

MANUAL DO MODELO VEGETAL MICRO-TOM

CAPÍTULO 6: PROTOCOLOS GERAIS

Clarissa dos Santos Goldenberg, Fernando Angelo Piotto, LÍlian E. Pino-Nunes, Marcelo Lattarulo Campos, Rogerio Falleiros Carvalho, Simone Pacheco Lombardi & Lázaro E. P. Peres

Este capítulo faz um apanhado de diversas metodologias aplicadas ao modelo vegetal Micro-Tom.

ÍNDICE

Protocolo	Pg.
Protocolo padrão para germinação ex vitro -----	02
Preparo da solução de GA3-----	03
Preparo da solução de BR-----	03
Determinação de antocianinas em hipocótilos de tomateiro-----	04
Determinação de teores de clorofilas e carotenóides-----	05
Teste de sensibilidade de hipocótilos a auxina-----	06
Quantificação de zingiberenos em folíolos de tomateiro-----	08
Quantificação de acilacúcares em folíolos de tomateiro-----	09
Protocolo de utilização do programa QUANTI-----	11

Protocolo padrão para testes de germinação.

- Desinfestar as sementes com hipoclorito de sódio (HClO) comercial (água sanitária, a qual costuma ter 2,7% de HClO) diluído a 5% e acrescido de duas gotas de detergente por cerca de 10 minutos. Para quebrar dormência de *cheesmanii* é necessário utilizar 50% de hipoclorito de sódio comercial durante 30 min.
- Escoar em peneira lavando em água da torneira para a retirada de resíduos e detergente. Em seguida lavar abundantemente com água destilada.
- Preparar o Gerbox preto com uma folha de papel filtro autoclavado umedecido com água destilada (ou com solução apropriada em caso de mutantes deficientes).
- Espalhar as sementes de forma aleatória deixando espaço suficiente para o seu desenvolvimento.
- As sementes devem permanecer cerca de três a quatro dias no escuro. As sementes germinadas devem ser transferidas para substrato com cúpula protetora na casa de vegetação.

Preparo da Solução de GA3

- Diluir 3,46 g de ProGib 10 % em 1L de água destilada. Esta solução se encontrará na concentração 1mM.
- Após esta etapa fazer as diluições a partir desta solução base. Por exemplo: para a concentração 100 μ M – Colocar 50 mL da solução base e completar até 500 mL com água destilada + 100 μ L de Silwet L7 Ag.

Preparo da Solução de BR

- Solução estoque original de análogo de castaterona (PM = 446,63) = 1000 ppm (2,24 mM)
- Estoque de uso (10 μ M): pegar 4,47 mL do estoque original (2,24 mM) e completar para 1000 mL com água destilada
- Solução de uso (1 μ M): Colocar 50 mL do estoque de uso (10 μ M) e completar até 500 mL com água destilada + 100 μ L de Silwet L7 Ag.

DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS EM HIPOCÓTILO DE TOMATEIRO

- Segmentar cinco hipocótilos (4 repetições) e colocar em tubos (eppendorf – 2ml).
- Cobrir com 0,48ml acidificado (1% de HCl, v/v).
- Deixar em agitação por 48h no escuro.
- Retirar os segmentos do hipocótilo com uma pinça.
- Adicionar 0,36ml de água mais 0,96ml de clorofórmio.
- Centrifugar por 15 min. (4800 rpm a 4°C).
- Retirar o sobrenadante e avaliar a absorbância em espectrofotômetro a 535 nm.
- Calcular a absorbância dividindo-a pelo número de hipocótilos (Abs/5hipocótilos).

DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE CLOROFILAS E CAROTENÓIDES EM FOLHAS DE TOMATEIRO

(Última atualização 25 out 2010)

