**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Explorando a variação genética natural das espécies selvagens
relacionadas ao tomateiro no modelo Micro-Tom
(*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom)**

Fernando Angelo Piotto

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2007**

Fernando Angelo Piotto
Engenheiro Agrônomo

**Explorando a variação genética natural das espécies selvagens relacionadas
ao tomateiro no modelo Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom)**

Orientador:
Prof. Dr. ANTONIO VARGAS DE OLIVEIRA FIGUEIRA

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração: Genética
e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Piotto, Fernando Angelo

Explorando a variação genética natural das espécies selvagens relacionadas ao tomateiro no modelo Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom)/ Fernando Angelo Piotto. - - Piracicaba, 2007.

57 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Cruzamento vegetal 2. Melhoramento genético vegetal 3. Tomate 4. Variação genética em plantas I. Título

CDD 635.642

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais
Sebastião e Mara e minha tia Leila
pelo apoio incondicional nesses anos de estudo.*

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho:

Ao CNPq pela concessão da bolsa;

Ao Departamento de Genética da ESALQ/USP, pelo suporte acadêmico e apoio financeiro;

Ao meu orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira;

Ao professor Lázaro Eustáquio Pereira Peres, tanto pela orientação acadêmica como pela amizade;

A todas as pessoas que já passaram ou ainda fazem parte do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal: Rogério Falleiros Carvalho, Simone Pacheco Lombardi, LÍlian Elen Pino-Nunes, Tatiana Bistaco Farinha, Marcelo Latarullo, Clarissa Goldenberg, Mariana da Silva Azevedo, Juliana Aparecida da Silva, Raphael Malandrino, Ricardo Fornazier, Joni Lima, Agustín Zsögön, Joane, Angélica Pitelli, Thiago Peres, Thiago Tremocoldi Dantas e Luiz.

Aos técnicos Romeu, Miranda e Vitti;

Agradeço a secretária da pós-graduação Léia, por resolver todos nossos problemas burocráticos no departamento;

Aos amigos de República: Renato, Érick, Marco, Alexandre, Bruno, André e Éder;

A Mariana da Silva Azevedo; Ana Carolina C. de Negreiros Alves e Marcelo Latarullo pela ajuda na formatação e revisão da dissertação;

Aos amigos Marcelo Mollinari e Rogério Carvalho, por compartilharem os alegres momentos difíceis;

Agradeço também minha família e a todos meus amigos, pelo apoio nas horas difíceis e pelos momentos de alegria.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 DESENVOLVIMENTO	13
2.1 Revisão da literatura	13
2.1.1 Aspectos gerais sobre a variação genética natural das espécies selvagens relacionadas ao tomateiro	13
2.1.2 Micro-Tom como modelo de estudos genéticos e fisiológicos.....	18
2.2 Material e métodos.....	22
2.2.1 Material vegetal.....	22
2.2.2 Infra-estrutura.....	23
2.2.3 Germinação e cultivo.....	23
2.2.4 Cruzamentos e seleção.....	24
2.2.5 Parâmetros de avaliação.....	24
2.2.6 Identificação e triagem dos alelos de interesse.....	25
2.2.7 Estudo dos caracteres selecionados.....	25
2.2.8 Curva de dose-resposta a ácido giberélico (GA ₃)	26
2.2.9 Teste de germinação.....	26
2.3 Resultados e discussão.....	27
2.3.1 Explorando a diversidade genética natural das espécies selvagens relacionadas ao tomateiro	27
2.3.2 Usando a cv MT para explorar a variação genética natural das espécies selvagens de tomateiro	28
2.3.3 Novas características e possíveis novos alelos isolados das espécies selvagens	29
2.3.4 <i>Solanum galapagense</i>	31
2.3.4.1 Fruto verde escuro	31

2.3.4.2 Fruto bicolor	32
2.3.4.3 Frutos pilosos	34
2.3.4.4 Porte reduzido	34
2.3.5 <i>Solanum chmielewskii</i>	38
2.3.5.1 Fruto opaco	38
2.3.6 <i>Solanum neorickii</i>	38
2.3.6.1 Frutos rosa-salmão	38
2.3.6.2 Inflorescências duplas	39
2.3.7 <i>Solanum pimpinellifolium</i>	39
2.3.7.1 Número elevado de flores	39
2.3.7.2 Estudo da base genética do número de flores	40
2.3.7.3 Isolando componentes genéticos que levam ao aumento no número de flores por inflorescência de <i>S. pimpinellifolium</i>	40
2.3.7.4 Segregação para o número de Flores por Inflorescência (F/I)	43
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	56

RESUMO

Explorando a variação genética natural das espécies selvagens relacionadas ao tomateiro no modelo Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom)

As espécies selvagens relacionadas ao tomateiro desenvolveram-se em uma ampla gama de latitudes que compreende o sul do Equador ao norte do Chile, ocupando diferentes habitats e constituindo uma fonte de diversidade genética natural. Essa diversidade tem sido utilizada no melhoramento de tomateiro, sobretudo para introgressão de genes de resistência a patógenos e mais recentemente de genes afetando a qualidade dos frutos. Embora a variação genética natural tenha a relevância de algo que foi selecionado na natureza e que pode ter implicações evolutivas, ela ainda é pouco explorada em estudos básicos. Para o uso intensivo desse recurso é necessário lançar mão de cruzamentos e retrocruzamentos em larga escala entre as espécies selvagens e o tomateiro cultivado (*Solanum lycopersicum*). Para tanto, dispomos de uma cultivar miniatura de tomateiro, a cv Micro-Tom (MT), a qual pode crescer nas mesmas condições requeridas para a planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Com o uso da cv MT, podemos explorar de forma adequada a variação genética natural das espécies selvagens de tomateiro, sendo que a identificação de alterações fenotípicas é muito mais evidente quando podemos visualizar a planta como um todo. Dessa forma, vários alelos ainda não conhecidos foram resgatados dessas espécies, os quais levam a fenótipos distintos daqueles encontrados nos parentais, tais como frutos cor rosa-salmão vindo de *S. neorickii*, frutos de superfície opaca vindo de *S. chmielewskii* e frutos de coloração verde escuro vindo de *S. galapagense*. Esse modelo parece ser de especial importância para isolar genes de efeito maior. Assim, isolamos um *locus* vindo de *S. pimpinellifolium* que aumenta o número de flores por inflorescência da cv MT de 7 para 11. Sendo o tomateiro uma planta cultivada, os alelos oriundos das espécies selvagens, além de úteis para estudos genéticos e fisiológicos, podem ser aproveitados em programas de pré-melhoramento.

Palavras-Chave: Espécies Selvagens, Variação Genética Natural, cv Micro-Tom.

ABSTRACT

Exploring natural genetic variation from wild species related to tomato in the Micro-Tom model (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom)

Tomato wild species evolved in a wide range of latitudes, from the south of Ecuador to the north of Chile, which comprise different habitats and are a source of natural genetic variation. This diversity is commonly used in tomato breeding, especially for the introgression of genes for resistance to pathogens and, recently, for fruit quality. Although natural genetic variation usually has an adaptive significance, which means that it may have evolutionary implications, it is still poorly explored in basic research. For the intensive utilization of this resource, it is necessary to perform large scale crosses and backcrosses between wild species and cultivated tomato. Aiming to this purpose, we used the miniature tomato cultivar, cv Micro-Tom (MT), which can growth in the same minimum requirements of the *Arabidopsis thaliana* model. Using MT one can adequately explore the natural genetic variation of wild species with less time and space requirements. In addition, phenotypical alterations are more evident in MT, since one can easily visualize the whole plant. Thus, alleles hitherto unknown were isolated from tomato wild related species, leading to distinct phenotypes, such as pink-salmon fruits from *S. neorickii*, opaque fruit surface from *S. chmielewskii* and dark green fruits from *S. galapagense*. The MT model seems to be particularly adequate for the isolation of major genes and QTLs of great effects. Thereby, we had isolated a *S. pimpinellifolium* locus that increases the number of flowers per inflorescence, from 7 to 11, in MT. Being the tomato a cultivated plant, the alleles obtained in the wild species, besides to be useful for genetic and physiological studies, can be used in pre-breeding programs.

Key-words: Wild Species; Natural Genetic Variation; cv Micro-Tom

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Uso do modelo da cv MT para explorar a variação genética natural das espécies de tomateiro. A) alterações no fenótipo da mutação *Pts*, quando isolada no background da cv MT. B) cv MT com alelo selvagem *D* (*Dwarf*) introgridido. C) estrutura de cultivo da cv MT em casa de vegetação. Sistema de canaletas é usado para suporte e irrigação das plantas. D) cv MT de crescimento indeterminado (*Sp*) comparada com a cv MT padrão, de crescimento determinado (*sp*). Barra = 20 mm. Vaso menor diâmetro = 80 mm. Vaso maior diâmetro = 200 mm 19
- Figura 2** – Alelos isolados das espécies selvagens de tomateiro que afetam fenótipo dos frutos. A) diversidade fenotípica de cores nos frutos encontradas na geração F3, do cruzamento da cv MT com *S. neorickii*. B) fruto rosa-salmão vindo de *S. neorickii*. C) detalhe do fenótipo do fruto rosa-salmão. D) fruto bicolor isolado de *S. galapagense*. E) fruto verde escuro vindo de *S. galapagense*. F) frutos pilosos isolados de *S. galapagense*. G) fruto opaco isolado de *S. chmielewskii*. Barra = 20 mm 32
- Figura 3** – Variação genética natural afetando a morfologia da planta. A) linhagem com 13 flores vinda de *S. pimpinellifolium*. B) planta com caule fino vinda de *S. neorickii*. C) linhagem com inflorescência dupla contendo 4 flores cada vinda de *S. neorickii*. D) plantas de porte baixo isoladas de *S. galapagense*. E) *Petroselinum* BC6Fn comparado a com *Pts* na geração BC1F3, vinda *S. galapagense*. Barra = 20 mm. Vaso diâmetro = 80 mm 34
- Figura 4** – Teste de sensibilidade a giberelinas. A) curva de dose-resposta ao ácido giberélico (GA₃), dos genótipos BC1F3 isolado de *S. galapagense* e da cv MT. B) teste de germinação dos genótipos BC1F3, em água destilada e solução de GA₃ 100µM e da cv MT em água destilada 36

Figura 5 – Teste de segregação para número de flores por inflorescência. A) segregação do número de flores por inflorescência da geração BC3F2 de introgressão do alelo isolado de *S. pimpinellifolium* na cv MT. B) número de flores por inflorescência da cv MT.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características avaliadas nas populações de cruzamentos com espécies selvagens	24
Tabela 2 – Características observadas nas populações de recombinação das espécies selvagens com a cv MT.....	29

1 INTRODUÇÃO

A domesticação das plantas e o desenvolvimento da agricultura ocorreram quando o homem, consciente ou inconscientemente, selecionou características de importância para seu uso. Desde os primórdios até os dias atuais, as práticas de melhoramento genético vêm atuando no sentido de concentrar alelos que sejam importantes no ambiente agrícola, levando ao estreitamento considerável da base genética das atuais plantas cultivadas.

