

# MANUAL DO MODELO VEGETAL MICRO-TOM

## CAPÍTULO 3: CRUZAMENTO, SELEÇÃO, PROCESSAMENTO E MANUTENÇÃO DE GENÓTIPOS

Lílian E. Pino, Marcelo Lattarulo Campos & Lázaro E. P. Peres

### 1. COLETA DE PÓLEN

- O pólen das plantas devem ser obtidos através da coleta das anteras de flores recém abertas (figura 1). Estas são colocadas em um pequeno recipiente, o qual é colocado num recipiente contendo gesso (ou sílica gel) para sua desidratação, durante 12h. Em seguida, elimina-se as anteras com o auxílio de uma pinça sendo que o pólen restante já está pronto para ser aplicado na planta receptora. O pólen pode ainda ser desidratado em sílica e estocado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  na presença de  $\text{CaSO}_4$  (gesso)
- O recipiente contendo o gesso deve ser previamente seco em uma estufa  $65 - 80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 6 – 12 h. Para tal, a tampa deve ser retirada e, após secagem, ele deve ser tampado e deixado em repouso até resfriar.
- Outra forma de coletar o pólen é passar a ponta da pinça na parte interna de anteras frescas. O pólen ficará na pinça e poderá ser aplicado diretamente sobre o estilete da planta receptora. Este processo demanda menos tempo e trabalho, porém não permite o armazenamento do pólen para uso posterior.



**Figura 1.** Flor de MT recém aberta, da qual pode se retirar o pólen das anteras. Isso pode ser feito coletando-se anteras e deixando-as secarem um pequeno recipiente durante 12 h. Ao final desse período, uma massa de pólen aparecerá no fundo do recipiente.

## 2. EMASCULAÇÃO

- Deve ser feita assim que a flor estiver com as sépalas abertas, mas com as pétalas ainda fechadas (as pétalas estão fechadas, junto com as anteras, e devem ser retiradas durante a emasculação) (Figuras 2 e 3).
- A emasculação em si consiste em retirar o cone de anteras da flor ainda fechada (isso garante que a flor ainda não foi autofecundada), dando um “beliscão” nas anteras (que estão fundidas) com uma pinça bem fina.
- Retira-se também duas ou três sépalas do cálice da flor emasculada. Como o cálice persiste até o amadurecimento dos frutos, ele serve para marcar que aquela flor foi polinizada manualmente e não por autofecundação.
- É importante que o estigma e o estilete da flor não sejam atingidos pela pinça para não comprometer a polinização. Do mesmo modo, deve se ter cuidado para não danificar o pequeno ovário para não gerar frutos mal formados.

