

(11) *Número de Publicação: PT 91925 B*

(51) *Classificação Internacional: (Ed. 6)*
A01H001/02 A

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) <i>Data de depósito:</i>	1989.10.06	(73) <i>Titular(es):</i>	
(30) <i>Prioridade:</i>	1988.10.08 JP 63/254297	NICHIREI CORPORATION 6-19-20 TSUKIJI CHU-KU TOKYO 104	JP
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i>	1990.04.30	(72) <i>Inventor(es):</i>	
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i>	11/94 1994.11.16	GEORG MELCHERS YOSHIHARU MOHRI KAZUO WATANABE SUSUMU WAKABAYASHI KAZUHIKO HARADA	DE JP JP JP JP
(54) <i>Epígrafe:</i>	PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE TOMATEIROS CUJOS ORGÃOS MASCULINOS SÃO ESTERILIZADOS	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA	PT

(57) *Resumo:*

[Fig.]

**DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO**

N.º 91 925

**REQUERENTE: NICHIREI CORPORATION, japonesa, industrial e
comercial, com sede 6-19-20 Tsukiji, Chuo
-ku, Tokyo 104, Japão.**

**EPÍGRAFE: " PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE TOMATEIROS CU
JOS ORGÃOS MASCULINOS SÃO ESTERILIZADOS "**

**INVENTORES: Georg Melchers, Yoshiharu Mohri, Kazuo Watana
be, Susumu Wakabayashi, Kazuhiko Harada, Miho
Sakai e Eko Sato.**

**Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.**

**Japão em 08 de Outubro de 1988, sob o nº..
Sho-63-254297.**



Descrição da patente de invenção de Nichirei Corporation, japonesa, industrial e comercial, com sede em 6-19-20 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104, Japão, (inventores: Georg Melchers residente na Alemanha Ocidental, Yoshiharau Mohri, Kazuo Watanabe, Susumu Wakabayashi, Kazuhiko Harada, Miho Sakai e Eko Sato, residentes no Japão), para "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE TOMATEIROS CUJOS ÓRGÃOS MASCULINOS SÃO ESTERILIZADOS"

Descrição

Antecedentes da invenção

A presente invenção refere-se à produção de tomateiros cujos órgãos masculinos são esterilizados. No presente contexto considera-se uma planta de "órgãos masculinos esterilizados" se não produzir pólen ou pelo menos pólen germinável e for desse modo virtualmente incapaz de auto-fecundação, mas pode ser uma planta-mãe feminina num cruzamento com uma planta de órgãos masculinos férteis.

Os tomateiros de polinização aberta que são vulgarmente cultivados foram ultrapassados por diversas

variedades de tomates híbridos F_1 em alguns aspectos como o rendimento, uniformidade ou produção de frutos e a produtividade líquida. Mas por que o tomate é uma produção em cultura, a polinização e castração manual laboriosa foram antigamente pre-requisitos ao aproveitamento da vitalidade do híbrido na produção comercial de frutos híbridos.

Uma alternativa à manipulação da planta-mãe feminina, impedindo deste modo a autopolinização, é a utilização de mutantes de órgãos masculinos esterilizados ou outros mutantes esterilizados como plantas-mãe femininas. Conhecem-se 55 genes que afectam a esterilidade (esterilidade masculina genética ou $g\text{-mst}$) no tomate Lycopersicon esculentum Miller e tem-se utilizado as linhas de tomate $g\text{-mst}$ numa base limitada para a produção comercial de sementes e frutos híbridos em Israel, na Bulgária, em França e nos Estados Unidos.

Entretanto, dificuldades encontradas na produção de uma população de campo composta primeiramente de plantas-mãe de sementes $g\text{-mst}$ ("grupos homogéneos") retardaram a utilização mais ampla da esterilidade masculina genética na hibridização do tomate. Além disso, a introgressão de determinantes $g\text{-mst}$ (ms) num contexto desejado vincula geralmente vários gerações de cruzamento e seleção antes de se obter plantas de órgãos masculinos esterilizados que são por outro lado idênticas às da variedade desejada. Por estas razões, a produção de sementes de tomate F_1 tem sido até agora de trabalho intensivo, de um consumir de tempo e de custos de produção elevados.