Muitos esforços têm sido direcionados no sentido de ampliar a diversidade alélica das atuais plantas cultivadas e disponibilizar recursos genéticos para trabalhar com questões tais como estresses bióticos e abióticos, produtividade, qualidade nutricional, entre outros. Contudo, nas duas décadas passadas grande parte desses esforços foram concentrados em estudos envolvendo transgenia. O uso de OGM's (Organismos Geneticamente Modificados) ainda é muito restrito no ambiente agrícola devido a várias barreiras de ordem burocrática e de opinião pública. A mutagênese também é uma alternativa para ampliar a diversidade genética das espécies cultivadas. Contudo, naqueles genes onde a espécie ou cultivar em questão já possui alelos nulos, o uso desse método não é tão efetivo.

Uma terceira opção para aumentar a diversidade alélica de uma espécie cultivada seria a hibridação com espécies selvagens relacionadas. Tais espécies costumam carregar variações genéticas naturais, ou seja, características monogênicas ou poligênicas que foram preservadas durante a evolução das espécies e que podem significar ganho adaptativo. Uma ferramenta muito importante para resgatar alelos das espécies selvagens é a confecção Linhagens de Introgessão (IL's). As IL's são linhagens de uma cultivar de referência que contém, cada uma, um seguimento cromossômico vindo de uma espécie selvagem, de forma que as linhagens se complementem, abrangendo todo conjunto cromossômico da espécie. Uma das poucas limitações dessa ferramenta é a necessidade de existirem IL's para as espécies que se deseja trabalhar. Para isso, seria necessário marcadores moleculares específicos para cada caso.

Uma das maneiras mais fáceis e baratas de explorar a variação genética natural de um gênero é realizar cruzamentos e retrocruzamentos com espécies relacionadas, usando uma cultivar de referência. Esse procedimento é bastante usado em programas de pré-melhoramento, principalmente quando o foco é buscar genes de resistência/tolerância a diversas pragas e doenças. Contudo, resgatar alelos de espécies selvagens por meio desse método torna-se bastante oneroso, devido à necessidade de se gerar e avaliar grandes populações em campo. Uma das alternativas para esse problema seria usar plantas modelo, as quais pudessem crescer em estruturas de laboratório.

Dentre as diversas plantas modelo conhecidas, a cultivar miniatura de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. Syn. *Lycopersicon esculentum* Mill.) Micro-Tom (MT) apresenta a vantagem adicional de ser uma planta cultivada, facilitando a transposição de resultados obtidos em laboratório para situações práticas de campo. Assim, a cv MT pode ser usada para explorar a variação genética natural das espécies selvagens de tomateiro, facilitando o resgate de alelos novos dessas espécies, os quais são de grande relevância para estudos de genética, fisiologia vegetal e aplicações no melhoramento.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Aspectos gerais sobre a variação genética natural das espécies selvagens relacionadas ao tomateiro

O gênero *Lycopersicon* era composto por nove espécies: *L. esculentum* var. *ceraciforme*, *L. pimpinellifolium*, *L. cheesmaniae*, *L. parviflorum*, *L. chmielewskii*, *L. hirsutum*, *L. peruvianum*, *L. chilense* e *L. pennellii*. Recentemente, alguns trabalhos têm mostrado que geneticamente as espécies de tomateiro são muito próximas do gênero *Solanum* e, assim, essas espécies foram classificadas novamente como sendo parte desse gênero (PERALTA; SPOONER, 2000; PERALTA; SPOONER, 2001). A nomenclatura atual das espécies selvagens de tomateiro, juntamente com suas sinonímias, estão resumidas no anexo 1.

As espécies selvagens de tomateiro desenvolveram-se em uma ampla gama de latitudes que compreende desde o sul do Equador até o norte do Chile (WARNOCK, 1991). Tais latitudes apresentam condições ambientais contrastantes, levando à ocorrência de grande diversidade genética nessas espécies (RICK, 1973). Entre os ambientes explorados pelas espécies selvagens de tomateiro, é possível encontrar regiões alagadas ou extremamente secas, de altitudes elevadas e condições salinas de solo. Como exemplo, temos *Solanum pennellii* que pode sobreviver com um sistema radicular pobre em áreas completamente desprovidas de chuvas, enquanto que *S. galapagense* e *S. cheesmaniae* podem crescer em terras inundadas por água do mar, nas Ilhas Galápagos (TAYLOR, 1986). Adicionalmente, *S. habrochaites* é caracteristicamente encontrado em regiões de altas altitudes (3000 m), onde as temperaturas noturnas chegam a ficar abaixo de 0 °C. Essas situações desfavoráveis têm atuado como uma pressão de seleção para resistência à seca (MARTIN; THORSTENSON, 1988; KAHN et al., 1993; KEBEDE et al., 1994), salinidade (RUSH; EPSTEIN, 1981) e frio (PATTERSON et al., 1978; PATTERSON, 1982) dentro dessas espécies. Além disso, algumas delas são conhecidas como sendo fontes de resistência

a estresses bióticos, tais como resistência a pragas derivada de *S. habrochaites* (WILLIAMS et al., 1980; MALUF et al., 1997; GONÇALVES et al., 1998; MALUF et al., 2001; FREITAS et al., 2002) e *S. pennellii* (RESENDE et al., 2002) e resistência a doenças vinda principalmente de *S. peruvianum* (ROSSI et al. 1998; HALL, 1980; BROMMONSCHENKEL; TANKSLEY, 1997) e *S. pimpinellifolium* (NAGAI; COSTA, 1972; JONES et al., 1994; KAWCHUK et al., 2001; MARTIN et al., 1993).

Embora muitas das características citadas acima possam ser de caráter poligênico, o que dificulta a criação de linhagens quase isogênicas após sua passagem para o tomateiro cultivado, já há consideráveis evidências de herança monogênica de muitas delas. Desse modo, variações alélicas naturais já foram descritas influenciando o tamanho (FRARY et al., 2000), o conteúdo de carotenóides (TOMES, 1969; STOMMEL; HAYNES, 1994) e o metabolismo de açúcares (FRIDMAN et al., 2004; CHETELAT et al., 1995) dos frutos, além dos conhecidos genes de resistência a doenças provocadas por vírus (NAGAI; COSTA, 1972; HALL, 1980; BROMMONSCHENKEL; TANKSLEY, 1997), fungos (HUANG et al., 2000; JONES et al., 1994; KAWCHUK et al., 2001; MESBAH et al., 1999; SIMONS et al., 1998), bactérias (MARTIN et al., 1993) e nematóides (ROSSI et al., 1998).

Vários genes de resistência a doenças são conhecidos em tomateiro, tais como os genes *Ve*, *I*, *Mi* e *Tm-2*, encontrados nas cultivares chamadas VFNT e que conferem resistência aos fungos *Verticillium* e *Fusarium*, nematóides do gênero *Meloidogyne* e ao *Tobacco Mosaic Vírus* (TMV). Praticamente todos os genes que conferem resistência a doenças são derivados de cruzamentos com espécies selvagens de tomateiro, tais como *S. pimpinellifolium* e *S. peruvianum* (TAYLOR, 1986).

Partindo do princípio de que todas as espécies selvagens de tomateiro podem ser cruzadas com maior ou menor dificuldade com o tomateiro cultivado (HOGENBOOM, 1972; THOMAS; PRATT, 1981; STEVENS; RICK, 1986), muitos alelos selvagens vêm sendo isolados em *Solanum lycopersicum* a partir de cruzamentos com essas espécies. De fato, diversas mutações importantes que são conhecidas no tomateiro cultivado são na verdade provenientes de espécies selvagens. Entre elas estão as mutações *Beta* (*Beta-carotene*) e *Del* (*Delta-carotene*), as quais estão presentes em algumas espécies que possuem frutos verdes como *S. habrochaites*, mas

que ao se recombinarem com genes do tomateiro cultivados rendem plantas acumulando β -caroteno e δ -caroteno ao invés de licopeno (RONEN et al., 2000; TOMES, 1969). Algo similar ocorre com a mutação recessiva *r* (*yellow flesh*) encontrada em *S. pennellii* (LIU et al., 2003), a qual resulta de uma perda de função do gene da fiteno sintase, levando a formação de frutos amarelos (FRAY; GRIERSON, 1993). A mutação *y* (*colorless fruit epidermis*), também presente de *S. pennellii*, faz com que a epiderme dos frutos fique transparente, dando um aspecto rosa a sua superfície. As mutações *atv* (*atroviolace*) e *lp* (*Intense pigment*), as quais representam respostas alteradas a luz (KENDRICK et al., 1997), dando coloração verde-escuro as plantas, foram introduzidas no tomateiro cultivado a partir de *S. cheesmaniae* e *S. chmielewskii*, respectivamente. Já as mutações *Aft* (*Anthocyanin fruit*) e *Abg* (*Aubergine*), isoladas de *S. chilense* (GIORGIEV, 1972) e *S. lycopersicoides* (RICK et al., 1994), respectivamente, levam ao acúmulo de antocianinas (favonóides) nos frutos.

Além dos genes de resistência a doenças, algumas variações genéticas naturais são de grande importância para tomaticultura e vêm sendo usadas intensivamente, como é caso da mutação *j2* (*jointless2*) vinda de *S. cheesmaniae* (RICK, 1956), a qual impede a formação da camada de abscisão no pedúnculo, fazendo com que o cálice permaneça na planta, e não no fruto, durante a colheita. Isso adquire importância especial quando se trata da colheita mecanizada do tomate para produção de molhos.

Em relação a desenvolvimento vegetativo do tomateiro, temos que as plantas podem ser de hábito de crescimento determinado ou indeterminado. O crescimento determinado do tomateiro ocorre devido a mutação *selfpruning* (*sp*), que apareceu espontaneamente na Flórida em 1914 e desde então tem sido usada extensivamente nos programas de melhoramento de tomateiro para indústria de molhos (RICK, 1978). Já o alelo selvagem *Self-pruning* (*Sp*) é responsável pelo hábito de crescimento indeterminado, típico das cultivares de tomate para mesa e das espécies selvagens relacionadas ao tomateiro. Contudo, hoje sabemos que o gene *SELF-PRUNING* faz parte de uma pequena família de 6 genes que atuam no controle do hábito de crescimento. Esses genes estão mapeados nos cromossomos 2 (*SP2I*), 3 (*SP3D*), 5 (*SP5G*), 6 (*SP6A* e *SP*) e 9 (*SP9D*) do tomateiro e de outras espécies selvagens, como por exemplo, *S. pennellii* (CARMEL-GOREN et al., 2003). Quando o alelo do

cromossomo 9 (*SP9D*) proveniente *S. pennellii* é introgridido em cultivares de tomateiro contendo o alelo mutante *sp*, o qual está no cromossomo 6, as plantas resultantes podem apresentar hábitos de crescimento intermediário entre o determinado e o indeterminado, ou seja, semi-determinado (FRIDMAN et al., 2001).