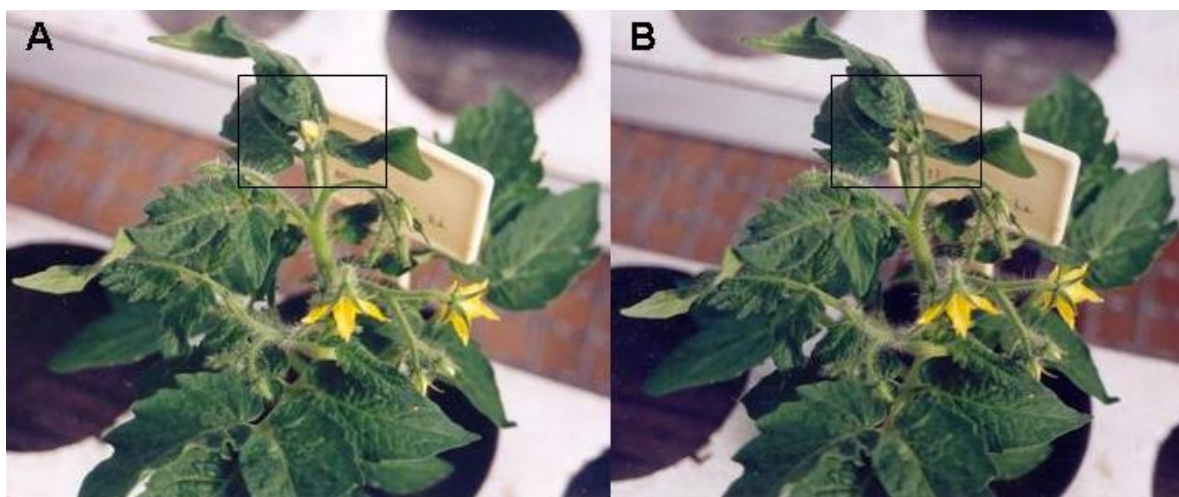


**Figura 2.** A flor de MT é composta por sépalas, pétalas, anteras, estilete e estigma. Para a retirada de pólen das anteras, a flor deve estar completamente aberta (extrema esquerda). Para emasculação, a flor deve estar com as sépalas abertas, porém com as pétalas ainda fechadas (extrema direita). No centro da figura observamos uma flor já emasculada.

### 3. POLINIZAÇÃO

- Deve ser feita preferencialmente no dia seguinte à emasculação, para que dê tempo do estigma se tornar receptivo.
- É feita encostando-se o estigma da planta receptora no pólen da planta doadora. Quanto maior a quantidade de pólen utilizada, melhor se desenvolverá o fruto e maior será o número de sementes formadas.

Obs. é importante que a polinização seja feita logo nas primeiras flores formadas, garantindo uma taxa de pegamento maior. Todo o processo deve ser repetido durante alguns dias até que se verifique que 5 ou 6 frutos pegaram para cada planta de Micro-Tom crescendo em vaso de 150 mL de substrato. A partir desse momento, todos os demais botões florais e ramos contendo inflorescências devem ser eliminados para não competirem com os frutos polinizados.



**Figura 3.** Plantas de MT com flores abertas e fechadas. **A.** Detalhe de um botão floral no ponto de ser emasculado. **B.** Detalhe de um botão floral já emasculado, pronto para receber pólen de outra planta.

### 4. COLETA DOS FRUTOS

- Os frutos devem ser coletados, via de regra, quando estiverem apresentando uma coloração vermelho alaranjado. **Não se deve coletar sementes de frutos muito**

**maduros**, pois as sementes poderão começar o processo de germinação durante o processamento e não servirão para serem guardadas.

- Para algumas mutações, os frutos podem não apresentar coloração laranja ou vermelha. Assim, alguns critérios devem ser estabelecidos para coleta desses frutos em específico. Algumas dessas mutações são *Never ripe (Nr)*, *non-ripening (nor)*, *ripening inhibitor (rin)*, *yellow flesh (r)* e *lutescent (l)*. No caso dessas mutações, deve se coletar os frutos quando eles mudarem de verde para um tom amarelado ou verde claro. Os frutos imaturos de *lutescent* são brancos, mas se tornam levemente amarelados quando maduros.

## 5. PROCESSAMENTO DAS SEMENTES

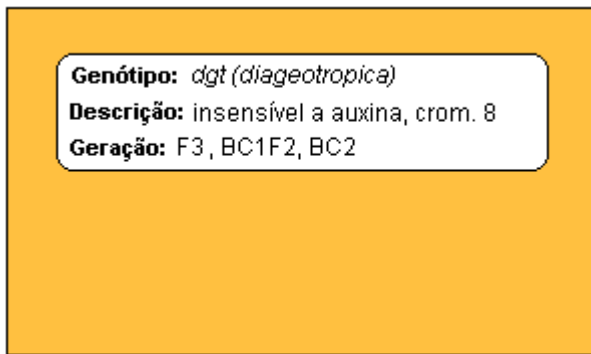
- Para realizar essa etapa são necessários os seguintes materiais visualizados na **figura 4**, os quais podem ser adquiridos facilmente em supermercados e mercearias.
- Os frutos devem ser cortados ao meio para facilitar a retirada das sementes, que saem junto com a polpa.
- As sementes são colocadas num copo plástico descartável contendo um pouco de água (mais ou menos o mesmo volume de polpa), adiciona-se uma pitada de fermento biológico. O ideal é utilizar levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) liofilizada, a qual pode ser encontrada em supermercados e padarias. Pode-se agitar um pouco o copo para homogeneizar a levedura com a água.
- Essa suspensão de leveduras é mantida juntamente com as sementes por **12 h** ou até que a fermentação tenha ocorrido.
- A fermentação é necessária para a retirada da mucilagem que fica em volta da semente, a qual impede que as sementes sejam bem limpas para serem estocadas. Em alguns casos a fermentação é necessária para eliminar patógenos que são transmitidos por sementes (ex. o vírus do mosaico do tabaco, TMV).
- Após o período de fermentação, despeja-se as sementes em um peneira. As sementes são então lavadas em água corrente e despejadas em um papel, no qual são espalhadas e deixadas ao ar livre, na sombra, para secar.
- As sementes tendem a grudar no papel, mas podem ser retiradas, após secas, com auxílio de uma régua.
- Um ou dois dias (quentes) são suficientes para que as sementes sequem e possam ser armazenadas.