Uma outra alternativa, pelo menos em teoria, seria o aproveitamento da esterilidade masculina genético-citoplásica no contexto da produção de tomate híbrido. Em termos gerais, os genes ms nucleares são insensíveis ao citoplasma, enquanto que a ação de determinantes nucleares (genes fr) que afectam a fertilidade mas-

culina é sensível ao citoplasma. Assim, os genes fr actuam apenas num certo tipo de citoplasma (o citoplasma S), que contém genes c específicos, a fim de produzir uma esterilidade "genetico-citoplásica" masculina (gc-mst).

De acordo com o pedido de patente japonesa nº 63-500001, por exemplo, as características dos órgãos masculinos esterilizados podem ser transferidos para uma variedade protectora de cenoura (*Daucus carota*) por combinação do núcleo de uma variedade protectora com um citoplasma enucleado de uma variedade de cenoura gc-mst. Nem esta estratégia nem nenhuma outra baseada na esterilidade masculina genético-cito plásica é praticável no tomate, contudo, devido a não se ter encontrado nenhum citoplasma utilizado no L. esculentum.

Resumo da invenção

É assim objecto da presente invenção proporcionar um método para produzir tomateiros de órgãos masculinos esterilizados que seja prático de realizar a nível comercial e que possa ser efectuado de modo eficaz num único passo, i.e., dentro de um espaço de tempo relativamente curto sem cruzamento ou cruzamentos anteriores.

É também objecto da presente invenção proporcionar meios para realizar a produção à escala comercial de semente ou fruto de tomate híbrido sem recurso a técnicas dispendiosas e de intenso trabalho até agora disponíveis.

Na realização destes objectos, proporcionou-se, de acordo com um aspecto da presente invenção, um método para a produção de tomateiros de órgãos masculinos esterilizados constituído pelos seguintes passos

- A) fusão de protoplastos de tomate que contém elementos cicoplásicos inactivados com protoplastos de

Solanum que contém elementos nucleares inactivados, para obter uma pluralidade de produtos de fusão; e

- (B) Regeneração de pelo menos um produto de fusão da referida pluralidade num tomateiro completo, de órgãos masculinos esterilizados.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, proporciona-se um tomateiro de órgãos masculinos esterilizados que é o produto do método acima descrito. Também se proporciona um grupo homogéneo de tomateiros de órgãos masculinos esterilizados que era anteriormente inacessível na prática.

A partir da descrição pormenorizada que se segue tornar-se-á evidentes outros objectivos, características e vantagens da presente invenção. Deve, no entanto, entender-se que a descrição pormenorizada e os exemplos específicos, embora indicando realizações preferidas da presente invenção, são dadas apenas como meio de ilustração, visto que várias alterações e modificações no espírito e âmbito da presente invenção se tornarão evidentes para os peritos na técnica a partir desta descrição detalhada.

Descrição pormenorizada das Formas de Realização preferidas

Concluiu-se que uma incompatibilidade entre os genes nucleares e os genes citoplásmicos pode ser utilizada com vantagem num método para proporcionar e produzir tomateiros de órgãos masculinos esterilizados, em que o método envolve a introdução de citoplasma estranho mas não genes nucleares estranhos, nas células de uma variedade cultivada de tomate desejada. Em particular, os protoplastos de uma variedade cultivada de tomate cujos órgãos masculinos estão para ser esterilizados, de acordo com a presente invenção, são tratados com um inibidor citoplas-

mico, a fim de inactivar desse modo os factores citoplásmicos, e são então fundidos com fotoplastos, obtidos a partir de uma planta de uma espécie Solanum, em que os genes nucleares foram inactivados. Evita-se deste modo a esterilidade total, tal como foi descrita a partir de híbridos somáticos regenerados a partir de heterocariões produzidos via fusão de protoplastos de tomate e de batata não-tratados (Solanum tuberosum), ver Melchers et al., Carlsberg Res. Commun. 43:203-18 (1978); Shepard et al., Science 219:683-89 (1983), enquanto se alcança uma forma de esterilidade parcial desejável (esterilidade dos órgãos masculinos).

Esta distinção entre as duas origens dos protoplastos utilizados na presente invenção é bem aceite taxonomicamente. Conforme anteriormente referido o tomate comercial pertence a uma espécie, da família Solanaceae, que é muito frequentemente referido como Lycopersicon esculentum Miller, embora tenham surgido nomes alternativos (Lycopersicon lycopersicum e Solanum lycopersicum L., por exemplo). A família Solaceae é principalmente dividida em duas sub-famílias, a Solanoides e a Cestroideae, a primeira das quais se encontra ainda subdividida em tribos. A Lycopersicon pertence à maior destas, a tribo Solaneae, que também inclui o género Solanum.

