

Proposta metodológica para quantificação de acilaçúcares em folíolos de tomateiro

Gabriel M Maciel¹; Ernani C Silva²

¹UFU-ICIAG, LAGEN, R. Goiás 2000, Vila Nova, 38500-000 Monte Carmelo-MG; gabriel.maciel@iciag.ufu.br; ²UFSJ, C. Postal 56, 35701-970 Sete Lagoas-MG; clarete@ufsj.edu.br

RESUMO

Um dos grandes problemas enfrentados na tomaticultura é o ataque constante de pragas. A partir do uso de espécies selvagens de tomateiro, tornou-se possível a obtenção de genótipos com resistência a pragas. Tal resistência tem sido associada à presença de aleloquímicos denominados acilaçúcares, que são ésteres de ácidos graxos. Para a quantificação dos teores de acilaçúcares utiliza-se o método colorimétrico permitindo assim a seleção indireta de genótipos com alto teor deste aleloquímico. Este método vem sendo utilizado predominantemente nos programas de melhoramento genético do tomateiro visando resistência a pragas. Apesar da grande utilização do método colorimétrico na seleção indireta de genótipos de tomateiro com resistência a pragas, algumas etapas deste método demandam bastante tempo dos laboratoristas que a executam. Devido à importância do método colorimétrico e na tentativa de melhorar a eficiência e padronização de leitura, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar novos métodos para quantificação dos teores de acilaçúcares presentes nos folíolos de tomateiro. Dentre os métodos propostos, quando se utilizou o espectrofotômetro Multiskan FC com filtro de 620 nm e doses de 100 µL por poço (96 poços), foram obtidos resultados similares aos do método padrão. Esta proposta metodológica permitiu maior eficiência nas análises, repetibilidade, maior padronização dos resultados, diminuindo a chance de erros durante a execução, além da análise simultânea de maior número de amostras. Conclui-se que o referido método é viável e eficiente, podendo ser utilizado na quantificação de acilaçúcares em folíolos de tomateiro visando seleção indireta de genótipos resistentes a pragas.

Palavras-chave: *Solanum pennellii*, método colorimétrico, pragas, seleção indireta.

ABSTRACT

Methodological proposal to quantify acylsugars in tomato leaflets

One of the major problems in tomato production is the frequent attack of pests. The use of wild tomato species made it possible to obtain pest resistant genotypes. Such resistance has been linked to the presence of allelochemicals called acylsugars, which are esters of fatty acids. The colorimetric method is normally used to quantify the levels of acylsugars, allowing an indirect selection of genotypes with high content of allelochemicals. This methodology has been used predominantly in the breeding programs of tomato to obtain pest-resistant genotypes. Despite the wide use of the colorimetric method for indirect selection of tomato genotypes with pest resistance, some steps of this methodology take great demand of time. Knowing the importance of the colorimetric method and, attempting to improve the efficiency and standardization of reading, we tried to evaluate new methodologies for quantifying the levels of acylsugars present in tomato leaflets. Among the proposed methods, when using the spectrophotometer Multiskan FC with filter of 620 nm and doses of 100 µL per well (96 wells), we obtained results which were similar to the standard methodology. This methodological approach allowed for greater efficiency in the analysis, repeatability, greater standardization of results reducing the chance of errors during execution, besides the simultaneous analysis of many samples. Concluding, this method is feasible and effective and can be used to quantify acylsugars in tomato leaflets with the purpose of indirect selection of resistant genotypes to pests.

Keywords: *Solanum pennellii*, colorimetric method, pests, indirect selection.

(Recebido para publicação em 26 de agosto de 2013; aceito em 4 de abril de 2014)
(Received on August 26, 2013; accepted on April 4, 2014)

Embora seja uma das mais importantes plantas cultivadas, o tomateiro é acometido de graves problemas fitossanitários (Suinaga *et al.*, 2003). Os problemas fitossanitários foram agravados pela expansão da área de cultivo, o que favoreceu o surgimento de pragas e doenças de difícil controle, que afetam significativamente a sua produção (Filgueira, 2000).

