

Método de obtenção de híbridos interespecíficos entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum*⁽¹⁾

Cláudia Silva da Costa Ribeiro⁽²⁾ e Leonardo de Britto Giordano⁽²⁾

Resumo – A transferência de genes da espécie silvestre *Lycopersicon peruvianum* para a espécie *L. esculentum* por processo convencional de hibridação é limitada por incompatibilidade. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de obtenção de híbridos entre essas duas espécies, mediante a técnica de cultura de óvulos, tendo em vista o interesse em transferir genes presentes em acessos de *L. peruvianum* que conferem resistência a *Septoria lycopersici*. Foram utilizados os acessos CNPH 946, CNPH 947 e CNPH 948 de *L. peruvianum* e as cultivares Floradade e Ipa-5 de *L. esculentum*. Sementes híbridas de frutos com 25-68 dias após a polinização foram colocadas para germinar inicialmente em meio de cultura Murashige & Skoog (MS), e posteriormente em meio HLH. As sementes foram incubadas no escuro a 25°C. Só foram regenerados os híbridos provenientes das sementes colocadas para germinar em meio HLH. Dezesesseis híbridos foram obtidos de 1.573 óvulos, sendo de 1% a taxa de regeneração de plantas híbridas. As características morfológicas dos híbridos F₁ quando comparadas com os dois genitores indicaram que as plantas eram realmente resultado da hibridação entre *L. esculentum* e *L. peruvianum*.

Termos para indexação: *Septoria lycopersici*, hibridação, cultura de óvulos, regeneração *in vitro*.

Interspecific hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*

Abstract – With the objective of obtaining interspecific hybrids between *Lycopersicon esculentum* Mill. and *L. peruvianum* Mill., cultivars ‘Floradade’ and ‘Ipa-5’ were crossed with three accessions (CNPH 946, CNPH 947, CNPH 948) of *L. peruvianum* resistant to septoria leaf spot (*Septoria lycopersici*). Crossability barriers between these two species were overcome by using ovule culture. Putative interspecific F₁ hybrid seeds from fruits harvested 25-68 days after pollination were initially placed in contact with the MS medium and later with the HLH medium. The immature seeds were cultured on HLH medium. Sixteen putative hybrids were obtained from a total of 1,573 ovules, thus 1.0% of the ovules that were plated germinated. The morphological characteristics of the putative hybrids and their parents indicated that the plants were truly hybrids.

Index terms: *Septoria lycopersici*, hybridization, ovule culture, *in vitro* regeneration.

Introdução

A maioria dos genes de resistência a patógenos em tomate foi introduzida por meio de cruzamentos entre *Lycopersicon esculentum* com espécies silvestres do gênero *Lycopersicon* (Young & Tanksley, 1989).

L. peruvianum é a espécie com maior variabilidade dentro do gênero *Lycopersicon*. Abriga uma série de características interessantes, particularmente resistência a doenças e a nematóides, e alto conteúdo de vitamina C (Boukema & Den Nijs, 1984). Esta espécie foi citada como fonte de resistência à *Septoria lycopersici*, *Cladosporium fulvum*, *Meloidogyne* spp., *Pyrenochaeta terrestris*, vírus-do-mosaico-do-fumo (TMV), cálice gigante, geminivírus, vírus-do-mosaico-do-pepino (CMV), broto crespo (CTV), mosaico (potyvirus), vira-cabeça (TSWV) (Kalloo, 1991) e traça-do-tomateiro (Lourenção et al., 1984).

⁽¹⁾ Aceito para publicação em 13 de julho de 2000.

⁽²⁾ Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, Caixa Postal 218, CEP 70359-970 Brasília, DF.
E-mail: claudia@cnph.embrapa.br, giordano@cnph.embrapa.br.

A transferência de genes de resistência presentes em *L. peruvianum* para *L. esculentum*, por meio do processo convencional de hibridação, é limitada por barreiras de incompatibilidade entre as duas espécies. Geralmente o estigma de *L. peruvianum* rejeita o pólen de *L. esculentum* (Kalloo, 1991). Este tipo de incompatibilidade interespecífica foi também denominada de incongruidade unilateral (Hogenboom, 1975, citado por Tigchelaar, 1986). Assim, o híbrido só pode ser obtido se *L. esculentum* for utilizada como genitor feminino e *L. peruvianum* como genitor masculino. Além disso, ocorrem barreiras pós-zigóticas que provocam a degeneração do endosperma e conseqüentemente, a morte do embrião híbrido (Barbano & Topoleski, 1984).