Os membros da família Solanaceae partilham uma estrutura floral geral, caracterizada por pétalas que estão fundidas juntamente, pelo menos na base, e pelos filamentos dos estames que estão fundidos às pétalas de modo que os estames parecem surgir da corola. Os dois géneros, Lycopersicon e Solanum são tradicionalmente separados na base da morfologia de antera única normalmente encontrada na espécie Lycopersicon, que inclui o tomate comercial. A flor de Lycopersicon possui normalmente cinco anteras (algumas variedades das espécies de cultura L. esculentum possuem seis), e os estames estão unidos juntamente para formar um cone de antera em forma de frasco que é caracterís-

tica do género. O gargalo do cone é formado pela extremidade estéril alongada de cada antena, e é esta característica que tem sido largamente utilizada para distinguir o Lycopersicon do Solanum. Também associado a esta característica está o aspecto invulgar de antena deiscente encontrado nas espécies Lycopersicon em que as anteras pendem lateralmente em contraste com as anteras deiscentes terminais encontradas na Solanum.

A distância bio-sistemática entre as espécies L. esculentum e Solanum empregues como fontes de protoplasto, de acordo com a presente invenção, não é decisiva; isto é a esterilidade dos órgãos masculinos desejada pode ser alcançada, com razoável reproducibilidade, enquanto os protoplastos de tomate de citoplasma inactivado são fundidos com protoplastos de nucleares inactivados derivados de uma planta Solanum. As fontes preferidas de protoplastos utilizados na presente invenção são as batateiras (S. tuberosum) e plantas de uma espécie Solanum que é considerada "análoga da batata" devido a possuir um pedúnculo ou tubérculo subterrâneo (Rizoma de armazenamento) com intermódulos encurtados. De acordo com este critério muitas espécies Solanum, tais como S. berthaultii Hawkes, S. chacoense, S. tarijense Hawkes, S. kurtzianum, S. demissum Lindl. e S. poliadenium Greenm., qualificam-se como análogo da batata.

Exemplar da série Solanum análogo da batata é a espécie tetreplóide S. acaule cresce como um invólucro a baixas temperaturas, alonga-se a temperaturas entre 20° e 30°C, e possui frutos que são redondos e de cor verde. As espécies podem propagar-se a partir de tubérculos e, a este respeito, assemelham-se a S. Tuberosum. As pétalas de S. acaule são brancas ou púrpura e as suas flores, embora muito maiores, tem uma morfologia que se assemelha à da batata. A marcante resistência à congelação da S. acaule identifica a espécie como uma atrativa fonte potencial de resistência ao frio no programa de produção de tomate. Veja-

-se Melchers, "Topatoes and Potatoes, Somatic Hybrids Between Tomatoes" and Potatoes", in TISSUE CULTURE AND RES 499, 505 (Akademiai kiado, Budapest 1984). A Solanum acaule é auto-fertilizável mas não se cruza sexualmente com tomate, um facto que tornou impossível até agora a produção de híbridos de S. acaule / L. esculentum.

A solanum acaule Hawkes é oriunda das altitudes mais elevadas dos Andes onde as plantas desta espécie são facilmente obtidas. Além disso, a S. acaule é cultivada há muitos anos no Max-Planck Institut fur Zuechtungsforschung (Cologne) FGR e, mais recentemente no Max-Planck Institut fur Biologie (Tuebingen, FGR), Material para propagação destas espécies está disponível nestas duas fontes (P.O.Box 5969, 100 LIMA, Peru), uma instituição pública e um centro internacional de pesquisa de batata.

Os protoplastos para utilização na presente invenção podem ser produzidos por técnicas enzimáticas convencionais. Existem inúmeras enzimas disponíveis comercialmente, tais como a "Celulase Onozuka R-10" e a pectinase "Macerosyme R-10", ambas produtos da Yakult Honsha Co. (Tokyo) que são apropriadas para utilização neste contexto.