Um outro aspecto importante do crescimento vegetativo é a arquitetura foliar. Dentre os vários mutantes conhecidos em tomateiro afetando o formato das folhas (KESSLER et al., 2001), *Petroselinum* (*Pts*) (RICK, 1980) e *potato-leaf* (*c*) (RICK; BUTLER, 1956) representam duas variações genéticas naturais fenotipicamente opostas. O mutante *Pts*, de dominância incompleta, possui bordos foliares muito recortados com 3 a 4 pares de folíolos, enquanto *c* apresenta folhas com margens inteiras e somente 1 ou 2 pares de folíolos. *Pts* e *c* foram isoladas de *Solanum galapagense* (RICK, 1983) e *S. chilense* (SCOTT, 2002), respectivamente. Algo curioso é que *S. chilense* possui folhas recortadas parecidas com folhas de samambaia (RICK; LAMM, 1955), não sendo observado o fenótipo do alelo *c* nesse background, o qual pode aparecer a partir de cruzamentos com *S. lycopersicum*.

A pilosidade nas plantas também é outra característica que apresenta grande variabilidade entre as espécies. *S. habrochaites*, *S. galapagense* e *S. cheesmaniae* são espécies que apresentam grande quantidade de tricomas no caule, folhas e frutos, quando comparadas com as outras espécies selvagens e o tomateiro. De outro lado, *S. pimpinellifolium* e *S. chmielewskii* são fontes da mutação *hairs absent* (*h*), que faz com as plantas fiquem glabras. Embora o ganho adaptativo de tais variações possa ser evidente, dependendo do habitat de cada espécie, poucos estudos foram feitos nesse sentido. No caso de *S. habrochaites*, o qual também é conhecido por ser bastante resistente a artrópodes (WILLIAMS et al, 1980), seus tricomas parecem ser fontes de aleloquímicos importantes.

Além dos caracteres monogênicos mencionados, muitos QTL's (*Quantitative Trait Loci*) que controlam caracteres complexos também vêm sendo isolados de espécies selvagens. Assim, a partir de *S. pennellii* foram identificados QTL's para tamanho e composição de frutos (CAUSSE et al., 2004), QTL's relacionados com o acréscimo de sólidos solúveis totais (TSS) (FRIDMAN et al., 2001) e QTL's ligados a produtividade (ESHED; ZAMIR, 1995).

É interessante notar que muitas das variações naturais monogênicas aqui mencionadas foram clonadas e seqüenciadas (MARTIN et al., 1993; ROSSI et al., 1998; JONES et al., 1994; KAWCHUK et al., 2001). Tais genes são de grande importância para estudos genéticos e fisiológicos, já que o tomateiro é considerada uma planta modelo para estudos básicos. Contudo, é pouco provável que algumas das variações genéticas naturais mencionadas acima possam ser obtidas nas atuais cultivares de tomateiro a partir de indução de mutagênese ou transgenia. Desse modo, uma alternativa viável para se ter acesso a essas variações seria a introgressão em uma cultivar de referência, por meio de cruzamentos e retrocruzamentos, daquelas que estejam ligadas a caracteres monogênicos ou a QTL's de grande efeito.

2.1.2 Micro-Tom como modelo de estudos genéticos e fisiológicos

Uma vantagem adicional para o uso do tomateiro em estudos básicos é a existência da cultivar miniatura denominada Micro-Tom (MT), criada para fins ornamentais (SCOTT; HARBAUGH, 1989) e proposta por Meissner et al. (1997) como modelo genético. De forma similar à planta modelo *Arabidopsis thaliana*, a cv MT pode ser cultivada em estruturas mínimas de laboratório (figura 1 C), produzindo frutos e sementes viáveis em vasos de menos de 50 mL de substrato, com ciclo que varia de 80 a 90 dias (PERES et al., 2001). Desde que foi proposta como modelo genético, a cv MT tem sido usada para estudos genéticos e fisiológicos (DAVID-SCHWARTZ et al. 2001; LI et al. 2004; TIEMAN et al. 2001; ISAACSON et al. 2002; VOGG et al. 2004; WANG et al. 2005), sendo que hoje há grandes coleções de mutantes nessa cultivar, sejam esses induzidos por raios gama (MATSUKURA et al., 2007), EMS (MEISSNER et al., 1997; WATANABE et al., 2007) ou pela inserção de T-DNA (MATHEWS et al., 2003) e elementos de transposição (MEISSNER et al., 2000). Além disso, bancos de EST's específicos para a cv MT foram construídos no Kazuza Institute no Japão (YANO et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2005).

Embora as mutações induzidas em MT sejam muito úteis para estudos genômicos (EMMANUEL; LEVY, 2002), elas possuem a desvantagem de carecerem de informação quanto ao efeito e a função gênica dos possíveis novos mutantes que por

ventura tenham sido gerados. Além disso, para aqueles genes onde MT já possui alelos nulos (ex. *self-pruning*, *uniform fruit* e *dwarf*), a mutagênese não gerará variações. Tais variações só podem ser conseguidas a partir da introgressão de variações genéticas naturais vindas de outras cultivares ou espécies selvagens, por meio de cruzamentos e retrocruzamentos sucessivos (ALONSO-BLANCO; KOORNNEEF, 2000). Além de ser portadora de alelos nulos que levam a um crescimento determinado (*self-pruning*) e ausência de ombro verde nos frutos (*uniform fruit*), pelo menos duas mutações recessivas são responsáveis pelo fenótipo anão de MT, sendo uma delas alélica à mutação *dwarf* (LIMA et al., 2004; MARTI et al., 2006). Hoje se sabe que a mutação *dwarf* é em um componente da via biossintética de brassinoesteróides (BISHOP et al., 1999). Isso implica que MT possui níveis reduzidos de brassinoesteróides, embora não seja uma mutação drástica como ocorre em outros mutantes de tomateiro deficientes ou insensíveis a essa classe hormonal (KOKA et al., 2000). Apesar de não se conhecer a natureza da segunda mutação de nanismo em MT, essa cultivar não é um mutante deficiente ou insensível a GA, já que possui níveis endógenos não alterados de GA (MARTI et al., 2006) e, ao contrário dos mutantes de tomateiro nesse hormônio (KOORNNEEF et al., 1990), MT não possui alterações na germinação de sementes ou o extremo encurtamento dos entrenós.

Embora a deficiência em brassinoesteróides pareça não interferir no fenótipo de outros mutantes introgridos sob esse background, atualmente está sendo finalizada, no laboratório de controle hormonal do desenvolvimento vegetal ESALQ/USP, a introgressão do alelo selvagem *DWARF* (*D*) na cv MT. Assim, para aquelas características onde haja a possibilidade do efeito do alelo *dwarf* (*d*) interferir no fenótipo de outros alelos introgridos, a cv MT-*DD* será muito importante (figura 1 B). Adicionalmente, o alelo selvagem *Sp* (*Self-pruning*), que condiciona crescimento indeterminado nas plantas, também já se encontra sob o background da cv MT (figura 1 D), sendo uma ferramenta adicional para estudos onde o hábito de crescimento seja um dos fatores a ser considerado.

Figura 1 – Uso do modelo da cv MT para explorar a variação genética natural das espécies de tomateiro. A) alterações no fenótipo da mutação *Pts*, quando isolada no background da cv MT. B) cv MT com alelo selvagem *D* (*Dwarf*) introgridido. C) estrutura de cultivo da cv MT em casa de vegetação. Sistema de canaletas é usado para suporte e irrigação das plantas. D) cv MT de crescimento indeterminado (*Sp*) comparada com a cv MT padrão, de crescimento determinado (*sp*). Barra = 20 mm. Vaso menor diâmetro = 80 mm. Vaso maior diâmetro = 200 mm

Apesar de a cv MT estar sendo cada vez mais usado para pesquisas no mundo inteiro, esse modelo tem sido pouco usado para explorar a variação genética natural existente nas espécies selvagens relacionadas ao tomateiro. A introgressão da variação genética natural *Rg1* vinda de *S. peruvianum*, para a cv MT (LIMA et al., 2004), é um exemplo bem sucedido disso. A alta capacidade de regeneração de tecidos *in vitro* causada pelo *Rg1* (KOORNNEEF et al., 1993) poderá facilitar a produção de transgênicos em larga escala por “tagging” na cv MT (MATHEWS et al., 2003). Esse fato, além de contribuir para a melhoria do próprio modelo da cv MT, pode gerar materiais com uso potencial no melhoramento de plantas.

Em nossa equipe, além de vários alelos novos vindos das espécies selvagens, também foram introduzidas na cv MT algumas variações genéticas naturais conhecidas, tais como *B*, *r*, *h*, *c* e *Pts*. A mutação *Pts* encontrada em *S. galapagense*, é um bom exemplo de como o fenótipo de tais mutantes pode ser alterado quando é transferido para outro background. A figura 1 A mostra a arquitetura foliar de uma folha da cv MT comparada com *Pts* ainda na geração BC1F3 e *Pts* isogênico a cv MT. É fácil notar que o nível de recorte das folhas é mais acentuado quando ainda há parte do conteúdo genético da espécie selvagem na linhagem. Assim, ao isolarmos *Pts* na cv MT, pode-se observar o efeito desse alelo sem a interferência de outros, concluindo que devem existir outros fatores genéticos contribuindo para esse fenótipo, tal como ele ocorre na espécie selvagem.

A partir dessas observações, é possível propor uma nova abordagem para explorar a variação genética natural das espécies relacionadas ao tomateiro. Assim, a cv MT pode ser usada para realizar cruzamentos com as espécies selvagens relacionadas ao tomateiro, praticando-se a seleção de novas características que se mostrarem monogênicas e fazendo sua introgressão na cv MT até a obtenção de linhagens quase isogênicas (NIL's). O porte reduzido da cv MT tem a vantagem adicional de permitir a visualização da planta como um todo e de viabilizar a instalação de grandes populações em pequenas áreas (figura 1 C). Isso facilita muito a seleção de novos caracteres uma vez que as condições ambientais podem ser controladas, de modo que os fenótipos das variações genéticas sejam mais facilmente observados.

A obtenção de tais NIL's contendo novos alelos vindos de espécies selvagens, pode gerar materiais extremamente importantes para estudos relacionados a genética, fisiologia vegetal e melhoramento genético do tomateiro, além da possibilidade de seu uso para fins de estudos envolvendo ecologia e evolução dessas espécies.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material vegetal

Todas as espécies selvagens foram obtidas no Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças da Embrapa, situada em Brasília-DF, e mantidas no Banco de Germoplasma do Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres, do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP. As espécies selvagens de tomateiro podem ser divididas em dois grupos, conforme a cor dos frutos.