O primeiro sucesso de hibridação entre *L. esculentum* e *L. peruvianum*, por meio de cultura de embrião, foi obtido por Smith (1944). Híbridos interespecíficos regenerados a partir de cultura de embrião também foram obtidos por Lesley (1950), Rick (1983), Maheswaran et al. (1986) e Lai et al. (1990). No Brasil, híbridos interespecíficos entre estas duas espécies foram obtidos a partir de calos (Siqueira et al., 1988; Segeren et al., 1993).

A técnica de cultura de embrião consiste em retirar o embrião imaturo da semente e colocá-lo em meio de cultura, cuja função é a de substituir o endosperma, permitindo o desenvolvimento do embrião e a regeneração de plantas híbridas (Rick & Butler, 1956). Entretanto, a taxa de regeneração de plantas híbridas ainda é muito baixa. As barreiras pós-zigóticas envolvem mais do que simplesmente uma degeneração do endosperma; o embrião normalmente não se desenvolve bem, e não faz a transição do estágio heterotrófico para autotrófico, tornando, assim, a cultura *in vitro* extremamente difícil (Poysa, 1990).

A cultura de óvulo é uma variante da cultura de embrião e consiste em colocar a semente imatura diretamente em meio de cultura, devido à dificuldade de se identificar ou remover o embrião (Doganlar et al., 1997).

Além da composição do meio de cultura (Neal & Topoleski, 1983), o sucesso da técnica de cultura *in vitro* para a regeneração de híbridos interes-

pecíficos depende da idade adequada do fruto para a retirada do embrião ou semente (óvulo), (Barbano & Topoleski, 1984; Chen & Imanishi, 1991; Chen & Adachi, 1992), e também da compatibilidade de cruzamento entre determinados genótipos de *L. esculentum* e de *L. peruvianum* (Chen & Adachi, 1992, 1996; Duval et al., 1993).

Segundo Barbano & Topoleski (1984), o embrião híbrido de *L. esculentum* x *L. peruvianum* começa a se deteriorar cerca de 10 dias após a polinização (dap), antes da diferenciação dos cotilédones, e se completa aos 17 dap, ao passo que para Smith (1944), a degeneração completa dos embriões ocorre aos 40 dap. As diferenças entre os resultados obtidos por Smith (1944), Barbano & Topoleski (1984) e Cheng & Adachi (1992) podem ser atribuídas ao uso de diferentes genótipos de *L. esculentum* e *L. peruvianum* nos respectivos estudos. Para Chen & Imanishi (1991), o sucesso da cultura de óvulo depende muito da cultivar de tomate utilizada como genitor feminino, em face de diferenças nas taxas de germinação de sementes imaturas entre diferentes genótipos.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de obtenção de híbridos entre essas duas espécies, mediante a técnica de cultura de óvulos, tendo em vista o interesse em transferir genes presentes em acessos de *L. peruvianum* que conferem resistência a *Septoria lycopersici*.

Material e Métodos

Plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill. (cvs. Floradade e Ipa-5) e de *L. peruvianum* (L.) Mill. (CNPH 946, CNPH 947 e CNPH 948) foram cultivadas em casa de vegetação, na Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, durante todo o período do experimento. Os cruzamentos interespecíficos foram feitos sempre utilizando *L. esculentum* cv. Floradade e IPA-5 como genitores femininos, e os três acessos de *L. peruvianum* como genitores masculinos.

Botões florais de plantas de *L. esculentum* foram emasculados 1-2 dias antes da antese e polinizados manualmente com pólen de *L. peruvianum* colhido de flores recém-abertas. Os botões foram cobertos com uma proteção de papel-alumínio e etiquetados.

Os frutos foram colhidos em idades que variaram de 25-68 dias após a polinização (dap), e desinfestados por imersão em etanol 95%, por 10 a 15 minutos. A mucilagem que envolve as sementes foi retirada com o auxílio de papel-filtro, e as sementes foram colocadas para germinar diretamente em placa de Petri de 9 cm de diâmetro com meio de cultura. Todas as sementes obtidas dos diferentes cruzamentos foram plaqueadas, e sementes de frutos diferentes não foram misturadas em uma mesma placa de Petri. Foram colocadas por placa de Petri, no máximo, 24 sementes. Os meios de cultura utilizados para recuperação dos embriões foram HLH (Neal & Topoleski, 1983), cuja composição encontra-se na Tabela 1, e o meio com composição mineral de Murashige & Skoog (1962), acrescido de 3% de sacarose, 6 g/L de Difco-ágar e em mg/L: i-inositol, 100; glicina, 2,0; tiamina.HCl, 1,0; piridoxina.HCl, 0,5; ácido nicotínico, 0,5. As placas com as sementes foram mantidas no escuro a 25 °C, até a germinação.