A partir de espécies selvagens de tomateiro, tornou-se possível a obtenção de genótipos com resistência a um grande número de pragas. Tal resistência tem sido associada à presença de aleloquímicos denominados de acilaçúcares (AA),

que são ésteres de ácidos graxos. Estes aleloquímicos podem atuar impedindo a ovoposição, a alimentação ou, ainda, exercendo efeito deletério no desenvolvimento de determinadas fases de um artrópode-praga (Resende *et al.*, 2002; Resende *et al.*, 2006; Resende *et al.*, 2008; Maciel *et al.*, 2011). Gonçalves *et al.* (2007) indicaram que altos teores de AA se devem à ação de um alelo recessivo, com dominância incompleta no sentido de baixos teores.

Atualmente, a quantificação dos teores de AA vem sendo realizada através da utilização do método colorimétrico, conforme descrito por

Resende *et al.* (2002). Utilizando-se desse método, a seleção indireta de genótipos com resistência a pragas em tomateiro mediada por AA derivados de *S. pennellii* foi extensivamente utilizada (Hawthorne *et al.*, 1992; Rodriguez *et al.*, 1993; Juvik *et al.*, 1994; Liedl *et al.*, 1995; Resende *et al.*, 2002; Gonçalves *et al.*, 2006; Resende *et al.*, 2006; Saedi *et al.*, 2007; Maciel *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Gonçalves Neto *et al.*, 2010; Maciel *et al.*, 2011).

Maluf *et al.* (2010) e Gonçalves Neto *et al.* (2010) demonstraram que linhagens avançadas de tomateiro com alto teor de AA apresentaram altos níveis de

resistência à *Tuta absoluta*. Em virtude da dominância incompleta, foi possível a obtenção de híbridos resistentes a artrópodos-praga, mesmo entre linhagens com alto teor e linhagens com baixo teor de AA (Maluf *et al.*, 2010; Maciel *et al.*, 2011). Avaliando diferentes combinações híbridas entre linhagens com altos teores e linhagens com baixos teores de AA, foi comprovado amplo espectro de resistência à mosca-branca (*Bemisia tabaci* biótipo B), à traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*) e ao ácaro-rajado (*Tetranychus urticae*) (Maluf *et al.*, 2010). A eficiência do método colorimétrico (Resende *et al.*, 2002) também foi comprovada quanto à seleção indireta de genótipos resistentes a *B. tabaci* biótipo B, à traça-do-tomateiro e ao ácaro rajado (Maluf *et al.*, 2010).

Apesar da grande utilização do método colorimétrico na seleção indireta de genótipos de tomateiro com resistência a pragas, algumas etapas do método proposto por Resende *et al.* (2002) apresentam considerável demanda de tempo de execução pelos laboratoristas. Devido à importância do método colorimétrico na seleção indireta e na tentativa de melhorar a eficiência e padronização de leitura, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar novos métodos para quantificação dos teores de AA presentes nos folíolos de tomateiro, buscando maior eficiência de execução e repetibilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado em casa de vegetação, de 15 de março a 28 de julho de 2012, na HortiAgro Sementes em Ijaci-MG (21°14'16"S; 45°08'00"O; 918 m de altitude).

A quantificação dos teores de acilacúcares (AA) das amostras foi realizada na UFLA, utilizando o método padrão de Resende *et al.* (2002) que, após a extração dos AA, realiza leituras pelo espectrofotômetro UV-160 1 PC Visible Spectrophotometer da marca Shimadzu, o qual possui a capacidade de realizar uma amostra por leitura, a partir de uma cubeta com aproximadamente 2 mL de solução.

O novo método proposto foi execu-

tado no Centro de Indexação de Vírus da UFLA, utilizando a mesma solução obtida pelo método de Resende *et al.* (2002) após extração dos AA, sendo, porém, a leitura realizada pelo espectrofotômetro Thermo Scientific (MultiskanFC) e o software Skan IT 2.5.1, o qual realiza leituras em placas de poliestireno de fundo chato (marca COSTAR 3590), com capacidade de leitura imediata de 96 poços (amostras).