Conforme descrito, por exemplo, por Eriksson, "Protoplast Isolation and Culture" in PLANT PROTOPLASTS 1-20 (CRC Press 1983) (aqui "Eriksson"), cujo conteúdo é aqui incluído por referência, o isolamento enzimático de protoplastos pode ser realizado de dois modos diferentes:

o método em dois passos (ou método sequencial) e o método de passo único. No método de dois passos, o tecido é primeiro tratado com uma macerozima ou pectinase que separa as células por degradação da lamela média. As células libertas são então tratadas com celulose, que liberta os protoplastos. Em geral, as células são expostas a diferentes enzimas por

periodos mais curtos do que os utilizados no método de passo único. No método de passo único o tecido é sujeito a uma mistura de enzimas, incluindo a macerozima e a celulose. Este método resulta geralmente em rendimentos mais elevados a partir de tecidos da folha, visto que as duas células do mesófilo (estacada ou esponjosa) libertam protoplástos, e é também de trabalho menos intensivo.

Visto que os protoplastos são de carga negativa e não se fundirão de modo espontâneo a frequências utilizáveis, a fusão dos protoplastos tem de ser induzida. Realizações preferidas a este respeito vinculam a utilização de um agente de fusão químico tais como cálcio elevado e pH elevado, veja-se Keller and Melchers, Z. Naturforsch. 28c: 737-41 (1973), e polietileno glicol (PEG), que é vulgarmente utilizado, como uma redução de PEG 1540, 4000 ou 6000. Também se podem utilizar métodos eléctricos para induzir a fusão de protoplastos, por exemplo, por meio da técnica de vibração do campo eléctrico descrita por Vienken et al., Physiol. Plant. 53:64 (1981).

A fusão das células entre protoplastos de Solanum e tomate pode, assim, ser efectuada de modo convencional. A partir das calosidades desenvolvidas a partir dos produtos de fusão resultantes, podem regenerar-se plantas completas de acordo com a metodologia disponível conforme descrito, por exemplo, por Shahin, Theor. Appl. Genet. 69:235-40 (1985) (aqui "o artigo de Shahin"), Melchers and Labib, Molec. Gen. Genet. 135:277-94 (1974), e Kao et al., Planta 120:215-27 (1974), cujos respectivos conteúdos estão aqui incluídos por referência. Em geral, cerca de 20% a 30% das calosidades obtidas deste modo são regeneráveis em plantas. As calosidades a partir das quais se podem regenerar tomateiros de órgãos masculinos estereis na presente invenção são obtidos a uma frequência, tipicamente na variação entre 10^{-1} e 10^{-3} , que é facilmente fornecida com as técnicas de seleção / regeneração da

calosidade disponíveis.

De acordo com a presente invenção, tratam-se os protoplastos de tomate de modo a inactivar o material genético contido no citoplasma. De preferência, isto é realizado por exposição dos protoplastos de tomate a um composto (aqui "inactivador citoplásmico") como o ácido iodo-acético ou Rhodamine 6-G, que bloqueia a replicação, ou rompe o DNA da mitocôndria. Um inactivador citoplásmico preferido neste contexto é o iodo-acetato ou um dos seus derivados, tal como iodo-acetamida. A inactivação citoplásmica pode ser realizada, de acordo com a presente invenção, por suspensão temporária, de protoplastos de tomate numa solução aquosa contendo uma quantidade do inactivador citoplásmico que tenha sido determinado empiricamente como sendo eficaz no rompimento do material genético citoplásmico.

Assim, a concentração específica do inactivador citoplásmico que é muito favorável pode ser facilmente determinada em relação, por exemplo, à condição fisiológica e de grupo da origem a partir da qual são obtidos os protoplastos de tomate. Para os protoplastos de tomate utilizados nos exemplos a seguir, as concentrações apropriadas do inactivador citoplásmico seleccionado (iodo-acetamida) localizavam-se na variação entre 5 e 30 mM.

Os protoplastos de Solanum a ser fundidos com os protoplastos de tomate, de acordo com a presente invenção, devem ser tratados para que a transmissão dos genes nucleares para os produtos de fusão seja impedida.

Esta inactivação nuclear é, de preferência, realizada por irradiação da planta dadora (antes do isolamento de protoplastos) ou dos próprios protoplastos,

após isolamento, com uma dose apropriada de raios x ou - .
Tal como com o inactivador citoplásmico, a dosagem de ra-
diação mais favorável para uma dada situação pode ser de-
terminada por experimentação de rotina. Para a S. acaule
concluiu-se ser apropriada uma dose de raios-x ou -
na variação de 10 a 200 krad.