- Pesar 150 mg de folhas fragmentadas em frascos eppendorf e acrescentar 1,5 mL de acetona pura. Cuidar para que todos os fragmentos estejam cobertos de acetona, mas não compactar. Fechar o eppendorf com parafilm e envolver com papel alumínio. A coleta dos tecidos vegetais deve ser realizada em triplicatas.
- Deixar os tubos sob agitação durante 24 horas sob baixa temperatura (sempre no escuro).
- Retirar a solução cetônica do tubo (o tecido foliar deverá ficar totalmente esbranquiçado)
- Ler a absorbância da solução cetônica contendo os pigmentos nos seguintes comprimentos de onda (zerar o espectrofotômetro com acetona na cubeta):
- Clorofila a (Ca) – 661,6 nm
- Clorofila b (Cb) – 644,8 nm
- Carotenóides (caroteno [C] + xantofilas [X]) – 470nm
- O cálculo da concentração da clorofila a (Ca), da clorofila b (Cb) e das clorofilas a e b (Ca+b) e carotenóides (X+C) será realizado de acordo com as equações abaixo (segundo Lichtenthaler, 1987) e expressas em µg por mL de extrato:
- $Ca = 11,24 [A661,6] - 2,04 [A644,8]$
- $Cb = 20,13 [A644,8] - 4,19 [A661,6]$
- $Ca+b = 7,05 [A661,6] + 18,09 [A644,8]$
- $C+X = (1000 [A470] - 1,90Ca - 63,14Cb)/214.$

O conteúdo de clorofilas e carotenóides dos tecidos deverá ser convertido em µg do pigmento por grama de massa fresca (MF). Ex: considerando o volume total colocado nas 0,150 g iniciais como sendo 1,5 mL, cada mL de extrato corresponde a 0,1 g (0,150/1,5) de MF. Nesse caso o resultado final deverá ser µg/mL x 0,1 = µg/g MF.

Bibliografia

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148:350-382, 1987.

TESTE DE SENSIBILIDADE DE HIPOCÓTILOS A AUXINA

Preparo das soluções:

Solução Tampão de Kelly & Bradford 10X (1986)

Pesar:

- 0,3402 g de KH_2PO_4 (2,5mM)
- 0,1863 g de KCl (2,5 mM)
- 0,2361 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (1,0 mM)
- Diluir cada componente separadamente em um béquer com água destilada, juntar e completar para 100 mL e ajustar o pH em 5,2. Assim teremos uma solução 10X. Quando for usar diluir dez vezes a solução e adicionar 3% de sacarose.

Solução de auxina (AIA = 100mM)

PM = 175,2 _____ 1000 mL _____ 1 M

1,752 g _____ 10 mL _____ 1 M

0,0175 g _____ 1,0 mL _____ 100 mM

- Pesar 0,0175 g de AIA, colocar num ependorff, colocar 100 μL de KOH (1M) para dissolver. Agitar em vortex. Se não diluir, colocar mais 100 μL de KOH . Agitar novamente. Completar o volume para 1,0 mL com água destilada autoclavada.

Preparo do experimento

- Germinar sementes em bandejas com substrato
- Aos 10 dias (15 dias para clima frio) coleta das plântulas

Preparação das Placas:

- Preparar placas com 20 mL da Solução Tampão contendo as seguintes concentrações de AIA: 0; 0,1; 1,0; 10 e 100 μM
- Fazer pelo menos 5 repetições (hipocótilos) por tratamento.
- Seccionar o hipocótilo com o gabarito (12 mm)
- Deixar os hipocótilos na solução por 20-24 horas

Análise do Experimento:

- Colocar um tratamento de cada vez no scanner

- Scanear os hipocótilos na extensão JPEG, resolução de 600 DPI
- Abrir o arquivo com o Programa “Microsoft Photo Editor”

Para imprimir siga as seguintes instruções:

- Em propriedades, selecione a opção “Paisagem” como orientação da folha;
- A posição da imagem deve estar “centralizada” na folha para que esta possa ser aumentada várias vezes;

• É importante que a porcentagem de aumento seja igual para todos os diferentes genótipos para que não ocorram variações na análise, para isto é melhor que este aumento seja baseado no genótipo com maior número de repetições;

• Imprimir com qualidade normal ou alta para facilitar a visualização dos hipocótilos;

- Medir com régua a altura de cada hipocótilo;
- Transformar os valores em porcentagem;
- O controle (0 μ M) deve ser considerado como 100% e os demais tratamentos deverão ser convertidos em porcentagem tendo ele como base;

• Cada genótipo deve ter o seu controle como 100% para que seja avaliada a variação de tamanho;

Montar um gráfico de linha no Excel para analisar os dados em ordem crescente de concentrações.