Grupo 1: frutos vermelhos e laranjas:

- *Solanum lycopersicum* var *cerasiforme*
- *Solanum pimpinellifolium*
- *Solanum galapagense*
- *Solanum cheesmaniae*

Grupo 2: frutos amarelados e verdes:

- *Solanum chmielewskii*
- *Solanum neorickii*
- *Solanum habrochaites*
- *Solanum peruvianum*
- *Solanum chilense*
- *Solanum pennellii*

Para a execução deste trabalho foram selecionadas duas espécies em cada grupo, sendo *Solanum pimpinellifolium* CNPH 384 e *Solanum galapagense* CNPH 432 (LA1401), representando o grupo 1 e *Solanum chmielewskii* CNPH 944 e *Solanum neorickii* CNPH 945 representando o grupo 2.

2.2.2 Infra-estrutura

Todo o trabalho de cruzamento e seleção foi realizado na casa de vegetação do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP. A estrutura que temos disponível para o cultivo de grande número de plantas pode ser visualizada na seguinte página:

<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/protocol/ManualCasa.pdf>

2.2.3 Germinação e cultivo

As sementes das espécies selvagens usadas foram germinadas em bandejas individuais e posteriormente transplantadas para vasos de 10 L contendo substrato Plantmax (nome comercial) e vermiculita, na proporção 1:1. Essa mistura foi acrescida NPK (10:10:10) e calcário, na proporção de 1g e 4g por litro, respectivamente. Para as sementes de *S. galapagense*, as quais apresentam dormência, foi realizado um pré-tratamento com solução 50% de hipoclorito de sódio (HClO) comercial, a qual normalmente possui 2,7% de princípio ativo, por 30 minutos e germinação em gerbox no escuro. Uma vez iniciada a emissão da radícula, as sementes foram levadas para a estufa e colocadas em bandejas com substrato, conforme descrito acima. Em cada bandeja foram semeadas entre 230 a 250 sementes, as quais originaram aproximadamente 200 plântulas.

Mais detalhes sobre o cultivo da cv Micro-Tom em casa de vegetação podem ser obtidos na seguinte página:

<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/protocol/ManualCultivo.PDF>

2.2.4 Cruzamentos e seleção

Inicialmente, as espécies selvagens foram cruzadas com a cv MT, dando origem à geração F1. As populações F2, obtidas a partir da auto-fecundação das plantas F1, foram submetidas a uma primeira seleção para porte reduzido. Cada bandeja deu origem a aproximadamente 200 plantas, das quais as 150 mais altas foram eliminadas, sendo transplantadas perto de 50 plantas de cada bandeja. A população F2 inicial para cada espécie selvagem contou com aproximadamente entre 400 e 600 plantas, dando origem a uma população de 100 a 150 plantas selecionadas para porte micro. A partir dessa primeira triagem, foi iniciada a seleção de plantas que apresentassem fenótipos aparentemente distintos dos fenótipos dos parentais. Essas plantas foram então retrocruzadas com a cv MT, dando origem à geração BC1. Após a primeira triagem de plantas e realização do primeiro retrocruzamento, foram usadas populações menores, contando com 10 a 15 plantas por linhagem para facilitar o manejo. Detalhes sobre o processo de cruzamentos e seleção podem ser obtidos na seguinte página:

<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/protocol/ManuaCruzamentos.PDF>

2.2.5 Parâmetros de avaliação

As plantas de cada população gerada foram observadas e avaliadas ao longo de todo seu ciclo. O propósito desse trabalho foi selecionar caracteres que levassem a alterações morfológicas, relativamente de fácil observação quando comparadas com a cv MT. Para isso, foi necessário delimitar, para a avaliação, algumas características que abrangessem morfológicamente a planta como um todo (Tabela 1).

Tabela 1 – Características avaliadas nas populações de cruzamentos com espécies selvagens

Fase vegetativa (0 a 35 dias)	Fase reprodutiva (36 a 80 dias)
Recorte e número de folíolos	Número e formato de pétalas
Coloração das folhas	Cor das flores
Espessura do caule	Morfologia das inflorescências
Coloração do caule	Número de flores / inflorescência
Pilosidade da planta	Formato dos frutos
Altura da planta	Cor dos frutos

2.2.6 Identificação e triagem dos alelos de interesse

Como dito anteriormente, foram buscadas nas gerações segregantes características que não eram comuns à cv MT, e as vezes não presentes na espécies selvagens, ou seja, produtos da recombinação. Contudo, alguns alelos já conhecidos também foram resgatados dessas espécies e isolados na cv MT.

2.2.7 Estudo dos caracteres selecionados

A prioridade desse trabalho foi encontrar e isolar caracteres monogênicos. O estudo desses caracteres ficou restrito a uma abordagem geral descritiva e registro fotográfico. No entanto, foi isolado um componente genético de *S. pimpinellifolium*, o qual afeta o número de flores por inflorescência. Nesse caso, foi realizado um teste de segregação na geração BC3F2 para essa característica, com uma população de 139 plantas. Foram avaliadas as 3 primeiras inflorescências de cada uma das plantas dessa população segregante, cujas médias foram transformadas em números inteiros e os dados organizados em um histograma.

2.2.8 Curva de dose-resposta a ácido giberélico (GA₃)

A curva de dose-resposta a GA₃, foi montada com plantas da geração de introgressão BC1F3, da triagem para plantas de porte reduzido vindas de *S. galapagense*, e com a cv MT, a qual foi usada como controle. Foram usadas as doses 0, 10, 50, 100 e 500 µM de GA₃. Para cada tratamento, 10 repetições foram usadas. As aplicações de GA₃ foram realizadas logo após a emissão dos cotilédones, por meio de aspersão da solução sobre as plantas, semanalmente. A altura das plantas foi avaliada 32 dias após a semeadura.

2.2.9 Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado com sementes de plantas da geração de introgressão BC1F3, da triagem para plantas de porte reduzido vindas de *S. galapagense*. A cv MT foi usada como controle. Esse teste foi montado em gerbox preto, contendo papel filtro, a temperatura ambiente (25 °C). Foram usados 4 gerbox contendo 50 sementes cada um, para cada tratamento. As sementes das plantas da geração BC1F3 vindas de *S. galapagense* foram germinadas em água destilada e em solução de 100µM de GA₃. As sementes da cv MT, foram germinadas somente em água destilada. Os tratamentos foram avaliados a cada 12h durante 180h (7,5 dias), realizando contagem da quantidade de sementes germinadas.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Explorando a diversidade genética natural das espécies selvagens relacionadas ao tomateiro

Como foi visto anteriormente, são poucas as alternativas existentes para aumentar a diversidade genética, representada aqui pela diversidade alélica, nas espécies cultivadas. O uso limitado na agricultura de organismos geneticamente modificados e a impossibilidade de gerar, por meio de mutagênese, alelos equivalentes aos alelos selecionados pelo próprio ambiente nas espécies selvagens, tornam a variação genética natural um recurso único e insubstituível a ser explorado. Cruzamentos e retrocruzamentos em larga escala e a confecção de Linhagens de Introgessão (IL's), são os dois métodos mais adequados para explorar tal diversidade. Ambos têm suas limitações e vantagens, sendo mais ou menos adequados conforme o propósito do trabalho a ser realizado.

As IL's são uma ferramenta poderosa para identificar novos *loci* nas espécies selvagens. Elas possuem a vantagem adicional de fornecerem a informação sobre o cromossomo em que se encontra um alelo e também sua posição relativa. Isso facilita a seleção de marcadores para um mapeamento refinado e clonagem do gene se houver interesse. Também são importantes na identificação de QTL's para várias características. As principais limitações dessa ferramenta para explorar a variação genética natural das espécies selvagens de tomateiro são o custo elevado e a dificuldade de confecção de um conjunto de IL's. Além disso, não é viável fazer IL's para todos os acessos coletados de uma espécie, sendo que ainda são disponíveis IL's completas somente para *S. pennellii* (ESHED; ZAMIR, 1994), embora IL's incompletas também sejam disponíveis para *S. habrochaites* (MONFORTE; TANKSLEY, 2000), *S. pimpinellifolium* (Rafael Munes, comunicação pessoal) e *S. galapagense*.

O uso de cruzamentos e retrocruzamentos das espécies selvagens de tomateiro com uma cultivar de referência, constitui-se em outra ferramenta bastante acessível para esse propósito, pois pode-se considerar vários acessos dentro da espécie. Além disso, todas as espécies selvagens do gênero podem ser cruzadas com maior ou

menor grau de dificuldade com *S. lycopersicum*. A principal limitação para esse método é o fato de que as populações geradas a partir dos cruzamentos precisam ser conduzidas em campo, o que pode tornar esse procedimento oneroso e relativamente caro.

2.3.2 Usando a cv MT para explorar a variação genética natural das espécies selvagens de tomateiro

Uma alternativa para explorar a variação genética natural das espécies selvagens de tomateiro é o uso de *S. lycopersicum* cv Micro-Tom como cultivar de referência nos cruzamentos com as essas espécies. A partir de uma população F2 de cruzamento da cv MT com uma espécie selvagem ou cultivar de porte normal, muitas plantas aparecem com porte bastante reduzido. Assim, perto de 25% dos indivíduos F2, já podem ser cultivados na estrutura mínima requerida para a cv MT.

Os trabalhos com cruzamentos e retrocruzamentos são adequados para isolar componentes monogênicos, mas não componentes poligênicos. Por isso, no presente trabalho o objetivo foi isolar novos alelos de genes das espécies selvagens de tomateiro que representassem caracteres claramente monogênicos e que pudessem ser facilmente transferidos para a cv MT por meio de retrocruzamentos. Partindo desse princípio, ao usar populações de tamanho adequado pode-se eliminar perto de 75% das plantas com porte mais alto de uma geração F2 inicial, pois devido a uma questão de probabilidade, boa parte dos alelos de interesse devem estar representados nessa população restante de 25% do total. Uma exceção é válida para alelos vindos de *loci* que estejam fortemente ligados em repulsão com *dwarf* ou outro alelo de efeito maior responsável pela redução do porte da cv MT. Nesses casos, as populações precisariam ser maiores, conforme a magnitude da ligação.

Uma vez realizada a seleção inicial para o porte das plantas, foi iniciada a seleção para fenótipos que fossem aparentemente distintos do fenótipo dos parentais, ou seja, prováveis produtos de recombinação entre eles. As plantas selecionadas foram retrocruzadas com a cv MT, dando origem a geração BC1. Nessa geração, o tamanho das plantas já é muito próximo ao da cv MT. Algumas características selecionadas

mostram fenótipo em BC1 o que indica a possibilidade de serem alelos dominantes. Para esses caracteres as plantas BC1 foram retrocruzadas diretamente com a cv MT não havendo a necessidade de avaliar a progênie de auto-fecundação. A obtenção da geração BC1F2 só foi necessária quando o BC1 não mostrou o fenótipo selecionado em F2. Como os materiais BC1 e BC1F2 possuem porte bastante similar ao da cv MT, essa geração pode ser usada para alguns testes de segregação, quando o número de sementes das gerações mais avançadas for escasso.

2.3.3 Novas características e possíveis novos alelos isolados das espécies selvagens

Muitas características fenotípicas que não são observadas nas espécies selvagens e nem na cv MT, foram isoladas. A tabela 2 resume os fenótipos encontrados e cada espécie selvagem e a atual geração de introgressão.