Na presente invenção, os protoplastos
de tomate de citoplasma inactivado e os protoplastos de
Solanum que contém um complemento nuclear-genético inactiva-
do são submetidos a fusão de células a fim de dar origem
a uma cooperação modificada entre o núcleo e o citoplasma,
sem produção de efeitos mutagénicos significantemente
adversos nos genes nucleares dos tomateiros, produzindo
deste modo tomateiros de órgãos masculinos esterilizados.
As anteras e o pólen dos tomateiros de órgãos masculinos
estéreis da presente invenção diferem tipicamente na mor-
fologia da planta original ("mãe") masculina fértil do
seguinte modo:

- A) A planta de órgãos masculinos esterilizados pode ter anteras normais, contendo grãos de pólen todos coloridos com acetocarmina (uma indicação de viabilidade) mas não germinam.
- B) A planta de órgãos masculinos esterilizados possuem anteras normais mas muitos dos seus grãos de pólen são diminuidos e não germinam.
- C) A planta de órgãos masculinos esterilizados pode ter anteras diminuidas e não ter pólen.
- D) A planta de órgãos masculinos esterilizados pode ter anteras normais mas ou (i) significantemente poucos dos 100% dos seus grãos de pólen se colaram de acetocarmina ou (ii) alguns dos seus grãos de pólen germinam quando colocados num meio artificial

de germinação de pólen.

As plantas do tipo (D) são fontes potenciais de um genotipo (B-linha) conservador apropriado para utilizar na sustenção de uma linha de tomate identica mas de órgãos masculinos esterilizados produzida de acordo com a presente invenção. De qualquer modo, tais plantas são facilmente diferenciadas desde o tipo (A), tipo (B) e tipo (D), com base nos critérios de aparência e coloração de pólen anteriormente discutida.

Excepto no que se refere às antenas e ao pólen, não se detectam facilmente diferenças morfológicas entre os tipos acima referidos de plantas de órgãos masculinos esterilizados da presente invenção e as plantas-mãe. As plantas regeneradas a partir de produtos de fusão, de acordo com a presente invenção, diferem assim das plantas-mãe férteis em que a pólen do primeiro não germina nas estirpes dos tomateiros férteis sob condições normais de cultura de tomate.

A presente invenção é ainda descrita por referência aos exemplos ilustrativos que se seguem. Os exemplos mostram como se obtém novas variedades de tomate híbrido, conforme anteriormente descrito, utilizando plantas que representam cinco variedades de tomate, respectivamente, e um exemplo de espécie *Solanum*.

Exemplo 1

Seleccionou-se a variedade de tomate congénita "Sekai-ichi" por conversão à esterilização dos órgãos masculinos. De acordo com a ENCYCLOPEDIA OF HORTICULTURE, Vol. 6 (Seibundo Shinkosha), 1970, o Prof. Taniguchi do Tokyo Higher Agricultural College caracterizou a "Sekai-ichi" em 1933 como uma selecção da variedade "Ponderosa" ou um híbrido obtido por meio de um cruzamento

envolvendo a variedade "Beefheart". A "Sekai-ichi" cresce vigorosa e abundantemente, e é uma planta de crescimento médio ou lento. Cresce bem em locais onde a "Ponderosa" também cresce bem mas é colhida ligeiramente mais cedo. O fruto da "Sekai-ichi" é cor-de-rosa, achatado, e maior do que a média, com topes pontudos, cavidades profundas e fimbrias que se prolongam para trás.

As sementes de tomate da "Sekai-ichi" foram germinadas assepticamente e os cotiledones dissecados das mudas e colocados numa versão modificada da redução de enzimas TSE-2 descrita por Shahin, CELL CULTURE AND SOMATIC CELL GENETICS OF PLANTS, Vol. 1, pag. 375 (Vasil ed. Academic Press, 1984) para obter protoplastos. Modificou-se a composição da solução de enzimas de modo a conter 2% de celulose Onozuka R-10 e 0,2% Macerozyme R-10.

Isolaram-se os protoplastos assim produzidos e suspenderam-se numa solução contendo 10 mM de iodo-acetamida, e levaram-se então a descansar a 4°C durante 15 minutos para inactivar os factores citoplásmicos dos protoplastos.

Separadamente, propagaram-se assepticamente, por corte, plantas Solanum acaule. Dissecaram-se as folhas e irradiaram-se com raios-x e - γ para inactivar os seus genes nucleares. Subsequentemente, trataram-se as folhas com a solução de enzimas TSE-2 modificada anteriormente descrita, produzindo assim protoplastos.