**Figura 4.** Utensílios necessários para o processamento de sementes de tomateiro. Os frutos podem ser cortados transversalmente com auxílio de uma faca de mesa (1), e deixados para fermentar em copos plásticos (2). Após dois dias de fermentação, a polpa deve ser vertida em uma peneira (3) e lavada com água corrente. As sementes lavadas são postas para secar em papel comum (4). Tanto os copos plásticos, quanto os papéis devem ser corretamente identificados com o nome do genótipo e a geração em que se encontra. Para tal, é recomendado o uso de canetas (5) cuja escrita não se apaga com água.

## 6. ESTOCAGEM DAS SEMENTES

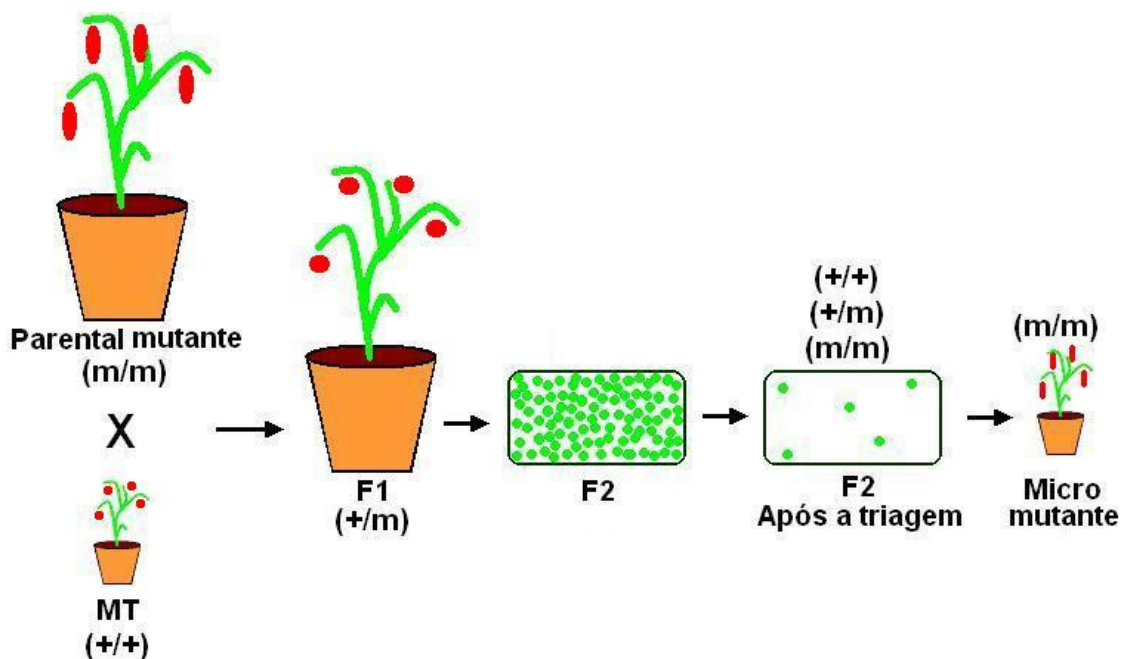
- As sementes devem ser embrulhadas em envelopes de papel alumínio, sendo um envelope para cada geração (BC1, F3, BC2, etc). Os envelopes de papel alumínio são colocados dentro de um envelope de papel, sendo um envelope deste para cada genótipo de tomateiro.
- O envelope de alumínio deve conter as seguintes identificações: genótipo, geração, mês e ano da coleta das sementes. Na etiqueta do envelope de papel deve conter: genótipo, descrição do genótipo e as gerações contidas no envelope (**Figura 5**).
- Esses envelopes são mantidos em recipientes plásticos, com tampa e com gesso (sílica gel), e armazenados em geladeira.
- Ter recipientes organizados, sendo um para parentais, outro para F1, F2 e BC1 (que ainda não foram triados para porte micro) e outro com plantas de porte-micro (F3, BC1F2, BC2.... BC6), etc.
- Dentro de cada recipiente há uma lista com os genótipos e as gerações presentes ali. É importante que, toda vez que se acrescente ou exclua um genótipo e/ou geração do frasco, essa alteração seja feita também na lista.