Após a germinação, as plântulas foram transferidas e mantidas em tubos de ensaio contendo meio de cultura

Tabela 1. Composição do meio HLH para cultura de embriões de tomateiro.

Composto	mg/L
NH ₄ NO ₃	1.601
KNO ₃	2.022
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	276,02
CaCl ₂ .2H ₂ O	441,07
MgSO ₄ .7H ₂ O	739,50
H ₃ BO ₃	9,28
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90
ZnSO ₄ .7H ₂ O	11,50
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,375
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,242
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,238
KI	0,830
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80
Na ₂ EDTA	37,22
Sucrose	60.000
Inositol	20
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina HCl	0,5
Tiamina	1,0
Glicina	0,5

Fonte: Neal & Topoleski (1983).

½ MS (metade da concentração de sais e vitaminas do meio MS - Murashige & Skoog (1962), 20 g/L de sacarose, suplementados com 0,5 mg/L de ácido indolacético - AIA), sendo repicadas em intervalos de 20-30 dias. Os híbridos foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura média de 22°C, fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, e intensidade luminosa em torno de 1.000 lux.

Os parâmetros utilizados para a caracterização morfológica dos híbridos foram: presença de pêlos nas hastes, formato da folha, formato da flor, coloração da flor, posição do estilete em relação ao cone de anteras, coloração do fruto e compatibilidade da autopolinização.

As características morfológicas das cultivares Floradade e IPA-5 foram determinadas: presença de pêlos nas hastes, cor de folha verde, inflorescência sem brácteas, cor de pétalas amarelo-clara, posição do estilete abaixo do cone de anteras, coloração de fruto maduro vermelha, e plantas autocompatíveis.

Nos acessos de *L. peruvianum* (CNPH 946, CNPH 947 e CNPH 948) foram identificadas as seguintes características morfológicas: planta glabra, cor da folha verde-acinzentada, inflorescência com brácteas grandes, cor de pétala amarelo-escuro, estilete projetado acima do cone de anteras, coloração de fruto maduro verde, com estrias roxas e plantas auto-incompatíveis.

Resultados e Discussão

Nenhuma das 384 sementes germinou em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) e das 1.573 sementes, em meio HLH, 20 germinaram; destas, 16 híbridos foram regenerados, constituindo uma taxa de regeneração de 1,02% (Tabela 2). Este resultado pode ser considerado satisfatório, visto que Chen & Imanishi (1991) obtiveram uma taxa de germinação de 0,39% utilizando o meio MS para a germinação de óvulos de híbridos interespecíficos entre *L. esculentum* x *L. peruvianum*, ao passo que Doganlar et al. (1997), ao usar o mesmo meio acrescido de 100 mg/L de mio-inositol, 0,4 mg/L de tiamina-HCl e 30 g/L de sacarose, regeneraram 5 plantas híbridas (0,33% de germinação). Neal & Topoleski (1983) regeneraram plântulas híbridas a partir de embriões imaturos cultivados no meio MS, porém, o meio de cultura HLH destacou-se entre os demais avaliados. Embriões híbridos no estágio globular

Tabela 2. Influência do genótipo e da idade do embrião (dias após a polinização - dap) no número de sementes híbridas germinadas e de plantas regeneradas em meio HLH.

Cruzamento	Idade do embrião (dap)	Nº de frutos	Nº de sementes plaqueadas	Nº de sementes germinadas	Nº plantas regeneradas	% de plantas regeneradas
I-5 x 946	25	1	37	0	0	0
I-5 x 946	43	2	54	0	0	0
I-5 x 947	25	2	47	0	0	0
I-5 x 947	32	3	68	0	0	0
I-5 x 947	34	2	67	0	0	0
I-5 x 947	37	1	41	3	1	2,4
I-5 x 947	41	2	56	0	0	0
I-5 x 947	43	1	36	0	0	0
I-5 x 947	45	2	46	0	0	0
I-5 x 947	48	1	26	0	0	0
I-5 x 948	45	1	65	0	0	0
Subtotal	-	18	543	3	1	0,18
FD x 947	27	2	201	1	1	0,5
FD x 947	32	1	44	0	0	0
FD x 947	38	1	53	6	5	9,4
FD x 947	43	2	50	0	0	0
FD x 947	46	1	68	2	2	2,9
FD x 947	53	1	77	2	2	2,6
FD x 947	57	4	421	6	5	1,2
FD x 947	68	3	43	0	0	0
FD x 948	68	3	73	0	0	0
Subtotal	-	18	1.030	17	15	1,45
Total	-	36	1.573	20	16	1,02