Misturaram-se juntamente números iguais de protoplastos de tomate tratados com iodo-acetamida e protoplastos de S. acaule irradiados e submeteram-se a fusão das células de acordo com o método de Kao et al., Plant 120: 215-27 (1974). Modificaram-se as soluções para tratamento da fusão como a seguir se indica:

Adicionaram-se cinco gotas da solução de suspensão de protoplastos, por meio da pipeta de Pasteur, a um prato Petri de plástico; doze minutos mais tarde, adicionaram-se de igual modo doze gotas de solução de PEG $\leq 25\%$ (p/p) de polietileno glicol 1540, 10,5 mM de CaCl_2 e 0,7 mM de KH_2PO_4 e levou-se a solução a descansar durante vinte minutos.

Adicionaram-se então vinte gotas de uma solução de elevado pH/elevado Ca constituida por 50,0 mM de solução tampão glicina-NaOH (pH 10,5), 50,0 mM de CaCl_2 e 0,2M de manitol, conforme descrito em Keller e Melchers, Z. Naturforsch 28: 737-41 (1973); vinte minutos depois, adicionaram-se mais vinte gotas da mesma solução de elevado pH/elevado Ca após um volume de líquido comparável ter sido primeiro retirado da solução de suspensão. Retirou-se então um volume aproximadamente de vinte gotas e adicionou-se de lavagem contendo 0,75 mM CaCl_2 e 0,4 M de manitol. Quinze minutos mais tarde, após se ter retirado um volume de vinte gotas da solução de suspensão, adicionaram-se vinte gotas da solução de lavagem. Depois retirou-se a solução de lavagem, adicionaram-se vinte gotas da solução TM2 descrita por Shahin. Theor. Appl. Genet 69:235-40 (1985) (aqui "o artigo de Shahin") e, quinze minutos depois, substituiu-se a solução de suspensão pelo mesmo volume do meio TM2.

Realizou-se a cultura e a regeneração dos produtos de fusão dos protoplastos de acordo com o método descrito no artigo de Shahin. Mais especificamente, duas semanas após a fusão, transferiram-se as mini-calosidades obtidas do meio líquido para um meio sólido para uma cultura de seis dias a 24°C , sob desasseis horas de luz (500 lux). As calosidades que cresceram transferiram-se para um meio de regeneração, descrito no artigo de Shahin, para uma cultura de dois meses a 24°C sob desasseis horas de luz (4500-5000 lux). Transplantaram-se os rebentos que ge-

TM-5 (veja-se o artigo de Shahin) para uma cultura de dois meses. Enraizaram-se os rebentos e propagaram-se assepticamente por corte.

Cerca de quatro meses após a fusão transferiram-se para o solo de uma estufa para plantas.

Duas plantas regeneradas a partir da calosidade ("calosidade A") obtida por meio da fusão de protoplastos de tomate tratados com iodo-acetamida e protoplastos de S. acaule irradiados com raios - γ (100 krad), possuíam vinte e quatro cromossomas; As características destas plantas incluindo características das pétalas das antenas, não diferem das da "Sekai-ichi" mãe. Além disso, o pólen destas plantas, tal como o pólen da "Sekai-ichi", colora-se quase 100% com acetocarmina.

No entanto o pólen destas plantas não germina num meio de germinação de pólen artificial descrito por Brewbaker and Kwack, Amer. J. Botany 50: 859-65 (1963). Istr estava em surpreendente contraste com o pólen da "Sekai-ichi", 80% do qual germinou neste meio. As duas plantas regeneradas fracassaram na produção de quaisquer sementes por auto-polinização e formaram sementes apenas quando foram polinizadas com pólen de variedades de tomate comuns e Solanum pennellii, respectivamente. Quando polinizadas com pólen de "Sekai-ichi", obtiveram-se cerca de 190 sementes por fruto (média de sete frutos).

Quando as sementes híbridas obtidas por polinização com pólen de "Sekai-ichi" foram semeadas, as plantas resultantes não diferiam das "Sekai-ichi" nas características morfológicas ou em crescimento. As plantas regeneradas de modo semelhante de uma outra calosidade ("calosidade B") que havia sido obtida do mesmo modo da calosidade A, excepto por se terem usado raios-x em vez de raios - γ , também possuíam vinte e quatro cromossomas. Entre 7% e 44%

do pólen destas plantas coloriu-se com acetocarmina; o resto dos grãos de pólen eram diminuidos. O pólen colorido não germinou no meio artificial de germinação de pólen anteriormente referido.