**Figura 5.** Modelo de etiqueta para o envelope de papel utilizado no armazenamento das sementes.

## 7. INTROGRESSÃO DE GENES

- A cv Micro-Tom (MT) será sempre utilizada como receptora de pólen por apresentar marcadores recessivos (*dwarf*, *selfprunning* e *uniformfruit*) (Figura 6).
- **No caso de cruzamento de MT com cultivares de porte grande, o receptor de pólen (MT) deve ser plantado 30-40 dias após o plantio do doador. Quando o doador de pólen tiver o porte de MT, o receptor deve ser plantado 10 dias após o plantio do doador.** Esse procedimento garante que a formação das primeiras flores do receptor coincida com a disponibilidade de um grande número de flores já bem desenvolvidas do doador.



**Figura 6.** Esquema de cruzamento e seleção de genótipos. Após o cruzamento entre MT (vasos de 150 ml) e o parental mutante (vasos de 20L), a geração F1 ainda necessita ser cultivada em vasos maiores, devido a heteroziguidade dos genes de nanismos presentes em MT. Em F2, as plantas são semeadas em bandejas a fim de selecionar apenas as plântulas com porte micro, as quais podem conter (m/m e +/m) ou não conter (+/+) a mutação de interesse. As plântulas de porte micro são então transplantadas para vasos menores, sendo mais tarde verificado se a mutação de interesse está presente. Algumas mutações, sobretudo aquelas que afetam o formato das folhas, a pilosidade e a coloração do hipocótilo, podem ser selecionadas ainda no estágio de plântulas. O sina “(+/+)” equivale aos alelos não mutados de MT, e “(m/m)” aos alelos mutados do parental doador de pólen. A heterozigose está representadas por “(+/m)”.