Tabela 2 – Características observadas nas populações de recombinação das espécies selvagens com a cv MT

Espécie	Características Observadas	Geração de identificação	Geração de Introgessão
<i>S. neorickii</i>	Frutos rosa-salmão	F3	BC2
	Inflorescências bifurcadas com 4 flores cada	F2	BC3
<i>S. chmielewskii</i>	Frutos opacos	BC1	BC5
<i>S. galapagense</i>	Porte reduzido	BC1	BC3
	Frutos pilosos	BC1	BC2
	Fruto bicolor	BC1F2	BC2
	Fruto verde-escuro	BC1	BC2
<i>S. pimpinellifolium</i>	Número elevado de flores	F3	BC4

2.3.4 *Solanum galapagense*

Solanum galapagense é uma espécie endêmica das Ilhas Galápagos, localizadas na costa do Equador. Essa região caracteriza-se por possuir temperaturas altas o ano todo, sem grandes oscilações térmicas, com um regime de chuvas mais concentrado no verão. Uma vez que todo o arquipélago é rodeado pelo mar, pode-se pressupor que a troca de alelos entre os indivíduos de populações seja mais restrita em relação ao que ocorre com as espécies que habitam a região continental. Assim, essa espécie provavelmente só deve ter se estabelecido neste local devido a ocorrência de grande diversidade genética existente, usada como substrato para a seleção natural atuar no sentido de maior adaptação.

Essa espécie apresenta algumas características particulares tais como plantas baixas, folhas com bordos muito recortados e dormência de sementes. O fenótipo de folhas muito recortadas é devido à mutação *Pts*, a qual foi anteriormente descrita (RICK, 1980) e agora encontra-se introgridida na cv MT (figura 1 A).

2.3.4.1 Fruto verde escuro

São conhecidos alguns alelos oriundos de variação genética natural que fazem com que o fruto, ainda não maduro, possua coloração verde escura. É o caso das mutações *Intense pigment (lp)* e *atroviolace (atv)*, vindas respectivamente de *S. chmielewskii* e *S. cheesmaniae* (KENDRICK et al., 1997). Além, disso essas espécies também apresentam frutos com “ombro verde”, devido a presença do alelo dominante *Uniform fruit (U)*.

Foi observado que o fenótipo frutos verde-escuro (figura 2 E) provavelmente é devido a um componente genético dominante, uma vez que essa coloração apareceu nos frutos das plantas que foram retrocruzadas, nas gerações BC1 e BC2, onde os alelos se encontram em heterozigose. Isso exclui a possibilidade desse fenótipo ser devido ao alelo recessivo *atv*. Contudo, não se pode descartar a possibilidade desse fenótipo ser o produto de uma combinação entre *U* e o novo alelo, uma vez que ambos são dominantes e podem estar sendo introgrididos conjuntamente.

No futuro, com a obtenção de linhagens isogênicas ao MT contendo essa característica, será possível realizar estudos sobre a base genética desse possível novo alelo e de sua relação com outros genes alelos que conferem fenótipo semelhante.

2.3.4.2 Fruto bicolor

Este alelo parece levar a uma maturação desuniforme do fruto (figura D), fazendo com que sua coloração fique verde-vermelha. Atualmente conhecemos os mutantes *rin* (*ripening inhibitor*) (ROBINSON; TOMES, 1968) e *nor* (*non ripening*) (TIGCHELAAR et al., 1973) que afetam o amadurecimento dos frutos, dando a estes um aspecto variegado entre vermelho e verde quando maduros. Essas mutações são muito usadas nas cultivares que dão origem aos frutos longa vida. Ainda não é conhecida nenhuma variação genética natural que leve ao amadurecimento desuniforme dos frutos ou que esteja envolvida com algum tipo de mecanismo longa vida. Uma vez obtidos materiais com esse fenótipo isogênicos a cv MT, essa característica poderá ser estudada quanto ao seu possível envolvimento com mecanismos que aumentem o tempo de prateleira dos frutos.

Figura 2 – Alelos isolados das espécies selvagens de tomateiro que afetam fenótipo dos frutos. A) diversidade fenotípica de cores nos frutos encontradas na geração F3, do cruzamento da cv MT com *S. neorickii*. B) fruto rosa-salmão vindo de *S. neorickii*. C) detalhe do fenótipo do fruto rosa-salmão. D) fruto bicolor isolado de *S. galapagense*. E) fruto verde escuro vindo de *S. galapagense*. F) frutos pilosos isolados de *S. galapagense*. G) fruto opaco isolado de *S. chmielewskii*. Barra = 20 mm

2.3.4.3 Frutos pilosos

Ainda não há relatos sobre a base genética da pilosidade dos frutos de *S. galapagense*. Essa característica provavelmente é muito afetada pelo ambiente e pode ser controlada por vários genes. Nas populações de triagem, as plantas com frutos pilosos (figura 2 F) foram cruzadas com a cv MT, com o intuito de se isolar algo que fosse monogênico ligado a essa característica. Provavelmente, há um gene de efeito maior controlando a pilosidade nos frutos, uma vez que esse fenótipo aparece quando o F1 é retrocruzado com a cv MT. O mesmo fenótipo apareceu em BC2, obtido diretamente do cruzamento das plantas BC1. Algo muito interessante que foi notado, diz respeito ao aparecimento de frutos pilosos diretamente nas plantas que receberam pólen de plantas com frutos pilosos. Ou seja, a expressão do gene ou genes aparentemente ocorre diretamente na semente e acaba afetando o fenótipo do fruto, o qual se torna piloso.

2.3.4.4 Porte reduzido

S. galapagense apresenta plantas com tamanho bastante reduzido quando comparadas ao tomateiro domesticado. Essa redução no porte das plantas pode ter origem em poucos genes de grande efeito ou em muitos genes de pequeno efeito (poligenes), ou ainda a combinação das duas coisas. Nas populações de recombinação entre *S. galapagense* e *S. lycopersicum*, surgiram algumas plantas com entrenós muito curtos, porte baixo (figura 3 D) e germinação de sementes reduzida. Essas características foram introgridas até a geração BC1F4, na qual se encontram fixadas. Essa geração também possui *Pts* em homozigose, o que inicialmente levantou a hipótese de que essa mutação puderia estar envolvida com nanismo de *S. galapagense*. Contudo, ao introgridmos *Pts* na cv MT, pudemos observar que tal mutação não afeta o porte das plantas e essa hipótese foi então descartada (figura 3 E).

Figura 3 – Variação genética natural afetando a morfologia da planta. A) linhagem com 13 flores vinda de *S. pimpinellifolium*. B) planta com caule fino vinda de *S. neorickii*. C) linhagem com inflorescência dupla contendo 4 flores cada vinda de *S. neorickii*. D) plantas de porte baixo isoladas de *S. galapagense*. E) *Petroselinum* BC6Fn comparado a com *Pts* na geração BC1F3, vinda *S. galapagense*. Barra = 20 mm. Vaso diâmetro = 80 mm

Entre as várias mutações conhecidas em tomateiro, *gibberellin-deficient1* (*gib1*), *gibberellin-deficient2* (*gib2*), *gibberellin-deficient3* (*gib3*), representam mutantes deficientes na biossíntese de giberelinas. Tal deficiência hormonal leva ao fenótipo de plantas baixas, com entrenós muito curtos, folhas de tamanho reduzido e baixa capacidade de germinação (KOORNNEEF et al., 1990). Assim, uma das hipóteses é a de que o nanismo e a dormência de sementes existente em *S. galapagense*, sejam devidos a um poucos alelos que levem a alterações na sensibilidade ou metabolismo de giberelinas. Para testar tal hipótese, foram montados 2 dois experimentos, nos quais a altura das plantas e a germinação de sementes, que são características afetadas por alterações nessa classe hormonal, foram avaliadas (figura 4).

Na figura 4 A, podemos observar que as plantas da geração BC1F3 derivadas de *S. galapagense* respondem menos ao ácido giberélico (GA_3) em incremento de altura do que a cv MT, sendo que mesmo na dose mais elevada (500 μM) essas plantas não recuperaram o fenótipo de altura normal. Já na figura 4 B, vemos que a taxa de germinação das plantas da população BC1F3 mostra valores que são quase a metade dos valores obtidos para a cv MT, tomada como controle. No tratamento onde as sementes BC1F3 germinaram em solução de 100 μM de GA_3 , a taxa de germinação ainda se manteve bastante reduzida, mostrando novamente que esse genótipo responde muito pouco a giberelinas.

Esses dois resultados são indícios de que estamos isolando de *S. galapagense* um componente genético que pode estar ligado a baixa sensibilidade a giberelinas. Tal resultado é muito importante, uma vez que ainda não foram descritas variações genéticas naturais afetando hormônios vegetais. Contudo, esses resultados não são conclusivos e para tal, é necessário em trabalhos futuros a obtenção de linhagens isogênicas ao MT, contendo as mesmas características de nanismo e germinação de sementes dessa geração BC1F3. A partir da obtenção desses materiais, será possível realizar estudos mais aprofundados, testando vários parâmetros ligados giberelinas e dosando os teores desse hormônio nas plantas.

Figura 4 – Teste de sensibilidade a giberelinas. A) curva de dose-resposta ao ácido giberélico (GA₃), dos genótipos BC1F3 isolado de *S. galapagense* e da cv MT. B) teste de germinação dos genótipos BC1F3, em água destilada e solução de ácido giberélico 100μM, e da cv MT em água destilada

2.3.5 *Solanum chmielewskii*

2.3.5.1 Fruto opaco

Este alelo isolado de *S. chmielewskii* faz com que a superfície dos frutos fique opaca (figura 2 E), ou seja, sem o brilho característico da serosidade presente em *S. lycopersicum*. Tal característica parece ser dominante, pois esse fenótipo sempre esteve presente nas plantas heterozigotas. É possível que a opacidade dos frutos de *S. chmielewskii* seja devida a alterações na qualidade e/ou quantidade de cera existente sobre a epiderme desse tecido. Ou seja, essa característica pode ser muito importante para estudos relativos a frutos longa-vida, uma vez que são conhecidos somente 3 genes (*nor*, *rin* e *alc*) que aumentam o tempo de prateleira dos frutos.

2.3.6 *Solanum neorickii*

2.3.6.1 Frutos rosa-salmão

Embora os frutos de *Solanum neorickii* sejam de cor verde, uma grande diversidade de tonalidade de cores aparece nos frutos quando essa espécie é cruzada com *S. lycopersicum* (figura 2 A). Dentre as diversas cores de frutos encontradas, a cor rosa-salmão (figura 2 B) foi a que se demonstrou estável quando cruzada com a cv MT. Na geração BC1F2 essa coloração rosa-salmão teve algumas variações para uma tonalidade bege (figura 2 C), fato que muitas vezes ocorreu em frutos diferentes em uma mesma planta. Mathews et al. (2003), usando Activation Tagging em tomateiro, também obteve frutos com essa coloração. Embora não tenha sido realizado um teste de segregação para saber sobre a base genética desse caráter, é provável que tal fenótipo seja devido a presença 2 alelos recessivos. Já foi verificado que um deles corresponde a mutação *y*, a qual somada a esse outro alelo, confere a coloração característica apresentada.