Não se obtiveram sementes a partir das plantas da calosidade-B sob auto-polinização, mas obtiveram-se sementes a partir de todas as plantas quando foram polinizadas com outras variedades de tomate férteis, com o "Sekai-ichi".

Exemplo 2

Seguiram-se os processos do Exemplo 1, excepto por se utilizar cada uma das variedades de tomate "Red Cherry", "VF-36", "Delicious" e "Kuribara" como fonte de protoplastos e folhas de S. acaule irradiadas com raios- γ a 100 krad.

As características salientes de cada uma das variedades atrás referidas resumem-se a seguir:

- (1) Red cherry - Esta é uma variedade de tomate vermelho-cereja, e utilizou-se como um tomate vermelho-cereja tipo nesta experiência. As características do "Red cherry" são identicas às do tomate amarelo-cereja, excepto na cor do fruto. O "Red cherry" é conhecido desde há muito tempo e foi cultivado na Europa durante muitos anos. Embora popular, de início, na jardinagem caseira, as plantas "Red cherry" tem sido recentemente utilizadas de modo extensivo para a produção de tomates vermelho-cereja no Japão. A sua maturidade é intermédia entre as variedades de maturidade precoce e maturidade tardia. As plantas desta variedade crescem alto, largas e direitas. Os pedúnculos e folhas são verde médio e crescem densamente. Os frutos crescem em cachos de

7 a 9, e cada fruto é pequeno, redondo e vermelho, com diâmetros de cerca de 28 mm e pesos de cerca de 9 gramas. O fruto divide-se em duas câmaras, contendo cada câmara polpa e pequenas sementes. O gosto do fruto do "Red cherry" é suave.

- (2) VF-36 - uma espécie desenvolvida na Universidade da Califórnia em 1959 a partir de um cruzamento de VC255 com VR11, a VF-36 amadurece cedo e é resistente ao murchar da Fusarium e Verticillium. A VF-36 possui padrão de crescimento determinado (auto-elevação) com frutos que são grandes e pontudos de forma e pessam entre 160 e 200 gramas.
- (3) Delicious - Esta variedade é também conhecida há muito tempo e existem muitas famílias. Amadurece cedo e é apropriada para cultura rápida. "Delicious" adapta-se a qualquer género de solo bem drenado. É resistente à superfertilização. Os frutos são grandes, redondos e vermelhos, e tem uma forma muito agradável. Visto que o período de colheita é muito curto, é pouco razoável esperar que as colheitas sejam grandes.
- (4) Kurihara - uma linha de uma espécie de longa duração, "Kurihara" possui trepadeiras vigorosas, cresce grande e desenvolve grandes folhas. É apropriada para cultivo tardio e campo aberto, e por isso adapta-se bem a cultivo em estufa no Outono. É apropriado quer para tomate em fatias quer para uma grande variedade de aplicações. É uma planta de elevado rendimento que possui frutos de tamanho grande a médio. O fruto é alto arredondado mas, quando não se adiciona fertilizante suficiente, tende a tornar-se angular. Pode resistir a uma grande quantidade de fertilizante, mas podem esperar-se regularmente grandes colheitas com apenas uma pequena

quantidade de fertilizante. Devido à sua pele macia o fruto de "Kurihara" não se adapta bem ao transporte. O núcleo é pequeno. A pele muito fina e a polpa macia do fruto da "Kurihara" significam que o fruto racha quando amadurece demais. Assim, é importante ter cuidado com a regulação do tempo das colheitas.

Os rebentos enraizados obtidos a partir destas variedades foram testados pela capacidade de germinação do pólen conforme representado no Quadro 1. De acordo com o critério de germinação do pólen anteriormente referido, todas as plantas testadas eram de órgãos masculinos esterilizados, com a exceção de duas plantas, RC. A-a e VF B-a (veja-se o Quadro 1).

Uma das plantas obtidas a partir de "Red cherry" (RC B-b no Quadro 1) não seria diferente da "Red cherry" em termos de morfologia da flor. Além disso, o pólen da planta de órgãos masculinos esterilizados coloriu-se com acetocarmina do mesmo modo como o pólen da "Red cherry"-mãe. Mas o pólen da RC B-b, a não ser o pólen da "Red Cherry", não germinou em meio artificial de germinação de pólen. Além disso, não foram obtidas sementes a partir da planta de RC B-b após a auto-polinização. A planta dá frutos de cerca de 24 mm de diâmetro (média de 9 frutos) e obtiveram-se cerca de 82 sementes por fruto sob polinização com pólen de "Red cherry" (média de 4 frutos)