foram cultivados por Chen & Adachi (1992) no meio HLH suplementado de 1 g/L de extrato de levedura e 2 mg/L de BA, e germinaram 20 dias após o plaqueamento.

Neste trabalho, os óvulos foram retirados dos frutos em idades que variaram de 25-68 dias após a polinização (dap). Apesar de terem sido regeneradas plantas de óvulos em diferentes idades, a melhor taxa de germinação e de regeneração de plantas foi aos

38 dap (9,4%) no cruzamento da cultivar Floradade (FD) com a linha de *L. peruvianum* CNPH 947. Neste mesmo cruzamento, foi observada uma taxa de germinação de 0,5, 2,9, 1,2 e 2,6% em óvulos resgatados, respectivamente, aos 27, 46, 53 e 57 dap. A única planta regenerada do cruzamento Ipa-5 (I-5) x CNPH 947 foi de um óvulo retirado com idade de 38 dap. Estes resultados aproximam-se dos obtidos por Lai et al. (1990), que indicaram 35 dap como a melhor idade

para resgate de embriões híbridos. Chen & Adachi (1992) inocularam óvulos de diferentes idades, e melhores taxas de regeneração foram obtidas em embriões resgatados aos 13, 18 e 21 dap. Chen & Adachi (1996) retiraram óvulos de frutos em idades que variaram de 13 a 26 dap, e a maior frequência de híbridos regenerados foi obtida aos 25-26 dap. Segundo Chen & Adachi (1992), apesar de o endosperma estar totalmente degenerado aos 9 dap, 3,3% a 16,7% dos embriões híbridos continuam a se desenvolver. Para Duval et al. (1993), a idade do fruto adequada para a retirada de óvulos variou de acordo com a cultivar de tomate utilizada. Verificou-se que as idades 25 e 26 dap foram mais efetivas para a obtenção de plantas em que a cultivar Floradel foi utilizada como genitor feminino, enquanto com a cultivar Santa Cruz a melhor idade foi 34 dap.

A existência de compatibilidade de cruzamentos entre genótipos de *L. esculentum* e *L. peruvianum* também foi observada neste trabalho. Melhores resultados foram obtidos quando a cultivar Floradade foi utilizada como genitor feminino, em relação à cultivar Ipa-5, em cruzamentos com a linha de *L. peruvianum* CNPH 947, com 1,45% e 0,18% de taxa de regeneração, respectivamente. Não foram regeneradas plantas de cruzamentos em que CNPH 946 e CNPH 948 foram utilizados como genitores masculinos. Esta compatibilidade também pode ser medida pelo número médio de sementes por frutos, que foi 63,8 e 27,6 sementes/fruto para os cruzamentos FD x CNPH 947 e I-5 x CNPH 947, respectivamente.

Os híbridos interespecíficos de *L. esculentum* x *L. peruvianum* normalmente apresentam características de hastes, folhas, tamanho de fruto e precocidade estreitamente ligadas ao genitor silvestre (Kalloo, 1991).

As principais características que evidenciaram a natureza híbrida dos híbridos obtidos foram o estigma projetado acima do cone de anteras, pilosidade da haste intermediária (Figura 1), morfologia da folha intermediária (Figura 2), e a auto-incompatibilidade dos híbridos (Tabela 3). Essas evidências descartam a possibilidade de ter havido contaminação com o pólen do genitor feminino, a cultivar Floradade, uma vez que esta é autocompatível.