Os genótipos foram semeados em 15 de março de 2012, em bandejas de poliestireno expandido com substrato comercial à base de fibra de coco. Decorridos 30 dias após a semeadura, as mudas de cada genótipo foram transplantadas para vasos de 5 litros contendo o mesmo substrato comercial utilizado na formação das mudas e mantidos em casa de vegetação. Os genótipos avaliados no experimento foram: acesso selvagem LA-716 (*S. pennellii*, com alto teor de acilacúcares), TOM-684 (linhagem pré-comercial com baixo teor de acilacúcares), TOM-687 (linhagem pré-comercial com alto teor de acilacúcares obtida a partir do cruzamento interespecífico entre *S. pennellii* x *S. lycopersicum*), TOM-689 (linhagem pré-comercial com alto teor de acilacúcares obtida a partir do cruzamento interespecífico entre *S. pennellii* x *S. lycopersicum*) e híbrido comercial 'Bravo' (testemunha comercial com baixo teor de acilacúcares) (Maluf *et al.*, 2010; Maciel *et al.*, 2011).

Decorridos 38 dias do transplante, no início da fase de florescimento, realizou-se a coleta dos discos nos folíolos para quantificação dos teores de AA, seguindo método padrão proposto por Resende *et al.* (2002).

Foram retirados seis discos foliares por genótipo, em oito repetições, com auxílio de um vazador (cano metálico de 1 cm de diâmetro), os quais foram acondicionados em tubos de ensaio previamente identificados e levados imediatamente para o Laboratório de Química Orgânica da UFLA. Em cada tubo foi adicionado 1 mL de diclorometano e agitados por 30 segundos em aparelho vórtex, visando promover a extração do aleloquímico. Posteriormente foram retirados os folíolos e evaporado o solvente e, em seguida, adicionou-se 0,5 mL de NaOH 0,1 N, dissolvido em

metanol, evaporando-o em seguida. O resíduo foi mantido em alta temperatura (100°C), no qual foi adicionado 4 g L⁻¹ de metanol por três vezes, em intervalos de 2 minutos. Após a evaporação total do metanol, o resíduo foi dissolvido em 0,4 mL de água. Para a inversão da sacarose, foi adicionado 0,1 mL de HCl 0,04 N, aquecendo-se por 5 minutos até a ebulição. Decorrido esse tempo, a solução obtida foi resfriada e, em seguida, adicionou-se 0,5 mL do reagente A + reagente B (proporção de 25:1) (Nelson, 1960) que foi aquecido em ebulição por 10 minutos. Em seguida, os tubos contendo as amostras foram resfriados em água corrente, adicionando-se 0,5 mL de arseniomolibdato e agitando por 15 segundos, em aparelho vórtex. Logo em seguida, as amostras foram submetidas à leitura espectrofotométrica, para absorvância na faixa de 540 nm. Após extração foram feitas leituras pelo método descrito por Resende *et al.* (2002) utilizando uma cubeta com aproximadamente 2 mL de solução.

Após extração de AA das amostras originais, foram testadas nove propostas metodológicas de leitura (Tabela 1) utilizando-se o espectrofotômetro Thermo Scientific (MultiskanFC) e o software Skan IT 2.5.1 e comparadas com a leitura proposta por Resende *et al.* (2002), na qual se utiliza o espectrofotômetro UV-160 1 PC Visible Spectrophotometer da marca Shimadzu. Para tanto, foram utilizadas as mesmas soluções obtidas, após extração dos AA, referentes às oito repetições de cada genótipo utilizadas para leitura pelo método padrão de Resende *et al.* (2002). Portanto, essas soluções foram pipetadas em placa de poliestireno de fundo chato (marca COSTAR 3590), com capacidade de leitura imediata de 96 poços (amostras), utilizando-se uma pipeta regulada nas doses de 10, 50 e 100 µL. Respectivas doses foram utilizadas para todos os genótipos em estudo (LA-716, TOM-684, TOM-687, TOM-689 e 'Bravo' F1), sendo previamente conhecidos os teores de AA de cada genótipo quantificados pela metodologia de Resende *et al.* (2002). Em seguida foram feitas leituras com filtros de 405, 450, 620 nm referentes a cada dose pipetada na placa (10, 50 e 100 µL) totalizando nove

