para possibilitar a introgressão gênica em espécies cultivadas. Dessa maneira, complementam-se as características comerciais da espécie cultivada, com um ou mais fatores desejáveis provenientes do material selvagem (KUT et al., 1984). Outra consideração importante sobre a hibridação interespecífica relaciona-se com a ampla variabilidade genética geralmente liberada nas gerações subseqüentes (ALLARD, 1976). Em tomateiro, *Lycopersicon esculentum* Miller, a manipulação de espécies selvagens, a partir de 1950, muito contribuiu para o melhoramento genético da espécie comercial (RICK, 1976). Nesse aspecto, inclui-se a resistência a diversos patógenos e pragas, além de outras características voltadas para a qualidade de frutos, produtividade e porte de planta (RICK, 1976, 1982). As espécies selvagens de *L. pimpinellifolium* (Just.) Mill e *L. peruvianum* têm sido particularmente utilizadas como fontes de resistência a doenças. Contudo, a obtenção de plantas híbridas entre esta última e *L. esculentum* é limitada pela existência de barreira de incompatibilidade, sendo necessário, portanto, proceder-se à cultura artificial de embriões desde que *L. esculentum* seja empregado como progenitor pistilado (RICK, 1979). SMITH (1944) foi o primeiro a utilizar com sucesso essa técnica para a obtenção de híbridos entre *L. esculentum* cv. Michigan State Forcing e a introdução de *L. peruvianum* var. *dentatum*, visando à transferência da resistência aos nematóides do gênero *Meloidogyne*. THOMAS & PRATT (1981) conseguiram inúmeras plantas híbridas entre essas duas espécies, mas somente a partir da organogênese somática de calos de células híbridas. Em

conseqüência da baixa indução de calos, partindo-se dos embriões isolados ou da própria semente imatura como explante, é fundamental manter seu potencial organogenético por longo período (THOMAS & PRATT, 1981). Em algumas espécies, como o alho (*Allium sativum* L.), a regeneração de plantas pode ser obtida mesmo de calos com mais de sete anos de sucessivas repicagens em meio de cultura (NOVAK, 1980). Por outro lado, os calos de tomateiro perdem ou reduzem substancialmente a capacidade de emissão de novas plantas a partir do 4º ou 5º mês de cultura (KUT et al., 1984, e MEREDITH, 1979).

Este trabalho teve por objetivo a definição de metodologia para restabelecer o processo de organogênese de calos mantidos por dois anos sob sucessivas repicagens (15ª-16ª) em meio de cultura sintético.

Esses calos foram obtidos a partir da cultura in vitro de sementes imaturas, provenientes do cruzamento controlado entre as espécies *L. esculentum* cv. Ângela Gigante (I-5.100) e introduções de *L. peruvianum* de interesse no melhoramento genético do tomateiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Da cultura in vitro de sementes imaturas, provenientes do cruzamento entre *L. esculentum* cv. Ângela Gigante com uma mistura de pólen de seis introduções de *L. peruvianum* (PI 126928, PI 126930, PI 126944, PI 126946, PI 128657 e PI 129146), obteve-se um calo denominado de C 50. Este sofreu várias fragmentações durante as repicagens periódicas, aproximadamente a cada 45 dias, no seguinte meio de cultura: composição de sais minerais e vitaminas baseados no meio de MURASHIGE & SKOOG (MS) (1962), sacarose 3%, 2,5µM de ácido indolacético (IAA), 2,5µM de 6-benziladenina (6-BA), ágar a 0,8% e o pH ajustado para 5,5. As condições ambientais para obtenção e manutenção dos calos e posterior regeneração foram: fotoperíodo de 16 horas de luz a 600 lux e temperatura de 25 ± 3°C. Apesar de os calos se apresentarem constantemente com setores globulares esverdeados, distribuídos em toda a superfície, as plantas originadas pelo processo de organogênese tornaram-se raras após sete meses de cultura (4ª ou 5ª repicagem) e ausentes após dois anos. Portanto, realizou-se um experimento em dialélico (5 x 5), variando-se as concentrações de fitorreguladores (auxina x citocinina), além da manutenção dos frascos nas condições citadas, para indução da organogênese nesses calos. Os componentes inorgânicos basearam-se no meio MS adicionado de sacarose (3%) e ágar (0,8%), acertando-se o pH a 5,5. Com base nos resultados desse experimento, efetuou-se outro dialélico (3 x 3), abrangendo alguns tratamentos que apresentaram início de organogênese. A cultura de calos foi realizada nas mesmas condições de fotoperíodo e temperatura, aumentando-se apenas a intensidade de luz para 2.000 lux.