2.3.6.2 Inflorescências duplas

Solanum neorickii aparentemente possui um número reduzido de flores por inflorescência. Contudo, ao introgridirmos essa característica, observamos que na verdade trata-se de inflorescências bifurcadas, as quais possuem de 4 a 6 flores em cada ramo da bifurcação. Tal característica parece ser dominante e tem sido facilmente introgridida por meio de retrocruzamentos na cv MT. Esta característica encontra-se na geração BC3 de introgressão, na qual as plantas possuem o fenótipo muito próximo ao da cv MT. Assim, a partir dessa geração será possível realizar estudos fenológicos mais precisos, para caracterizar esse possível no alelo vindo de *S. neorickii*.

2.3.7 *Solanum pimpinellifolium*

2.3.7.1 Número elevado de flores

S. pimpinellifolium possui em média 18 flores por inflorescência, sendo bastante provável que essa característica seja devida a presença de muitos genes. Contudo, a presença de componentes genéticos de efeito maior não pode ser desconsiderada. Como foi demonstrado anteriormente, vários alelos novos podem aparecer a partir do cruzamento da cv MT com as espécies selvagens relacionadas ao tomateiro. Assim, plantas contendo 13 flores por inflorescência têm sido isoladas na cv MT (figura 3 A). Atualmente esse material encontra-se na geração BC4, o que é um indício de que existe algo provavelmente monogênico controlando esse caráter. O componente genético isolado de *S. pimpinellifolium*, o qual afeta o número de flores, merece atenção especial para esse estudo. Isso se deve ao fato de esta característica ser uma variável discreta com comportamento similar ao de uma variável contínua. Somado a isso, o número de flores por inflorescência de *S. pimpinellifolium* apresenta considerável variação em relação ao número de flores por inflorescência de *S. lycopersicum* cv MT, o que constitui-se em um elemento importante para os estudos da base genética dessa característica.

2.3.7.2 Estudo da base genética do número de flores

Enquanto a cv MT possui normalmente 7 flores por inflorescência, esse número é em média 18 para *Solanum pimpinellifolium*. O número de flores por inflorescência em tomateiro provavelmente depende da ação de um componente poligênico e alguns genes de efeito maior (CRANE, 1915). Em tomateiro são conhecidas algumas mutações que afetam esse caráter, tais como *sft* (*single flower truss*), que reduz o número de flores e *s* (*compound inflorescence*) que torna as inflorescências muito divididas aumentando o número de flores (QUINET et al., 2006). Contudo, ainda não são conhecidos alelos oriundos de variação genética natural que afetem o número de flores das inflorescências em tomateiro. Essa característica pode ser controlada por vários genes, sendo, provavelmente, muito afetada pelo ambiente. Adicionalmente, temos o fato de que essa característica não tem um comportamento de uma variável contínua, mas também não pode ser tratada como uma variável discreta. Isso dificulta a compreensão de sua base genética, havendo a dificuldade em propor modelos esperados para cada caso. Com isso, o primeiro passo foi tentar isolar *loci* que tivessem grande efeito no número de flores por inflorescência. Isso tornaria possível a realização de estudos em materiais mais isogênicos à cv MT, reduzindo a variação genética e possibilitando o uso de populações de tamanho adequado em condições controladas, de modo a reduzir também as variações ambientais.

2.3.7.3 Isolando componentes genéticos que levam ao aumento no número de flores por inflorescência de *S. pimpinellifolium*

Para isolar um ou poucos *loci* relativo ao número de flores, *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* foram cruzadas e, na geração F2, foram selecionadas as plantas com número elevado de flores e que possuíssem porte micro. Nessa geração, as plantas apresentaram número de flores variando de 7 a 13, sendo um indício de que o número médio de 18 flores por inflorescência de *S. pimpinellifolium* é controlado por vários *loci*. Foram então selecionadas as plantas que tinham 13 flores e porte muito reduzido para serem retrocruzadas com a cv MT. Na geração BC1, as plantas que apresentassem o

fenótipo relativo ao número elevado de flores certamente estariam carregando algo que fosse dominante e que estaria em heterozigose. Além disso, parte do componente poligênico para esse caráter, caso houvesse, teria sido eliminado, reduzindo os erros na hora de selecionar um *locus* de efeito maior. Na geração BC1, apareceram plantas com número de flores por inflorescência variando de 7 a 11, não sendo encontrada nenhuma com 13.

Retrocruzando as plantas de 11 flores por inflorescência diretamente do BC1, apareceram plantas com no máximo 9 flores em BC2, as quais foram retrocruzadas para a obtenção da geração BC3, de modo a preservar os componentes que fossem dominantes em heterozigose. Foram obtidas também as progênies oriundas da autofecundação das gerações BC1, BC2 e BC3, as quais foram guardadas para testes posteriores. Em BC3, as plantas com 9 flores por inflorescência foram deixadas autofecundar e a geração BC3F2 foi avaliada (figura 5 A). Para efeito de comparação, 15 plantas de MT foram usadas para obter uma estima da média e da variância, a partir dos quais foi estimada uma população de distribuição normal $N(\mu, \sigma^2)$ com tamanho igual ao BC3F2 derivado de *S. pimpinellifolium*. Na geração BC3, teoricamente a recuperação do genótipo do parental recorrente é em média 93,75%, permitindo a realização de experimentos onde a cv MT pode ser usada como controle sem considerar que haja variação genética significativa interferindo nos resultados.

Figura 5 – Teste de segregação para número de flores por inflorescência. A) segregação do número de flores por inflorescência da geração BC3F2 de introgressão do alelo isolado de *S. pimpinellifolium* na cv MT. B) número de flores por inflorescência da cv MT

2.3.7.4 Segregação para o número de Flores por Inflorescência (F/I)

A figura 5 A mostra que a auto-fecundação de plantas com 9 flores por inflorescência deu origem a plantas contendo entre 6 a 12 flores. Embora essa figura mostre plantas contendo no máximo 12 flores por inflorescência (média), várias inflorescências aparecem com número de flores igual a 13 e 14. Já na cv MT (figura 5 B), a qual é totalmente homozigota para esse caráter, o número médio de F/I foi de 7, com desvios de classe que levaram ao aparecimento de plantas variando de 5 a 9 F/I. Com isso, vemos que essa característica é muito afetada pelo ambiente e, embora a proposta seja a existência de um componente de efeito maior, a população de segregação para essa característica parece simular algo poligênico. Mas, como já foi mencionado, dificilmente algo poligênico seria transmitido por 3 retrocruzamentos consecutivos em heterozigose. Isso reforça a hipótese de que algum componente genético de efeito maior tenha sido isolado a partir de *S. pimpinellifolium* na cv MT. Assim, é possível que tenha sido isolado um componente genético, com dominância incompleta, cujo heterozigoto confere um número médio de 9 flores por inflorescência. Provavelmente, o homozigoto recessivo deve dar origem a plantas com média de 7 flores por inflorescência e o homozigoto dominante a plantas com 11 flores por inflorescência.

Uma questão que surge nesse ponto diz respeito a definição desse *locus* como sendo um QTL ou um Gene de Efeito Maior. QTL's (*Quantitative Trait Loci*) são *loci* que controlam caracteres quantitativos, e por muitas vezes fica bastante difícil distinguir o que é um QTL e o que é um Gene de Efeito Maior (*Major Gene*). Costuma-se usar o termo Major Gene quando o *locus* leva uma alteração muito grande no fenótipo observado, de forma a evidenciar claramente a distinção em classes. No caso da variação observada para o número de flores, a distribuição dos fenótipos em classes adquire o aspecto de uma variável contínua. Assim, embora sejam fortes as evidências para acreditar que tenhamos isolado um QTL de efeito maior, alguns estudos adicionais usando marcadores moleculares seriam necessários, para mapear tal *locus* e conhecer melhor seu efeito (aditividade e dominância). Dessa forma, estudos futuros usando

linhagens isogênicas para essa característica, permitirão concluir com maior segurança sobre esse componente genético isolado a partir de *S. pimpinellifolium*.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo da cv MT parece ser bastante adequado para isolar genes ou QTL's de efeito maior. Embora a ação desses genes pode ser mascarada devido a presença de poligenes de menor efeito, somada a uma grande interação genótipo-ambiente, no modelo MT esse efeito parece ser reduzido. Em condições de populações instaladas em campo, torna-se extremamente difícil evitar o efeito dessa interação. Nesse ponto, o uso de populações de recombinação com cv MT em casa de vegetação pode reduzir muito o impacto das variações ambientais sobre um *locus*, permitindo que efeitos gênicos mais sutis sejam identificados. Além disso, o crescimento extremamente determinado e o ciclo de vida curto da cv MT reduz o impacto de efeitos desenvolvimentais acumulados que costumam ocorrer nas cultivares de porte normal de tomateiro. Ou seja, como uma planta de MT possui um número finito e pequeno de folhas e inflorescências ao longo de seu ciclo, esses órgãos costumam se desenvolver de forma bastante regular ao se comparar plantas cultivadas nas mesmas condições. Um exemplo disso seria o isolamento de um componente genético vindo de *S. pimpinellifolium* que leva a um aumento do número de flores por inflorescência (ou total de flores), cuja base genética tem sido considerada, em boa parte a alguns QTL's de pequeno efeito (DOGANLAR; FRARY; TANKSLEY, 2002).

Ao contrário do que ocorre com *sft* e *s*, esse possível *locus* não leva a alterações drásticas no número de flores ou morfologia das inflorescências. As variações provocadas por esse *locus*, embora distintas, são muito sutis. Tais variações podem, em alguns casos, ser associadas a fatores genéticos e à biossíntese ou sensibilidade de substâncias moduladoras do desenvolvimento, como os hormônios vegetais. Um exemplo disso é a demonstração de que um dos QTL's controlando o número de flores na panícula do arroz corresponde a uma variação alélica em um gene que codifica para citocinina oxidase desidrogenase (OsCKX2) (ASHIKARI et al, 2005). De forma análoga, Werner et al. (2003), mostraram que a deficiência de citocininas reduz o número de flores em *Arabidopsis*. Assim, não é descartada a hipótese desse suposto *locus* estar ligado a mecanismos que levem a alterações hormonais, que de alguma forma afetem o número de flores por inflorescência. A obtenção de linhagens isogênicas à cv MT desse

componente genético isolado de *S. pimpinellifolium* permitirá estudos mais aprofundados sobre sua natureza genética e mecanismos moleculares que levam a alterações no número de flores por inflorescência em tomateiro.