QUANTIFICAÇÃO DE ZINGIBERENOS EM FOLÍOLOS DE TOMATEIRO

Protocolo elaborado por Freitas 1999.

- Retirar seis discos foliares de 1cm de diâmetro;
- Adicionar 4mL de hexano;
- Agitar em vortex por 30 segundos;
- Retirar discos foliares;
- Ler absorbância a 270nm. Usar hexano como branco. Utilizar cubetas de quartzo (marcadas com a letra Q), uma vez que a luz transmitida está na faixa do UV (a qual é parcialmente refletida pelas cubetas de vidro).
- Apenas para conhecimento, o valor obtido neste teste é altamente correlacionado com os valores obtidos utilizando HPLC.

-Freitas, J.A.; Resistência genética de tomateiro *Lycopersicon* spp. a mosca branca *Bemisia* spp. mediada por zingibereno contido em tricomas glandulares. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Lavras, 193p., 1999.

QUANTIFICAÇÃO DE ACILAÇÚCARES EM FOLÍOLOS DE TOMATEIRO

Preparação dos folíolos para quantificação de açúcares, segundo Resende (2003).

- Retirar 12 discos de 1cm de diâmetro;
- Adicionar 2mL de diclorometano;
- Agitar em vórtex;
- Retirar folíolos e evaporar solvente em banho Maria a 60oC;
- Adicionar 1mL de NaOH 0,1M solvido em metanol, evaporado em seguida em banho Maria a 60oC. (O NaOH deve ser solvido em metanol pois os reagentes utilizados no teste são apolares).
- Mantendo o resíduo em alta temperatura (100oC), adicionar 1mL de metanol três vezes a cada dois minutos;
- Dissolver em 0,8mL de água destilada;
- Adicionar 0,2mL de HCl 0,04M, aquecendo até ebulição;
- Resfriar e fazer quantificação de açúcares redutores com reagente de DNS.

Preparação do reagente quantificador de açúcares redutores (DNS) segundo Schwan e Rose (1994).

- Dissolver 10g de 3,5DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) em 500mL de água destilada a 85oC;
- Aguardar para que solução atinja temperatura ambiente;
- Adicionar 200mL de solução de NaOH 2M;
- Adicionar 300g de tartarato duplo de sódio e potássio (também conhecido como sal de Rochelle);
- Completar com água destilada para 1L;
- Guardar em frasco escuro;

Quantificação de açúcares redutores.

- Adicionar 1,2mL da solução obtida dos folíolos com 1,2mL do reagente de DNS;
- Ferver em banho Maria por cinco minutos a 100oC;

- Mergulhar tubos em água fria e esperar resfriar;
- Ler absorbância a 540nm;
- A curva padrão para o reagente de DNS deve ser feita com glicose nas concentrações: 0,01; 0,25; 0,5; 1 e 2M.

-Resende, J.T.V.; Resistência a artrópodos-pragas mediada por açúcares em tomateiros obtidos do cruzamento interespecífico de *Lycopersicon esculentum* Mill. "Tom -584" x *Lycopersicon pennellii* "LA-716". *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Lavras, 91p., 2003. Disponível em [HTTP://www.posgrad.ufla.br/teses/pesquisa](http://www.posgrad.ufla.br/teses/pesquisa)

-Schwan, R.; Rose, A.H.; Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Applied Bacteriology*. 76: 62-67, 1994.

PROTOCOLO DE UTILIZAÇÃO DO PROGRAMA QUANTI

Obtenção imagens:

- Scanear folhas individualmente, com os folíolos isolados.
- Atenção: scanear com resolução de 300 dpi e tipo de saída preto e branco com extensão .tiff (observar se a imagem sairá com apenas duas cores)

Programa Quanti:

- Abrir Quanti 101;
- Abrir arquivo com imagem;
- Confirmar calibração (300 dpi) em PROCESSAR;
- Clicar em IMAGEM marcar Negativo;
- Clicar em PROCESSAR e marcar Resultados (Área – cm²);
- Se não sair valores de perímetro clicar em PROCESSAR e marcar Threshold
- Outra opção para obter área e perímetro de apenas uma parte da figura (selecionada);
- Marcar a figura que deseja obter dados;
- Clicar na barra de ferramenta em JANELAS e marcar Área de seleção.