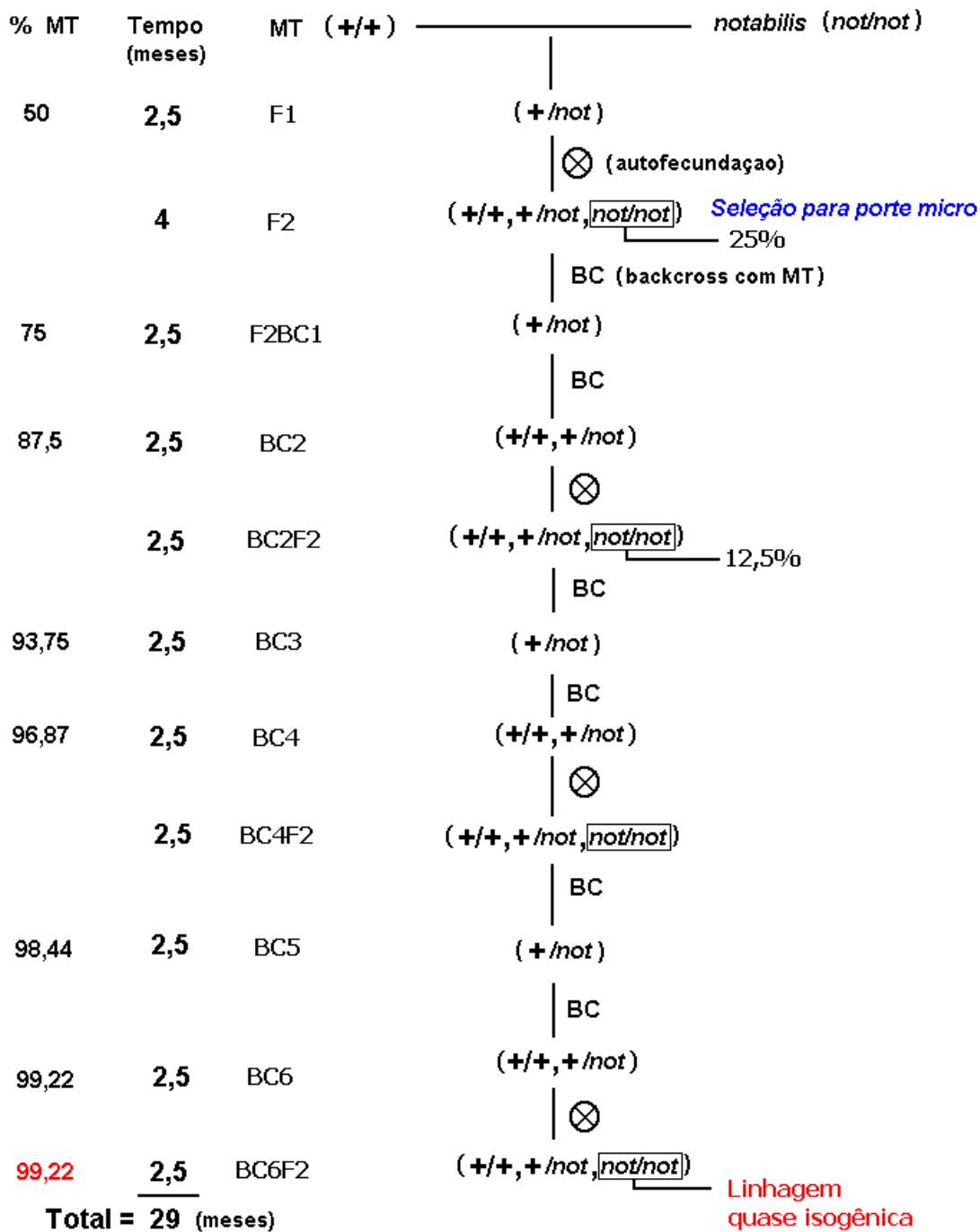
- Sementes F1 colhidas em Micro-Tom devem gerar plantas de tamanho normal. Sementes de BC1 e F2 devem ser germinadas em bandejas e após 14-21 dias devem ser eliminadas todas as plântulas maiores que o tamanho esperado para o fenótipo “micro-tom” (**Figura 7**). **Importante: como as plântulas estão em alta densidade, não se pode passar de 21 dias para a seleção e transplante, caso contrário elas se mostrarão cloróticas (deficientes em nitrogênio).**



**Figura 7.** Triagem de plantas com porte Micro-Tom. Sementes F2 ou BC1 devem ser semeadas em alta densidade (bandeja superior), sendo eliminadas todas as plântulas com porte maior que o esperado para o parental Micro-Tom. As plantas restantes (bandeja inferior) devem ser transplantadas para vasos de 150 ml de substrato sendo posteriormente selecionadas para a característica presente no parental mutante.

- As plântulas selecionadas devem ser transplantadas para vasos de 150 ml, sendo então feita a triagem para características presentes nos doadores de pólen. A partir da geração BC2, não há mais necessidade da triagem pelo fenótipo “micro-tom”, sendo então selecionadas apenas as características presentes originalmente nos doadores de pólen.
- Em caso da introgressão de mutações recessivas, as autofecundações devem ser feitas entre cada dois “backcross” (BCs) para que o fenótipo recessivo seja visualizado em homozigose e selecionado (**Figura 8**).