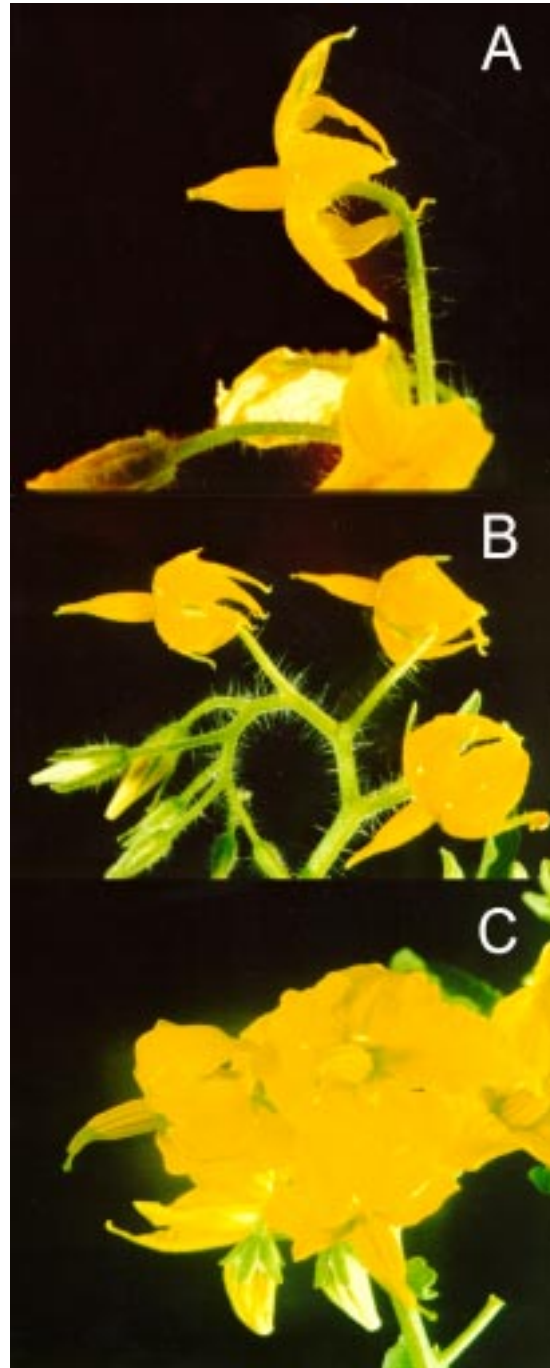


Figura 1. Híbrido interespecífico (B), reunindo as características de estigma projetado do genitor masculino *L. peruvianum* (C) e pilosidade do genitor feminino *L. esculentum* (A).



Figura 2. Comparação da morfologia da folha do genitor feminino *L. esculentum* (A), do híbrido interespecífico (B) e do genitor masculino *L. peruvianum* (C).

Tabela 3. Comparação de características morfológicas dos híbridos interespecíficos e de seus progenitores, *Lycopersicon esculentum* e *Lycopersicon peruvianum*.

Característica	<i>L. esculentum</i>	<i>L. peruvianum</i>	Híbridos interespecíficos
Pilosidade	Piloso	Glabro	Piloso
Morfologia da folha	Tipo esculentum	Tipo peruvianum	Intermediária
Cor de folha	Verde	Verde-acinzentada	Verde-acinzentada
Morfologia da flor	Tipo esculentum	Tipo peruvianum	Intermediária
Inflorescência	Sem brácteas	Com brácteas grandes	Com brácteas pequenas
Cor de pétala	Amarelo-clara	Amarelo-escura	Amarelo-escura
Posição do estilete	Não projetado	Projetado	Projetado
Compatibilidade	Autocompatível	Auto-incompatível	Auto-incompatível
Coloração do fruto	Vermelha	Verde	Laranja

Conclusões

1. O meio HLH de Neal & Topoleski contribui positivamente na regeneração de plantas híbridas resultantes do cruzamento interespecífico entre *L. esculentum* e *L. peruvianum*.

2. Em cruzamentos onde é utilizada a cultivar Floradade como genitor feminino, a melhor época para colheita dos frutos e remoção das sementes para plaqueamento é aos 38 dias após polinização.