Quadro 1. Resultados da coloração com acetocarmina e germinação de pólen em meio artificial de germinação de pólen.

variedade 1 calosidade 2 rebento % de polen colorido com
acetocarmina

RC	A	a	97	5
A	b		63	0
A	c		100	0
B	a		100	0
B	b		100	0
C	a	sem pólen	-	-
C	b	sem pólen	-	-
D	a		64	0
D	b	100	0	0

VF	a		87	0
	b		42	0
B	a		42	9

Quadro 1 (continuação)

variedade	calosidade ²	rebento	% de pólen colorido com acetocarmina	% de germinação
1	2			

De	A	a	45	0				
	B	a	100	0				
	B	b	100	0				
Ku	A	a	22	0				
	B	a	sem pólen					
	C	a	17		0			
D	A	a	63					
	D	b	91	0				
	D	c	61					

1. RC: "Red cherry" VF: "VF-36" De: Delicious"
Ku: Kurihara
2. As designações alfabéticas em maiúsculas referem-se a calosidades diferentes das várias variedades. As designações em minúsculas referem-se a diferentes plantas derivadas a partir de várias calosidades.

Obtiveram-se também plantas de órgãos masculinos esterilizados quando, em vez de S. acaule, se utilizou S. tuberosum como fonte de protoplastos Solarum, de acordo com a presente invenção.

A presente invenção torna possível a conversão eficaz de qualquer variedade de tomate à esterilidade masculina num curto período de tempo, sem produzir quaisquer efeitos adversos, não-desejados, nas plantas resultantes. A presente invenção proporciona os meios para produzir um grupo homogéneo de tomateiros de órgãos masculinos esterilizados, que é de grande utilidade na obtenção de híbridos de tomate de base comercial. Além disso, os tomateiros de órgãos masculinos esterilizados produzidos pelo método da presente invenção possuem uma capacidade produtora de sementes que é praticamente igual à das plantas-mãe e, especialmente, são capazes de produzir sementes sem quaisquer alterações nas características da planta como resultado da polinização com o pólen do tomateiro utilizado para fusão. Assim, um tomateiro de órgãos masculinos esterilizados da presente invenção é bastante diferente das plantas de órgãos masculinos esterilizados produzidos até agora utilizando métodos convencionais e, ainda, representa uma significação contribuição para a produção de sementes e fruto de tomate F_1 .

REIVINDICAÇÕES

- 1^a -

Processo para a produção de tomateiros cujos órgãos masculinos são esterilizados, caracterizado por

- A) se fundir protoplastos de tomate os quais contém material genético citoplasmico inactivado com protoplastos Solanum que contém material genético nuclear inactivo, para se obter uma diversidade de produtos de fusão.
- B) se regenerar pelo menos um produto de fusão dos obtidos em A) dentro de um tomateiro completo cujos órgãos masculinos são esterilizados.

- 2^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, antes do passo A), se tratar os protoplastos de tomateiro com iodoacetato ou um seu derivado para produzir os referidos protoplastos de tomate que contém elementos cicoplasmicos inactivados.

- 3^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, antes do passo A), se produzir os referidos protoplastos Solanum que contém elementos nucleares inactivados, por se irradiar ou uma planta Solanum ou protoplastos Solanum com uma dose de esterilização de radiação de raios γ ou raios X.

- 4^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os referidos protoplastos Solanum que contém elementos nucleares inactivados são protoplastos de uma batateira ou de uma planta da espécie Solanum semelhantes à batateira.

- 5^a -

Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por os referidos protoplastos serem protoplastos S. acaule.

- 5^a -

Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por os referidos protoplastos serem protoplastos S. acaule.

A requerente reivindica a prioridade do pedido japonês apresentado em 8 de Outubro de 1988, sob o nº Sho-63-254297.

Lisboa, 6 de Outubro de 1989
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



RESUMO

"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE TOMATEIROS CUJOS ORGÃOS MASCULINOS SÃO ESTERILIZADOS"

A invenção refere-se a um processo para a produção de tomateiros cujos órgãos masculinos são esterilizados, que compreende:

- A) fundir-se protoplastos de tomate os quais contém material genético citoplásмico inactivado com protoplastos Solanum que contém material genético nuclear inactivo, para se obter uma diversidade de produtos de fusão.
- B) regenerar-se pelo menos um produto de fusão dos obtidos em A) dentro de um tomateiro completo cujos órgãos masculinos são esterilizados.