As diferentes combinações no dialélico (5 x 5) foram: 0, 0,5, 2,5, 5,5 e 10,0 μ M de IAA com 2,5, 5,0, 10,0, 25,0 e 50,0 μ M de 6-BA, totalizando 25 tratamentos. No dialélico (3 x 3), combinaram-se, respectivamente, o IAA e 6-BA nas concentrações de (0, 0,5 e 2,5 μ M) x (10,0, 25,0 e 50,0 μ M). Em cada experimento, inoculou-se apenas um calo com aproximadamente 1cm³ por frasco, num total de quinze repetições por tratamento.

Devido à ocorrência de contaminações por fungos e bactérias e de oxidações, por ocasião da transferência dos calos aos frascos de cultura, tornou-se variável o número de frascos com material viável para as avaliações de crescimento e regeneração dos calos. Estes foram avaliados após 30 dias de cultura, segundo uma escala subjetiva de notas, de 1 a 5: a nota 1 referiu-se à ausência ou ligeiro crescimento a partir do calo inicial (explante), sendo crescente até a nota 5, com, praticamente, três vezes esse volume.

Ao mesmo tempo, avaliou-se o número de plantas em desenvolvimento por tratamento, bem como o comprimento do caule, em centímetro, das mesmas. Destacaram-se as plantas obtidas dos calos, colocando-as em meio de cultura apropriado para o enraizamento e posterior adaptação das plantas híbridas visando ao transplante definitivo em casa de vegetação, segundo a metodologia de ILLG & SIQUEIRA (1984).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores obtidos quanto aos totais de explantes viáveis e sua distribuição nas notas de 1 a 5 para o desenvolvimento de calo, bem como o número de plantas regeneradas por tratamento no dialélico 5 x 5, encontram-se no quadro 1.

Considerando-se o somatório das porcentagens das notas 4 e 5, referentes aos maiores estádios de desenvolvimento dos calos, têm-se os valores de 57,1, 75,0 e 75,0% respectivamente para os tratamentos de 0,5, 2,5 e 5,0 μ M de IAA combinados com 2,5 μ M de 6-BA. Para maiores concentrações dos dois fitorreguladores, houve melhor resposta no crescimento dos calos (60,0%) apenas no tratamento com 10,0 μ M de IAA e 5,0 μ M de 6-BA. Os calos mantiveram-se com um aspecto friável e coloração verde-clara nos 25 tratamentos. No entanto, o aparecimento de gemas adventícias (setores globulares) e a regeneração de algumas plantas ocorreram nas combinações, em μ M, de IAA x 6-BA respectivamente de 0,0 e 10,0; 10,0 e 25,0 e 0,0 e 50,0.

A manutenção dos frascos contendo os tratamentos do dialélico 5 x 5, durante os trinta dias de cultura em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas luz (600 lux) e temperatura de 25 \pm 3°C, não incrementou satisfatória-

mente a regeneração de plantas. A repetição de parte desse dialélico com mudanças das condições de cultura para maior intensidade luminosa (2.000 lux) favoreceu a indução e desenvolvimento das plantas (Quadro 2).

QUADRO 1. Resultados do dialélico (5 x 5) quanto ao crescimento dos calos e regeneração de plantas, após 30 dias de cultura em fotoperíodo de 16 horas de luz a 600 lux e temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$