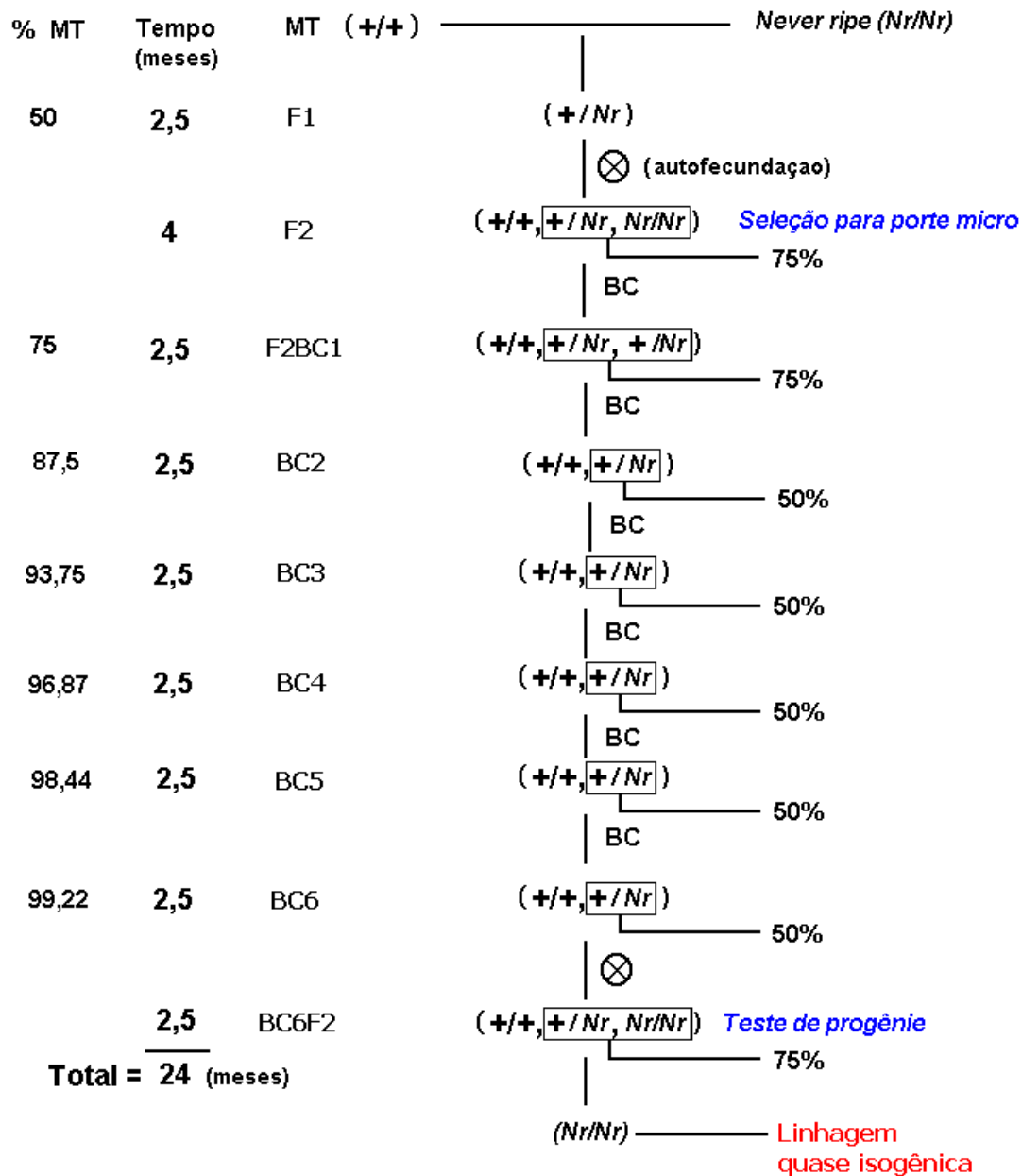


**Figura 8.** Esquema de introgressão de um gene recessivo. No exemplo, vemos a mutação *notabilis* (*not*). **Obs: como nem todas as plantas em BC2, BC4 e BC6 estão carregando o alelo, é necessário coletar sementes vindo da autofecundação de pelo menos 10 plantas nessas gerações.**

- Em caso da introgressão de mutações dominantes não são necessárias autofecundações para identificar o mutante (**Figura 9**). Contudo, na ultima geração (BC6F2) é necessário

fazer um teste de progênie para se determinar quais indivíduos são homocigotos para a mutação.

- O teste de progênie consiste em se cruzar plantas BC6F2 com o parental recorrente (MT). Aquelas plantas que só gerarem descendentes mutantes serão consideradas homocigotas.



**Figura 9.** Esquema de introgressão de um gene dominante. No exemplo, vemos a mutação *Never ripe* (*Nr*). MT= cv Micro-Tom; BC = backcross.