3. Os genótipos usados nos diferentes cruzamentos exercem grande influência no número de plantas regeneradas.

Referências

- BARBANO, P. P.; TOPOLESKI, L. D. Postfertilization hybrid seed failure in *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon peruvianum* ovules. **American Society for Horticultural Science Journal**, Alexandria, v. 109, n. 1, p. 95-100, 1984.
- BOUKEMA, I. W.; DEN NIJS, A. P. M. *Lycopersicon peruvianum*, a valuable source of genetic variation for tomato breeders, but difficult to exploit. In: EUCARPIA MEETING ON TOMATO WORKING GROUP, 1984, Wageningen. **Proceedings...** Wageningen: European Association for Research on Plant Breeding, 1984. p. 107-112.
- CHEN, L.; ADACHI, T. Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via 'embryo rescue' and *in vitro* propagation. **Plant Breeding**, Berlin, v. 115, p. 251-256, 1996.
- CHEN, L.; ADACHI, T. Embryo abortion and efficient rescue in interspecific hybrids, *Lycopersicon esculentum* and the 'peruvianum-complex'. **Japanese Journal of Breeding**, Tokyo, v. 42, p. 65-77, 1992.
- CHEN, L.; IMANISHI, S. Cross-compatibility between the cultivated tomato *Lycopersicon esculentum* and wild species *L. peruvianum*, *L. chilense* assessed by ovule culture *in vitro*. **Japanese Journal of Breeding**, Tokyo, v. 41, p. 223-230, 1991.
- DOGANLAR, S.; FRARY, A.; TANKSLEY, S. D. Production of interspecific F₁ hybrids, BC₁, BC₂ and BC₃ populations between *Lycopersicon esculentum* and two accessions of *Lycopersicon peruvianum* carrying new root-knot nematode resistance gene. **Euphytica**, Dordrecht, v. 95, p. 203-205, 1997.
- DUVAL, C. M.; CALDAS, L. S.; CUPERTINO, F. P. Obtenção por cultura de embriões de híbridos entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum* resistentes a Tospovirus. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 1, p. 14-17, 1993.
- KALLOO, G. Interspecific and intergeneric hybridization in tomato. In: KALLOO, G. **Genetic improvement of tomato**. Berlin: Springer, 1991. p. 73-82.
- LAI, A.; CHIARETTI, D.; MINI, P.; BITTI, M. E.; CRINO, P. Parameters influencing embryo rescue in interspecific *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon peruvianum*. In: EUCARPIA MEETING ON TOMATO GENETICS AND BREEDING, 11., 1990, Malaga. **Proceeding...** Malaga: European Association for Research on Plant Breeding, 1990. p. 173-177.
- LESLEY, M. M. A cytological basis for sterility in tomato hybrids. **Journal of Heredity**, Washington, v. 41, p. 26-28, 1950.
- LOURENÇÃO, A. L.; NAGAI, H.; ZULLO, M. A. T. Fontes de resistência a *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick, 1917) em tomateiro. **Bragantia**, Campinas, v. 43, p. 569-577, 1984.
- MAHESWARAN, G.; PERRYMAN, T.; WILLIAMS, E. G. Use of an interspecific hybrid in identifying a new allelic specificity generated at the self-incompatibility locus after inbreeding in *Lycopersicon peruvianum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 73, p. 236-245, 1986.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 437-497, 1962.
- NEAL, C. A.; TOPOLESKI, L. D. Effects of the basal medium on the growth of immature tomato embryos *in vitro*. **American Society for Horticultural Science Journal**, Alexandria, v. 108, p. 434-438, 1983.
- POYSA, V. The development of bridge lines for interspecific gene transfer between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 79, p. 187-192, 1990.
- RICK, C. M. Crossability between *L. esculentum* and a new race of *L. peruvianum*. **Tomato Genetics Cooperative Report**, Ithaca, v. 33, p. 13, 1983.
- RICK, C. M.; BUTLER, L. Cytogenetics of the tomato. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 8, p. 267-382, 1956.
- SEGEREN, M. I.; SONDAHL, M. R.; SIQUEIRA, W. J.; MEDINA FILHO, H. P.; NAGAI, H.; LOURENÇÃO, A. L. Tomato breeding. 1. Embryo rescue of interspecific hybrids between *Lycopersicon esculentum* Mill. and *L. peruvianum* (L.) Mill. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 16, p. 367-380, 1993.
- SIQUEIRA, W. J.; FONSECA, M. I. S.; SONDAHL, M. R. Regeneração de plantas híbridas entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum* a partir de calos com dois anos de cultura *in vitro*. **Bragantia**, Campinas, v. 47, p. 1-8, 1988.
- SMITH, P. Embryo culture of tomato species hybrid. **American Society for Horticultural Science Proceedings**, Alexandria, v. 44, p. 413-416, 1944.
- TIGCHELAAR, E. C. Tomato breeding. In: BASSET, M. J. (Ed). **Breeding vegetable crops**. Westport: AVI, 1986. p. 135-171.
- YOUNG, N. D.; TANKSLEY, S. D. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the Tm-2 locus of tomato during backcross breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 77, p. 353-359, 1989.