Tratamento		Total inoculado	Inviáveis = contaminação + oxidação	Viáveis	Crescimento calos ⁽¹⁾					Plantas com 2 a 3cm
IAA	6-BA				1	2	3	4	5	
μM	μM				%					n°
0,0	2,5	15	—	15	—	60,0	30,0	10,0	—	—
0,5	2,5	15	—	15	—	14,3	28,6	57,1	—	—
2,5	2,5	15	—	15	—	25,0	—	25,0	50,0	—
5,0	2,5	15	1	14	—	—	25,0	50,0	25,0	—
10,0	2,5	15	1	14	12,5	12,5	37,5	25,0	12,5	—
0,0	5,0	15	1	14	14,3	14,3	57,1	14,3	—	—
0,5	5,0	15	—	15	11,1	44,4	22,2	22,2	—	—
2,5	5,0	15	—	15	—	20,0	50,0	10,0	20,0	—
5,0	5,0	15	1	14	—	16,6	50,0	33,3	—	—
10,0	5,0	15	—	15	—	20,0	20,0	40,0	20,0	—
0,0	10,0	15	—	15	—	37,5	50,0	12,5	—	1
0,5	10,0	15	1	14	—	30,0	40,0	20,0	10,0	—
2,5	10,0	15	2	13	—	28,6	42,8	—	28,6	—
5,0	10,0	15	1	14	—	12,5	37,5	37,5	12,5	—
10,0	10,0	15	2	13	—	42,8	14,3	28,6	14,3	—
0,0	25,0	15	—	15	—	57,1	14,3	28,6	—	—
0,5	25,0	15	2	13	—	57,1	14,3	28,6	—	—
2,5	25,0	15	2	13	16,6	33,3	16,6	16,6	16,6	—
5,0	25,0	15	—	15	—	11,1	55,6	22,2	11,1	—
10,0	25,0	15	2	13	12,5	37,5	12,5	12,5	12,5	1
0,0	50,0	15	1	14	57,1	14,3	—	28,6	—	1
0,5	50,0	15	1	14	12,5	25,0	37,5	12,5	12,5	—
2,5	50,0	15	2	13	—	57,1	28,6	14,3	—	—
5,0	50,0	15	1	14	22,2	33,3	22,6	11,1	11,1	—
10,0	50,0	15	—	15	14,3	42,9	28,6	14,3	—	—

(¹) Notas de 1 a 5, de acordo com o desenvolvimento dos calos, sendo a nota 1 igual a nenhum ou ligeiro crescimento, até a nota 5, com cerca de três vezes o volume inicial do explante inoculado ($\pm 1 \text{ cm}^3$).

QUADRO 2. Resultados do dialélico (3 x 3) quanto ao crescimento dos calos e regeneração de plantas, após 30 dias de cultura em fotoperíodo de 16 horas de luz a 2.000 lux e temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$

Tratamento		Total inoculado	Inviáveis = contaminação + oxidação	Viáveis	Crescimento calos ⁽¹⁾					Plantas com 2 a 3cm
IAA	6-BA				1	2	3	4	5	
μM	μM				%					nº
0,0	10,0	15	2	13	-	30,8	38,4	30,8	-	3
0,5	10,0	15	2	13	-	-	76,9	13,1	-	12
2,5	10,0	15	1	14	-	35,7	57,2	7,1	-	-
0,0	25,0	15	3	12	35,0	32,0	16,5	16,5	-	10
0,5	25,0	15	2	13	30,8	30,8	30,8	7,7	-	7
2,5	25,0	15	-	15	16,6	27,8	27,8	27,8	-	8
0,0	50,0	15	-	15	40,0	33,3	6,7	20,0	-	13
0,5	50,0	15	-	15	31,3	37,5	18,7	12,5	-	7
2,5	50,0	15	-	15	11,8	41,2	17,6	29,4	-	-

(1) Notas de 1 a 5, de acordo com o desenvolvimento dos calos, sendo a nota 1 igual a nenhum ou ligeiro crescimento, até a nota 5, com cerca de três vezes o volume inicial do explante inoculado ($\pm 1 \text{ cm}^3$).

Sob essas condições ambientais, houve menor desenvolvimento dos calos, comparativamente ao experimento anterior, uma vez que, aos 30 dias de cultura, nenhum tratamento recebeu a nota 5. Esse fato sugere um tipo de competição, em decorrência da indução de gemas adventícias, seguido do desenvolvimento de plantas, em detrimento exclusivamente do crescimento dos calos. Aliado a esse provável efeito de competição, deve-se considerar o fenômeno da fotodegradação, apresentada pelo IAA como causa do reduzido desenvolvimento dos calos e rápida renegeração de plantas (organogênese), a exemplo do encontrado em alho por HAVRANEK & NOVAK (1973). Para essas condições, ao se agruparem os valores em porcentagem, obtidos nas notas 3 e 4, a combinação de $0,5\mu\text{M}$ de IAA com $10,0\mu\text{M}$ de 6-BA se mostrou mais satisfatória para crescimento dos calos (90,0%), simultaneamente ao processo de organogênese.

Em geral, no entanto, houve rápida formação de plantas em quase todos os tratamentos, durante os primeiros trinta dias de cultura dos calos, com exceção das combinações em μM de IAA e 6-BA: $2,5 \times 10,0$ e $2,5 \times 50,0$. Nota-se certa influência da citocinina 6-BA na indução e desenvolvimento de gemas adventícias ou de centros meristemáticos globulares a partir das células dos calos, nos tratamentos com ausência de auxina (IAA).