propostas metodológicas. Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, sendo as médias comparadas entre si utilizando o teste de Tukey, a 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000). Avaliou-se ainda a variância (S^2) ocorrida em cada genótipo em relação às oito repetições tanto no teste colorimétrico (Resende *et al.*, 2002) quanto nas nove propostas metodológicas, com o intuito de verificar qual método fornece leituras com maior repetibilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método colorimétrico proposto por Resende *et al.* (2002) foi eficiente na quantificação dos teores de acilaçúcares (AA) (Tabela 1). Estes resultados confirmaram a eficiência do referido método de acordo com estudos realizados por diversos autores que a utilizaram na quantificação de AA em folíolos de tomateiro (Gonçalves *et al.*, 2006; Resende *et al.*, 2006; Saeidi *et al.*, 2007; Maciel *et al.*, 2009; Maluf *et al.*, 2010; Gonçalves Neto *et al.*, 2010; Maciel *et al.*, 2011). Embora o método colorimétrico (Resende *et al.*, 2002) seja amplamente utilizado, uma das maiores dificuldades encontradas é a grande

demanda de tempo na execução pelos laboratoristas.

Entre as nove novas propostas metodológicas analisadas, apenas uma (Filtro 620 nm e dose 100 μ L) apresentou leituras similares ao método colorimétrico padrão descrito por Resende *et al.* (2002), não diferindo estatisticamente (Tabela 1). As variações ocorridas entre o método padrão de Resende *et al.* (2002) e a melhor metodologia (Filtro 620 nm e Dose 100 μ L) entre os mesmos genótipos foram de apenas: 1,84; 0,85; 0,13; 0,04; 1,05 nanomols.cm² de área foliar¹ nos genótipos LA-716, TOM-684, TOM-687, TOM-689 e Bravo F1, respectivamente. Estas diferenças, nas concentrações de AA obtidas nos dois métodos não foram consideradas significativas. Os outros métodos de leitura não permitiram resultados próximos do método padrão de Resende *et al.* (2002), não sendo recomendados para identificar genótipos resistentes a pragas via seleção indireta.

Outra dificuldade encontrada pelo método colorimétrico (Resende *et al.*, 2002) está relacionada com a variação da solução final obtida para leitura. A quantidade de solução (dose) utilizada na cubeta do espectrofotômetro UV-160 IPC Visible Spectrophotometer da marca Shimadzu pode influenciar a leitura

e consequentemente atribuir valores incorretos no teor de AA presente nos folíolos de tomateiro.

Durante as leituras realizadas no espectrofotômetro UV-160 IPC Visible Spectrophotometer da marca Shimadzu, além das leituras serem feitas individualmente, o que resulta em maior tempo de execução nas análises, outra etapa que contribui na interferência das leituras é a necessidade de limpar a cubeta, durante o intervalo entre a leitura de cada amostra, uma vez que resíduos de soluções anteriores podem interferir na leitura da próxima amostra analisada. Utilizando o espectrofotômetro MultiskanFC com filtro de 620 nm e dose de 100 μ L por poço, estas interferências foram eliminadas, uma vez que são realizadas 96 leituras imediatas, sob placas de poliestireno (marca COSTAR 3590) descartáveis. Além de eliminar a interferência na leitura, quando comparado com o método de Resende *et al.* (2002), ressalta-se ainda a maior eficiência na execução por não ser necessário limpar toda vez a cubeta no intervalo entre cada leitura. Por outro lado, observou-se também maior padronização do método em que se utilizou filtro de 620 nm e dose de 100 μ L por poço (Tabela 1). Os valores obtidos de variância (S^2) que ocorreram entre as oito amostras do mesmo genóti-

Tabela 1. Nove propostas metodológicas para quantificação dos teores de acilaçúcares (nanomols) em folíolos de tomateiro comparadas com o método padrão (Resende *et al.*, 2002) e variância (S^2) ocorrida em cada método entre as amostras [nine methodological approaches to quantify the levels of acylsugar (nanomols) in tomato leaflets compared with the standard methodology (Resende *et al.*, 2002) and variance (S^2) occurred in each methodology between samples]. Lavras, UFLA, 2012.