## 8. MANUTENÇÃO DE GENÓTIPOS

- Abaixo seguem as linhagens isogênicas (IL) (ex. *cst* e *jai1-1*) e quase isogênicas (NIL) (obtidas por retrocruzamentos) a cv. Micro-Tom. Informações quanto à necessidade de cuidado especial em alguma fase do ciclo de vida da planta também são mostradas.

**Tabela 1. NIL e IL no background Micro-Tom.**

<b>Genótipo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Precauções?</b>
<i>cv. Micro-Tom</i>	Cultivar Micro-Tom	Nenhuma
<i>cv. Micro-Tom PCT</i>	Cultivar Micro-Tom obtida com Paulo César Tavares	Nenhuma
<i>bushy root (brt)</i>	Pouco sensível a citocinina	Nenhuma
<i>diageotrópica (dgt)</i>	Pouco sensível a auxina	Nenhuma
<i>notabilis (not)</i>	Deficiente em ABA	Nenhuma
<i>flacca (flc)</i>	Deficiente em ABA	Nenhuma
<i>procera (pro)</i>	Supersensível a giberelina	<b>Sim. Ver item 8.1</b>
<i>gibberellin deficient-3 (gib-3)</i>	Deficiente na produção de giberelina	<b>Sim. Ver item 8.2</b>
<i>dumpy (dpy)</i>	Deficiente na produção de BR	Nenhuma
<i>curl3 (cu3)</i>	Insensível a BR	Nenhuma
<i>Regeneration locus 1 (Rg1)</i>	Capaz de regenerar a partir de raiz	<b>Sim. Ver item 8.1</b>
<i>cv. Micro-MsK</i>	Cultivar contendo o gene Rg1	Nenhuma
<i>lutescent (l)</i>	Senescência precoce	Nenhuma
<i>Lanceolate (La)</i>	Folhas simples em heterozigose	<b>Sim. Ver item 8.1</b>
<i>castrati (cst)</i>	Mutante para genes de identidade floral classe B. Conversão de estame em pistilo e pétala em sépala	<b>Sim. Ver item 8.3</b>
<i>atroviolacium (atv)</i>	Resposta exacerbada a fitocromo	Nenhuma
<i>aurea (au)</i>	Deficiente no cromóforo de fitocromo	Nenhuma
<i>yellow green 2 (yg2)</i>	Deficiente no cromóforo de fitocromo	Nenhuma
<i>lateral suppressor (ls)</i>	Sem gemas laterais e sem corola na flor	Nenhuma
<i>Mouse ears (Me)</i>	Folhas supercompostas	Nenhuma
<i>potato leaf Self pruning (ccSpSp)</i>	Folhas com pouco recorte, padrão de crescimento indeterminado	Nenhuma

**Alguns genótipos exigem determinado procedimento para completarem seus ciclos de vida com a produção de frutos com sementes. Tais procedimentos serão descritos abaixo:**

- **8.1. Genótipos com protusão de estilete (*pro*, *Rg1*, *La*):**

- Determinados genótipos (*pro*, *Rg1* e *La*) apresentam o estilete mais alongado. Dessa forma, a autopolinização é prejudicada. Portanto, para a produção de sementes nestes genótipos, faz-se necessário a polinização manual, retirando pólen da própria planta e aplicando no estigma.

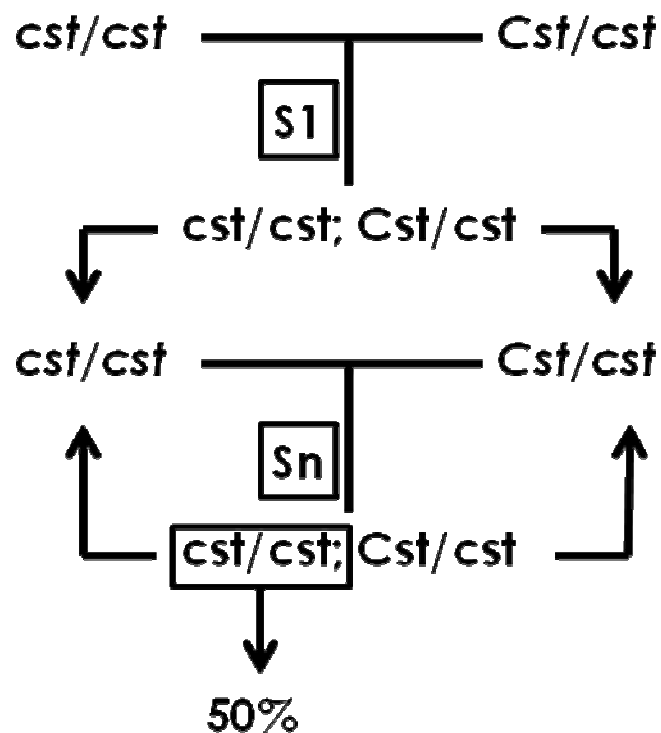
- **8.2. Genótipos deficientes na produção de giberelina (*gib-3*):**