Portanto, calos de tomate com cerca de dois anos de cultura, com ausência ou reduzido potencial morfogenético, podem ser revigorados através da manipulação de fitorreguladores e condições ambientais de manutenção das culturas.

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

4. CONCLUSÕES

1) No dialélico 5 x 5, em condições de 16 horas de fotoperíodo (600 lux) e temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, houve preferencialmente o crescimento de calos nos tratamentos envolvendo as combinações de 0,5, 2,5 e $5,0\mu\text{M}$ de IAA com $2,5\mu\text{M}$ de 6-BA.

2) No dialélico 3 x 3, na condição de maior intensidade de luz, houve menor desenvolvimento dos calos, comparativamente ao dialélico 5 x 5, mas a organogênese ocorreu, na quase totalidade dos tratamentos, em apenas trinta dias de cultura. A combinação de $0,5\mu\text{M}$ de IAA e $10,0\mu\text{M}$ de 6-BA se mostrou mais adequada para o desenvolvimento dos calos, simultaneamente ao processo de regeneração de plantas. Notou-se a influência de elevadas concentrações de citocinina, 6-BA e intensidade de luz na indução de organogênese em calos de tomate com ausência ou reduzido potencial de regeneração de plantas.

SUMMARY

REGENERATION OF *LYCOPERSICON ESCULENTUM* X *L. PERUVIANUM* HYBRID PLANTS FROM TWO YEAR OLD CALLUS CULTURE

Callus from *Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum* interespecific hybrids cultured in vitro lost their morphogenetic abilities after two years. An attempt has been made to recover the organogenesis of those callus, using 5 x 5 and 3 x 3 diallelic combinations between indolacetic acid (IAA) and 6-benzyl-adenin (6-BA). Mineral salts and vitamins of the MS medium (Murashige & Skoog), were used, added with sucrose (3%) and agar (0.8%). Culture medium pH was kept at 5.5. The 5 x 5 diallelic treatments were incubated under the following conditions: day temperature = $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$; day lenght = 16 hours; light intensity = 600 lux. The 3 x 3 diallelic treatments were kept at the same conditions of daylight and temperature but at 2000 lux light intensity. Callus development and shoot formation were graded from 1 to 5, 30 days after inoculation. Shoot number and height were also evaluated. In

the 5 x 5 diallelic experiment, it was observed a low number of differentiated plants. The best combinations for callus development have been 0.5, 2.5 and 5.0 μ M of IAA with 2.5 μ M of 6-BA, respectively. However in the 3 x 3 diallelic experiment, it was recorded a high frequency of shoot formation, and the most efficient treatments were the 25.0 and 50.0 μ M concentrations of 6-BA, without any auxin. It was also observed the influence of environmental conditions (mainly light intensity) on the process.

Index terms: tissue culture, tomato, organogenesis, interspecific hybrid.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R.W. *Principles of plant breeding*. New York, John Wiley, 1960. 473p.
- HAVRANEK, P. & NOVAK, F.J. The bud formation in the callus cultures of *Allium sativum* L.Z. *Pflanzen. Physiol. Bd.*, **68**:S.:308-318, 1973.
- ILLG, R.D. & SIQUEIRA, W.J. High frequency of plant regeneration from leaf explants in six *Lycopersicon esculentum* Mill. Cultivars. *Revista Brasileira de Botânica*, **7**(1):1-4, 1984.
- KUT, S.A.; BRAVO, J.E. & EVANS, D.A. Tomato. In: *HANDBOOK of plant cell culture*. Crop. Species. New York, MacMillan Publishing, 1984. v. 3, p.247-289.
- MEREDITH, C.P. Shoot development in established callus cultures of cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Z. Pflanzenphysiol.*, **95**:405-411, 1979.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**:473-497, 1962.
- NOVAK, F.J. Phenotype and cytological status of plants regenerated from callus cultures of *Allium sativum* L. *Z. Pflanzenzüchtg.* **84**:250-260, 1980.
- RICK, C.M. Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. In: *THE BIOLOGY and taxonomy of the Solanaceae*. Great Britain, Henry Ling, 1979. p.667-678. (Linnean Society Symposium series, 7)
- . The potential of exotic germplasm for tomato improvement. In: *PLANT improvement and somatic cell genetics*. New York, Academic Press, 1982. p.1-28.
- . The tomato. In: *EVOLUTION of crop plants*. New York, Longman, 1976. p.268-273.
- SMITH, P.G. Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, **44**:413-416, 1944.
- THOMAS, B.R. & PRATT, D. Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryocallus. *Theoretical and Applied Genetics*, **59**:215-219, 1981.