Método	Genótipo									
	LA-716*	S ² **	TOM-684	S ²	TOM-687	S ²	TOM-689	S ²	Bravo F1	S ²
Filtro 405 nm (10 μ L)	25,54 c	9,77	7,78 d	2,92	21,78 b	0,27	20,92 b	6,07	7,30 d	2,31
Filtro 405 nm (50 μ L)	22,96 c	2,11	15,69 b	0,69	17,25 c	2,14	18,12 bc	2,13	17,69 b	0,49
Filtro 405 nm (100 μ L)	57,31 a	27,70	36,43 a	14,27	46,68 a	32,37	46,40 a	3,67	41,38 a	1,01
Filtro 450 nm (10 μ L)	11,30 d	5,36	3,84 efg	1,24	8,07 d	0,07	7,92 e	3,19	3,54 f	1,08
Filtro 450 nm (50 μ L)	8,19 d	0,72	5,39 def	0,05	6,84 d	0,32	6,66 e	0,21	5,93 ef	4,33
Filtro 450 nm (100 μ L)	22,07 c	5,03	11,68 c	12,50	16,74 c	1,47	14,38 d	3,88	11,55 c	1,40
Filtro 620 nm (10 μ L)	10,26 d	0,51	2,69 g	0,30	9,83 d	0,21	6,62 e	2,07	2,44 f	0,23
Filtro 620 nm (50 μ L)	9,61 d	0,48	3,55 fg	0,01	8,11 d	0,37	6,73 e	0,28	3,59 f	0,05
Filtro 620 nm (100 μ L)	38,43 b	5,57	6,43 de	1,28	22,25 b	0,88	15,24 cd	6,70	6,52 ef	0,55
Padrão (Resende <i>et al.</i> , 2002)	36,59 b	10,70	7,28 d	1,80	22,38 b	2,23	15,20 cd	5,70	5,47 e	1,80
CV (%)	10,76		16,31		11,16		11,63		8,98	

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si nas colunas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (means followed by the same letter do not differ in columns by Tukey test at 5% probability) **S²= variância observada nas oito repetições em cada tratamento (variance observed in eight replicates for each treatment).

po foram, em praticamente todos os genótipos avaliados e em termo absoluto, menores que o método padrão proposto por Resende *et al.* (2002).

Os menores valores de variância obtidos com o uso do espectrofotômetro MultiskanFC com filtro de 620 nm e doses de 100 µL por poço (96 poços) proporcionaram maior eficiência nas análises e maior padronização dos resultados. Conclui-se que o referido método é viável e eficiente, podendo ser usado na quantificação de AA em folíolos de tomateiro visando seleção indireta de genótipos resistentes a pragas.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, ao CNPq, à CAPES pelo auxílio financeiro e concessão de bolsas; à UFLA, ao Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais e à empresa HortiAgro Sementes Ltda e ao Departamento de Química da UFLA.