- Genótipos deficientes na produção de giberelina (*gib-3*) não completam seu ciclo de vida sem aplicação exógena do hormônio. Portanto, tal aplicação se faz necessária
- A primeira aplicação de giberelina deve ser realizada quando as sementes forem postas para germinar. A germinação das sementes dos genótipos deficientes na produção de giberelina deve ser realizada em caixas gerbox, com papel filtro embebido em 10ml de GA<sub>3</sub> 10μM, na ausência de luz nos primeiros 4 dias.
- Após as plântulas serem transferidas para a casa de vegetação e transplantadas para vasos individuais, deve-se aspergir, semanalmente, GA<sub>3</sub> 100μM aos mutantes, permitindo o crescimento, florescimento e geração de sementes.

- **8.3. Genótipos fêmea ou macho estéreis (*cst* e *jai1*):**

- Alguns genótipos apresentam esterilidade em um dos órgãos sexuais. Este fato impossibilita a formação de sementes por autofecundação. Assim, é necessário cruzar sempre com o não mutante Micro-Tom para a manutenção. Porém, tal cruzamento, sempre que realizado, nos daria 25% de homocigotos na geração seguinte. Existe, porém, alguns procedimentos que podem ser tomados para que obtenhamos 50% de sementes homocigotas para a mutação desejada.
- Primeiramente, identifica-se mutantes homocigotos *jai1* ou *cst*, os quais são cruzados com MT para produção de sementes heterocigotas F1
  - As sementes F1 são então semeadas e as plantas resultantes são cruzadas novamente com os mutantes homocigotos da geração anterior mantidos por propagação vegetativa
  - Esse cruzamento produzirá 50% sementes homocigotas recessivas *jai1/jai1* ou *cst/cst*, e 50% de sementes heterocigotas, *Jai1/jai1* ou *Cst/cst*. Esse lote de semente é guardado para uso ou para continuar produzindo uma população segregando 1:1 para o mutante (ver abaixo)
  - Para continuar produzindo sementes que segregam 1:1 para o mutante, basta plantar a geração descrita acima. No caso de *cst*, ela gerará plantas homocigotas macho estéreis que receberão pólen dos seus irmãos heterocigotos, obtendo-se uma geração de "sibilings" (S1). No caso de *jai1* as fêmeas estéreis homocigotas doarão pólen para os irmãos heterocigotos.

- Cabe lembrar que o procedimento normal para manutenção de tais genótipos seria realizar o cruzamento destas plantas com MT. O que mostra-se aqui é que tal cruzamento não deve ser realizado, e sim efetuar a cruzamento entre irmãos.
- Na geração obtida (S1) realiza-se novamente a seleção das plantas homozigotas recessivas (macho ou fêmea estéreis) e as cruza com os seus irmãos, que são, obrigatoriamente, heterozigotos, obtendo a geração S2, e assim sucessivamente (Sn).
- Note que, quando multiplicada essa geração (S2), as gerações seguintes (Sn) sempre trarão 50% de homozigotos para o mutante desejado (figura 10).



**Figura 10.** Esquema de multiplicação para genótipos macho/fêmea estéreis (aqui exemplificado para *cst*) obtendo elevado número de sementes homozigotas para mutação desejada.

- Em resumo, o procedimento para maior obtenção de sementes homozigotas para a mutação recessiva macho/fêmea estéril é realizar cruzamento entre irmãos (*sib*) ao invés de retornar o cruzamento com MT. Chegando a geração S2 (e Sn), as sementes estão prontas para serem armazenadas, pois sempre teremos 50% de homozigotos recessivos.