O modelo da cv MT também mostrou-se muito eficiente para isolar componentes monogênicos, tais como o alelo que leva a formação de frutos com coloração rosa-salmão vindo de *S. neorickii*, fruto verde escuro e frutos pilosos de *S. galapagense* e fruto opaco vindo de *S. chmielewskii*. Todos esses alelos foram triados a partir de plantas conduzidas em casa de vegetação, usando a estrutura mínima requerida para o MT. Isso mostra que o uso da cv MT é extramente viável para explorar a variação genética natural das espécies selvagens de tomateiro. Adicionalmente, temos que a base genética da cv MT é muito similar a das cultivares comerciais, facilitando a passagem desses alelos para as linhagens elite ou para a confecção de materiais para pré-melhoramento. Enfim, o uso da cv MT para explorar a variação genética natural, além de facilitar o resgate de alelos selvagens, ajudando a ampliar a restrita base genética do tomateiro cultivado, também pode ser muito importante para gerar novos materiais para pesquisa básica em genética e fisiologia vegetal.

REFERÊNCIAS

- ALONSO-BLANCO, C.; KOORNNEEF, M. Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v.5, p.22-29, 2000.
- ASHIKARI, M.; SAKAKIBARA, H.; LIN, S.; YAMAMOTO, T.; TAKASHI, T.; NISHIMURA, A.; ANGELES, E.R.; QIAN, Q.; KITANO, H.; MATSUOKA, M. Cytokinin Oxidase Regulates Rice Grain Production. **Science**, New York, v.309, p.741-745, 2005.
- BISHOP, G.J.; NOMURA, T.; YOKOTA, T.; HARRISON, K.; NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; JONES, J.D.G.; KAMIYA, Y. The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.96, p.1761-1766, 1999.
- BROMMONSCHENKEL, S.H.; TANKSLEY, S.D. Map-based cloning of the tomato genomic region that spans the *Sw-5* tospovirus resistance gene in tomato. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v.256, p.121-126, 1997.
- CARMEL-GOREN, L.; LIU, T.S.; LIFSCHITZ, E.; ZAMIR, D. The *SELF PRUNING* gene family in tomato. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.52, p.1215–1222, 2003.
- CAUSSE, M.; DUFFE, P.; GOMEZ, M.C.; BURET, M.; DAMIDAUX, R.; ZAMIR, D.; CHEVALIER, C.; LEMAIRE-CHAMLEY, M.; ROTHAN, C. A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p.1671-1685, 2004.
- CHETELAT, R.T.; DEVERNA, J.W.; BENNET, A.B. Introgression into tomato (*Lycopersicon esculentum*) of the *L. chmielewskii* sucrose accumulator gene (*sucr*) controlling fruit sugar composition. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.91, p.327-333, 1995.
- CRANE, M.B. Heredity of types of inflorescence and fruits in the tomato. **Journal of Genetics**, London, v.5, p.1-11, 1915.
- SPOONER, D.M.; PERALTA, I.E.; KNAPP, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. **Taxon**, Utrecht, v. 54, p.43-61, 2005.
- DAVID-SCHWARTZ, R.; BADANI, H.; SMADAR, W.; LEVY, A.A.; GALILI, G.; KAPULNIK, Y. Identification of a novel genetically controlled step in mycorrhizal colonization: plant resistance to infection by fungal spores but not extra-radical hyphae **The Plant Journal**, Oxford, v.27, p.561-569, 2001.

DOGANLAR, S.; FRARY, A.; TANKSLEY, S.D. The genetic basis of seed-weight variation: tomato as a model system. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.100, p.1267-1273, 2000.

EMMANUEL, E.; LEVY, A.A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.5, p.112-117, 2002.

ESHED, Y.; ZAMIR, D. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTLs. **Genetics**, Bethesda, v.141, p.1147-1162, 1995.

ESHED, Y.; ZAMIR, D. A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: A tool for fine mapping of genes. **Euphytica**, Wageningen, v.79, p.175-179, 1994.

FRARY, A.; NESBITT, T.C.; FRARY, A.; GRANDILLO, S.; VAN-DER-KNAAP, E.; CONG, B.; LIU, J.; MELLER, J.; ELBER, R.; ALPERT, K.B.; TANKSLEY, S.D. A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. **Science**, New York, v.289, p.85-88, 2000.

FRAY, R.G.; GRIERSON, D. Identification and genetic-analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.22, p.589-602, 1993.

FREITAS, J.A.; MALUF, W.R.; CARDOSO, M.G.; GOMES, L.A.A.; BEARZOTTI, E. Inheritance of foliar zingiberene contents and their relationship to trichome densities and whitefly resistance in tomatoes. **Euphytica**, Wageningen, v.127, p.275-287, 2002.

FRIDMAN, E.; CARRARI, F.; LIU, Y.S.; FERNIE, A.R.; ZAMIR, D. Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. **Science**, New York, v.305, p.1786-1789, 2004.

FRIDMAN, E.; LIU, Y.; CARMEL-GOREN, L.; GUR, A.; SHORESH, M.; PLEBAN, T.; ESHED, Y.; ZAMIR, D. Two tightly linked QTLs modify tomato sugar content via different physiological pathways. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.266, p.821-826, 2001.

GIORGIEV, C. Anthocyanin fruit (Af). **Report of the Tomato Genetics Cooperative**, Davis, v.22, p.10, 1972.

GONÇALVES, M.I.F.; MALUF, W.R.; GOMES, L.A.A.; BARBOSA, L.V. Variation of 2-tridecanone level in tomato plant leaflets and resistance to two mite species (*Tetranychus* sp.). **Euphytica**, Wageningen, v.104, p.33-38, 1998.

HALL, T.J. Resistance at the *Tm-2 locus* in the tomato to tomato mosaic virus. **Euphytica**, Wageningen, v.29, p.189-97, 1980.

HOGENBOOM, N.G. Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*. 1. The genus *Lycopersicon*, its breeding barriers and the importance of breaking these barriers. **Euphytica**, Wageningen, v.21, p.221-227, 1972.

HUANG, C.C.; DE PUTTE, P.M.H-V.; DER MEER, J. G. H-V.; MEIJER-DEKENS, F.; LINDHOUT, P. Characterization and mapping of resistance to *Oidium lycopersicum* in two *Lycopersicon hirsutum* accessions: evidence for close linkage of two Ol-genes on chromosome 6 of tomato. **Heredity**, London, v.85, p.511-520, 2000.

ISAACSON, T.; RONEN, G.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. **The Plant Cell**, Baltimore, v.14, p.333-342, 2002.

JONES, A.D.; THOMAS, C.M.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; BALINT-KURTI, P.J.; JONES, J.D.G. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. **Science**, New York, v.266, p.789-793, 1994.

KAHN, T.C.; FENDER, S.E.; BRAY, E.A.; O'CONNELL, M.A. Characterization of expression of drought- and abscisic acid-regulated tomato genes in the drought-resistant species *Lycopersicon pennellii*. **Plant Physiology**, Rockville, v.103, 597-605, 1993.

KAWCHUK, L.M.; HACHEY, J.; LYNCH, D.R.; KULCSAR, F.; ROOIJEN, G.V.; WATERER, D.R.; ROBERTSON, A.; KOKKO, E.; BYERS, R.; HOWARD, R.J.; FISCHER, R.; PRÜFER, D. Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.98, p.6511-6515, 2001.

KEBEDE, H.; MARTIN, N.; NIENHUIS, J.; KING, G. Leaf anatomy of two *Lycopersicon* species with contrasting gas exchange properties. **Crop Science**, Madison, v.34, p.108-113, 1994.

KENDRICK, R.E.; KERCKHOFFS, L.H.; VAN-TUINEN, A.; KOORNEEF, M. Photomorphogenetic mutants of tomato. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.20, p.746-751, 1997.

KESSLER, S.; KIM, M.; PHAM, T.; WEBER, N.; SINHA, N. Mutations altering leaf morphology in tomato. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v.162, p.475-492, 2001.

KOKA, C.V.; CERNY, R.E.; GARDNER, R.G.; NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; YOSHIDA, S.; CLOUSE, S.D. A putative role for the tomato genes *DUMPY* and *CURL-3* in brassinosteroid biosynthesis and response. **Plant Physiology**, Rockville, v.122, p.85-98, 2000.

KOORNNEEF, M.; BOSMA, T.D.G.; HANHART, C.J.; VAN-DER-VEEN, J.H.; ZEEVAART, J.A.D. The isolation and characterization of gibberellin-deficient mutants in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.80, p.852-857, 1990.

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

LI, L.; ZHAO, Y.; MCCAIG, B.C.; WINGERD, B.A.; WANG, J.; MARK, E.W.; PICHERSKY, E.; HOWE, G.A.; The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. **The Plant Cell**, Baltimore, v.16, p.126-143, 2004.

LIMA, J.E.; CARVALHO, R.F.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A.V.O.; PERES, L.E.P. Micro-MsK: a tomato genotype with miniature size, short life cycle and improved *in vitro* shoot regeneration. **Plant Science**, Amsterdam, v.167, p.753-757, 2004.

LIU, Y.S.; GUR, A.; RONEN, G.; CAUSSE, M.; DAMIDAUX, R.; BURET, M.; HIRSCHBERG, J.; ZAMIR, D. There is more to tomato fruit color than candidate carotenoid genes. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v.1, p.195-207, 2003.

MALUF, W.R.; BARBOSA, L.V.; SANTA-CECÍLIA, L.V.C. 2-Tridecanone-mediated mechanisms of resistance to the South American tomato pinworm *Scrobipalpusoides absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera-Gelechiidae) in *Lycopersicon* spp. **Euphytica**, Wageningen, v.93, p.189-194, 1997.

MALUF, W.R.; CAMPOS, G.A.; CARDOSO, M.G. Relationships between trichome types and spider mite (*Tetranychus evansi*) repellence in tomatoes with respect to foliar zingiberene contents. **Euphytica**, Wageningen, v.121, p.73-80, 2001.

MARTI, E.; GISBERT, C.; BISHOP, G.J.; DIXON, M.S.; GARCIA-MARTINEZ, J.L. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.57, p.2037-2047, 2006.

MARTIN, G.B.; THORSTENSON, Y.R. Stable Carbon Isotope Composition ($\delta^{13}C$), Water Use Efficiency, and Biomass Productivity of *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pennellii*, and the F1 Hybrid. **Plant Physiology**, Rockville, v.88, p.213-217, 1988.

MARTIN, G.B.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CHUNWONGSE, J.; FRARY, A.; GANAL, N.W.; SPIVEY, R.; WU, T.; EARLE, E.D.; TANKSLEY, S.D. Map-based cloning of protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science**, New York, v.262, p.1432-1436, 1993.

MATHEWS, H.; CLENDENNEN, S.K.; CALDWELL, C.G.; LIU, X.L.; CONNORS, K.; MATHEIS, N.; SCHUSTER, D.K.; MENASCO, D.J.; WAGONER, W.; LIGHTNER, J.; WAGNER, D.R. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. **The Plant Cell**, Baltimore, v.15, p.1689-1703, 2003.

MATSUKURA, C.; YAMAGUCHI, I.; INAMURA, M.; BAN, Y.; YIN, Y.G.; SAITO, T.; KUWATA, C.; IMANISHI, S.; NISHIMURA, S. Generation of gamma irradiation-induced mutant lines of the miniature tomato (*Solanum lycopersium* L.) Micro-Tom. **Plant Biotechnology**, Tokyo, v.24, p.39-44, 2007.