REFERÊNCIAS

- FERREIRA DF. 2000. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45. Anais... São Carlos: UFSCAR. p. 255-258.
- FILGUEIRA FAR. 2000. *Novo manual de olericultura*. Viçosa: UFV. 402 p.
- GONÇALVES NETO AC; SILVA VF; MALUF WR; MACIEL GM; NIZIO DAC; GOMES LAA; AZEVEDO SM. 2010. Resistência à traça-do-tomateiro em plantas com altos teores de acilaçúcares nas folhas. *Horticultura Brasileira* 28: 203-208.
- GONÇALVES LD; MALUF WR; CARDOSO MG; GOMES LAA; NASCIMENTO IR. 2007. Herança de acilaçúcares em genótipos de tomateiro provenientes de cruzamento interespecífico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 699-705.
- GONÇALVES LD; MALUF WR; CARDOSO MG; RESENDE JTV; CASTRO EM; SANTOS NM; NASCIMENTO IR; FARIA MV. 2006. Relação entre zingibereno, tricomas foliares e repelência de tomateiros a *Tetranychus evansi*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41: 267-273.
- HAWTHORNE DJ; SHAPIRO JA; TINGEY WM; MUTSCHLER MA. 1992. Trichomeborne and artificially applied acylsugars of wild tomato deter feeding and oviposition of the leaf miner *Liriomyza trifolii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 65: 65-73.
- JUVIK JA; SHAPIRO JA; YOUNG TE; MUTSCHLER MA. 1994. Acylglucose from wild tomato alters behavior and reduce growth and survival of *Helicoverpa zea* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* 87: 482-492.
- LIEDL BE; LAWSON DM; WHITE KK; SHAPIRO JA; COHEN DE; CARSON WG; TRUMBLE JT; MUTSCHLER MA. 1995. Acylsugars of wild tomato *Lycopersicon pennellii* alters settling and reduces oviposition of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology* 88: 742-748.
- MACIEL GM; MALUF WR; SILVA VF; GONÇALVES NETO AC; GOMES LAA. 2011. Híbridos pré-comerciais resistentes a *Tuta absoluta* obtidos de linhagem de tomateiro rica em acilaçúcares. *Horticultura Brasileira* 29: 151-156.
- MACIEL GM; MALUF WR; SILVA VF; GONÇALVES NETO AC; HAYATA L; CARVALHORC; MORETTO P; LICURSI V; MORETTO DP. 2009. Heterose e capacidade combinatória em linhagens de tomateiro na obtenção de híbridos com teores intermediários de acilaçúcares. *Horticultura Brasileira* 27: 1161-1167.
- MALUF WR; MACIEL GM; GOMES LAA; CARDOSO MG; GONÇALVES LD; SILVA EC; KNAPP M. 2010. Broad-spectrum arthropod resistance in hybrids between high and low-acylsugar tomato lines. *Crop Science* 50: 439-450.
- NELSON NA. 1960. Photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biologic Chemistry* 153:375-380.
- RESENDE JTV; MALUF WR; CARDOSO MG; FARIA MV; GONÇALVES LD; NASCIMENTO IR. 2008. Resistance of tomato genotypes with high level of acylsugars to *Tetranychus evansi*. *Scientia Agricola* 65: 31-35.
- RESENDE JTV; MALUF WR; FARIA MV; PFANN AZ; NASCIMENTO IR. 2006. Acylsugars in tomato leaflets confer resistance to the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *Scientia Agricola* 63: 20-25.
- RESENDE JTV; CARDOSO MG; MALUF WR; SANTOS CD; GONÇALVES LD; RESENDE LV; NAVES FO. 2002. Método colorimétrico para quantificação de acilaçúcar em genótipos de tomateiro. *Ciência e Agrotecnologia* 26: 1204-1208.
- RODRIGUEZAE; TINGEY WM; MUTSCHLER MA. 1993. Acylsugars of *Lycopersicon pennellii* deter settling and feeding of the green peach aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 86: 34-49.
- SAEIDI Z; MALLIK B; KULKARNI RS. 2007. Inheritance of glandular trichomes and two-spotted spider mite resistance in cross *Lycopersicon esculentum* 'Nandi' and *L. pennellii* 'LA2963'. *Euphytica* 154: 231-238.
- SILVA VF; MALUF WR; CARDOSO MG; GONÇALVES NETO AC; MACIEL GM; NIZIO DAC; SILVA VAS. 2009. Resistência mediada por aleloquímicos de genótipos de tomateiro à mosca-branca e ao ácaro-rajado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44: 1262-1269.
- SUINAGA FA; CASALI VWD; SILVA DJH; PIKANÇO MC. 2003. Dissimilaridade genética de fontes de resistência de *Lycopersicon* spp. a *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Brasileira de Agrociência* 9: 371-376.