MEISSNER, R.; CHAGUE, V.; ZHU, Q.; EMMANUEL, E.; ELKIND, Y.; LEVY, A.A. A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v.22, p.265-274, 2000.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **The Plant Journal**, Oxford, v.12, p.1465-1472, 1997.

MESBAH, L.A.; KNEPPERS, T.J.A.; TAKKEN, F.L.W.; LAURENT, P.; HILLE, J.; NIJKAMP, H.J.J. Genetic and physical analysis of a YAC contig spanning the fungal disease resistance locus *Asc* of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.261, p.50-57, 1999.

MONFORTE, A.J.; TANKSLEY, S.D. Development of a set of near isogenic and backcross recombinant inbred lines containing most of the *Lycopersicon hirsutum* genome in a *L. esculentum* genetic background: a tool for gene mapping and gene discovery. **Genome**, Ottawa, v.43, p.803-813, 2000.

QUINET, M.; DUBOIS, C.; GOFFIN, M-C.; CHAO, J.; DIELEN, V.; BATOKO, H.; BOUTRY, M.; KINET, J-M. Characterization of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) mutants affected in their flowering time and in the morphogenesis of their reproductive structure. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.57, n.6, p.1381-1390, 2006.

NAGAI, H.; COSTA, A.S. Resistência ao mosaico Y, combinada com resistência ao mosaico comum, em tomateiro. **Bragantia**, Campinas, v.31, p.1-8, 1972.

PATTERSON, B.D. Direct selection of chilling-resistance in progeny of *L. esculentum* x *L. hirsutum*. **Report of the Tomato Genetics Cooperative**, Davis, v.32, p.40, 1982.

PATTERSON, B.D.; PAULL, R.; SMILLIE, R.M. Chilling resistance in *Lycopersicon hirsutum* Humb. & Bonpl., a wild tomato with a wild altitudinal distribution. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.5, p.609-617, 1978.

PERALTA, I.E.; SPOONER, D.M. Classification of wild tomatoes: a review. **Kurtziana**, Córdoba, v.28, n.1, p.45-54, 2000.

PERALTA, I.E.; SPOONER, D.M. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). **American Journal of Botany**, New York, v.88, n.10, p.1888-1902, 2001.

PERES, L.E.P.; MORGANTE, P.G.; VAN-SLUYS, M.A.; KRAUS, J.E.; VECHI, C. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of different tomato cultivars and wild related species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.65, p.37-44, 2001.

RESENDE, J.T.V.; MALUF, W.R.; CARDOSO, M.G.; NELSON, D.L.; FARIA, M.V. Inheritance of acylsugar contents in tomatoes derived from an interspecific cross with the wild tomato *Lycopersicon pennellii* and their effect on spider mite repellence. **Genetics and Molecular Research**, [s.l.], v.1, n.2, p.106-116, 2002.

RICK, C.M. The tomato. **Scientific American**, New York, v.239, p.76-87, 1978.

RICK, C.M.; BUTLER, L. Cytogenetics of tomato. **Advances in Genetics**, New York, v.7, p.267-382, 1956.

RICK, C.M.; LAMM, R. Biosystematic studies on the status of *Lycopersicon chilense*. **American Journal of Botany**, New York, v.42, p.663-675, 1955.

RICK, C.M. Genetics and systematic studies on accessions of *Lycopersicon* from the Galapagos Islands. **American Journal of Botany**, New York, v.43, p.687-696, 1956.

RICK, C.M. *Petroselinum* (*Pts*), a new marker for chromosome 6. **Report of the Tomato Genetics Cooperative**, Davis, v.30, p.32, 1980.

RICK, C.M.; CISNEROS, P.; CHETELAT, R.T.; DEVERONA, J.W. *Abg*, a gene on chromosome 10 for purple fruit derived from *S. lycopersiciodes*. **Report of the Tomato Genetics Cooperative**, Davis, v.44, p.29-30, 1994.

RICK, C.M. Genetic variation and evolution of Galápagos tomatoes. In: BOWMAN, R.I.; BERSON, M.; LEVITON, A.E. [Ed.] **Patterns of evolution in Galápagos**, 1983. Organisms, p.97-106.

RICK, C.M. Potential genetic resources in tomato species: clues from observations in native habitats. In: Hollaender, A.; Srb, A. [Ed.] **Genes, Enzymes, and Populations**, 1973. Plenum, New York, p.255-269.

ROBINSON, R.W.; TOMES, M.L. Ripening inhibitor: a gene with multiple effect on ripening. **Report of the Tomato Genetics Cooperative**, Davis, v.18, p.36-37, 1968.

RONEN, G.; CARMEL-GOREN, L.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.97, p.11102-11107, 2000.

ROSSI, M.; GOGGIN, F.L.; MILLIGAN, S.B.; KALOSHIAN, I.; ULLMAN, D.E.; WILLIAMSON, V.M. The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.95, p.9750-9754, 1998.

RUSH, D.W.; EPSTEIN, E. Breeding and selection for salt tolerance by the incorporation of wild germoplasm into a domestic tomato. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v.106, p.699-704, 1981.

DOGANLAR, S.; FRARY, A.; KU, H-M.; TANKSLEY, S.D. Mapping quantitative trait loci in inbred backcross lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589). **Genome**, Ottawa, v.45, p.1189-1202, 2002.

SCOTT, J.W.; HARBAUGH, B.K. Micro-Tom – a miniature dwarf tomato. **Florida Agricultural Experiment Station Circular**, Gainesville, v.370, p.1-6, 1989.

SCOTT, J.W. **Report of the Tomato Genetics Cooperative**, Davis, v.52, p.31-33, 2002.

SIMONS, G.; GROENENDIJK, J.; WIJBRANDI, J.; REIJANS, M.; GROENEN, J.; DIERGAARDE, P.; VAN-DER-LEE, T.; BLEEKER, M.; ONSTENK, J.; DE BOTH, M.; HARING, M.; MES, J.; CORNELISSEN, B.; ZABEAU, M.; VOS, P. Dissection of the *Fusarium* *l2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. **The Plant Cell**, Baltimore, v.10, p.1055-1068, 1998.

SPOONER, D.M.; PERALTA, I.E.; KNAPP, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. **Taxon**, v.54, p.43-61, 2005.

STEVENS, M.A.; RICK, C.M. Genetic and breeding In: ATHERTON, J.G.; RUDICH, J. (Ed.) **The tomato crop: a scientific basis for improvement**. London: Chapman and Hall, 1986. p. 35-109.

STOMMEL, J.R.; HAYNES, K.G. Inheritance of beta carotene content in the wild tomato species *Lycopersicon cheesmanii*. **The Journal of Heredity**, Washington, v.85, p.401-404, 1994.

TAYLOR, I.B. Biosystematics of the tomato. In: Atherton, J.G.; Rudich, J. (Ed.) **The tomato crop**. New York: Chapman and Hall, 1986. cap.1, p.1-34.

THOMAS, B.R., PRATT, D. Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryo callus. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.59, p.215-219, 1981.

TIGCHELAAR, E.C.; TOMES, M.L.; KERR, E.A.; BARMAN, R.J. A new fruit-ripening mutant, *non-ripening (non)*. **Report of the Tomato Genetics Cooperative**, Davis, v.23, p.33-34, 1973.

TIEMAN, D.M.; CIARDI, J.A.; TAYLOR, M.G.; KLEE, H.J. Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. **The Plant Journal**, Oxford, v.26, p.47-58, 2001.

TOMES, M.L. Delta-carotene in the tomato. **Genetics**, Bethesda, v.62, p.769-780, 1969.

VOGG, G.; FISCHER, S.; LEIDE, J.; EMMANUEL, E.; JETTER, R.; LEVY, A.A.; RIEDERER, M. Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid beta-ketoacyl-CoA synthase. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p.1401-1410, 2004.

WANG, H.; JONES, B.; LI, Z.; FRASSE, P.; DELALANDE, C.; REGAD, F.; CHAABOUNI, S.; LATCHE, A.; PECH, J.C.; BOUZAYEN, M. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. **The Plant Cell**, Baltimore, v.17, p.2676-2692, 2005.

WARNOCK, S.J. Natural habitats of *Lycopersicon* species. **HortScience**, St. Joseph, v.26, p.466-471, 1991.

WATANABE, C.; MIZOGUCHI, T.; AOKI, K.; KUBO, Y.; MORI, H.; IMANISHI, S.; YAMAZAKI, Y.; SHIBATA, D.; EZURA, H. Ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom for large-scale mutant screens. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v.24, p.33-38, 2007.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; VAN-ONCKELEN, H.; SCHMÜLLING, T. Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. **The Plant Cell**, Baltimore, v.15, p.2532-2550, 2003.

WILLIAMS, W.G.; KENNEDY, G.G.; YAMAMOTO, R.T.; THACKER, J.D.; BORDNER, J. 2-Tridecanone: a naturally occurring insecticide from the wild tomato *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*. **Science**, New York, v.207, p.888-889, 1980.

YAMAMOTO, N.; TSUGANE, T.; WATANABE, M.; YANO, K.; MAEDA, F.; KUWATA, C.; TORKI, M.; BAN, Y.; NISHIMURA, S.; SHIBATA, D. Expressed sequence tags from the laboratory-grown miniature tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Micro-Tom and mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in tomato cultivars. **Gene**, Amsterdam, v.356, p.127-134, 2005.

YANO, K.; WATANABE, M.; YAMAMOTO, N.; MAEDA, F.; TSUGANE, T.; SHIBATA, D. MiBASE: A database of a miniature tomato cultivar Micro-Tom. **Plant Biotechnology**, Tokyo, v.23, p.195-198, 2006.

ANEXOS

Anexo 1 – Lista de espécies e sinonímias

Espécies

S. cheesmaniae (L. Riley) Fosberg [*L. cheesmaniae* L. Riley]

S. chilense (Dunal) Reiche [*L. chilense* Dunal]

S. chmielewskii (C. M. Rick, Kesicki, Fobes & Holle) D. M. Spooner, G. J. Anderson & R. K. Jansen [*L. chmielewskii* C. M. Rick, Kesicki, Fobes & Holle]

S. galapagense S. Darwin & Peralta [*L. cheesmaniae* f. *minor* (Hook. f.) C. H. Müll.]

S. lycopersicum L. [*L. esculentum* Mill.]

S. neorickii D. M. Spooner, G. J. Anderson & R. K. Jansen [*L. parviflorum* C. M. Rick, Kesicki, Fobes & Holle]

S. pennellii Correll [*L. pennellii* (Correll) D'Arcy]

S. habrochaites S. Knapp & D. M. Spooner [*L. hirsutum* Dunal]

S. peruvianum L. s.l. [*L. peruvianum* (L.) Mill.]

S. pimpinellifolium L. [*L. pimpinellifolium* (L.) Mill.]

Adaptado de Spooner; Peralta; Knapp (2005)