

ANÁLISE DO POTENCIAL DE TOLERÂNCIA À SECA EM PLANTAS DE DIFERENTES VARIEDADES DO PROGRAMA DE MELHORAMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR DO INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS (IAC)

LUIS T.M. FRIGEL¹; VICENTE E. DE ROSA JR²; LUCIANA R. PINTO³

Nº 0800019

RESUMO

Cada vez mais a busca por variedades tolerantes à seca vem chamando a atenção dos programas de melhoramento de diversas culturas, e a pesquisa vem se desenvolvendo em cana-de-açúcar, sobretudo, devido à expansão dessa cultura em regiões de cerrado do Brasil, em especial nos estados vizinhos a São Paulo, à Bahia, Tocantins, Maranhão e outros.

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo avaliar algumas características que compõem os mecanismos de tolerância à seca em diferentes variedades (cultivares) de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp). Foram testadas cultivares comerciais do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), da RIDESA (RB) e do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) num total de nove cultivares as quais após a indução do estresse hídrico, foram avaliadas características fisiológicas e genéticas.

Inicialmente tentou-se avaliar os teores de umidade do solo no ponto de murcha permanente (PMP) em cada cultivar. Entretanto, o PMP não resultou em uma avaliação robusta, visto que as plantas apresentaram como estratégia de sobrevivência ao estresse hídrico o enrolamento de folhas e a rebrota, não caracterizando, portanto, o murchamento característico das dicotiledôneas, dificultando a análise.

A estratégia adotada para o ensaio de caracterização da tolerância à seca foi então a avaliação do percentual de sobrevivência de cada cultivar a suspensão da irrigação.

A fim de se avaliar a variabilidade genética nas cultivares, e correlacionar os dados obtidos com os testes de sobrevivência, avaliamos o polimorfismo genético de isoenzimas peroxidases. O resultado dessa análise revelou variabilidade entre as cultivares.

Para entendermos os papéis funcionais desempenhados pelas enzimas peroxidases em cana, e identificar possíveis peroxidases envolvidas com o estresse hídrico, um banco de dados contendo os genes de cana-de-açúcar seqüenciados pelo projeto SUCEST (<http://sucest.lad.ic.unicamp.br/>) foi criado. Essa análise permitiu conhecermos as principais

1. Bolsista PIBIC/CNPq: Graduação em Biologia, Centro Univ. Barão de Mauá , Ribeirão Preto-SP, ✉ tadeufrigel@hotmail.com

2. Orientador: Pesquisador, Centro de Cana - Instituto Agrônomo de Campinas, Ribeirão Preto, SP

3. Colaborador: Pesquisadora, Centro de Cana - Instituto Agrônomo de Campinas, Ribeirão Preto, SP

peroxidases da cana e a análise da filogenia pode facilitar prover indicações sobre as prováveis funções celulares das peroxidases da cana-de-açúcar.

ABSTRACT

The search for drought-tolerant cultivars has been an important objective of many breeding programs in several cultures, and the research has focused in sugarcane because the new areas in the Brasil's Northeast and Cerrado states have water limitations, such as those states in the neighborhood of São Paulo, Bahia, Tocantins, Maranhão, among others.

To get information about the behavior of some important sugarcane cultivars (*Saccharum* spp) under water stress this work aimed to evaluate some features that integrate the drought tolerance mechanisms. Nine cultivars from Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) and RIDESA (RB) were tested and after drought stress treatments we evaluated physiological and genetic aspects.

The attempt for evaluation soil umidity at permanent wilting point (PMP) was showed to be difficult to be measured in sugarcane, because plants showed another survival strategies such as leaf rolling and regrowing, not characterizing the wilting and making impossible to observe the exact point of death. Thus, the essay was changed to analyze the survival percentual of plants after water privation. The results showed that the cultivar IAC93-2101 is correctly classified as exigent in soil and climate conditions to yield, i.e., it is characterized as reponsive to environmetal conditions. For another hand, the cultivars IACSP96-2094, IAC95-5000, RB86-7515, and RB72-454 showed higher tolerance to drought. This results corroborate with the fact of IACSP96-2094 is classified as rustical and RB cultivars are planted in all Brazil regions.

To characterize genetic variability in the studied cultivars and concatenate data with the survival tests, we studied the genetic polimorfism of peroxidases isozymes. Peroxidases are involved in drought tolerance because they are supposed to alliviate oxygen reactive species (ROS) and also they are involved in lignification, or reinforcement of the cell wall. The results of these analyzes has revealed polimorfism among the cultivars.

To understand the role of peroxisades and identify putative enzymes related to drought stress in sugarcane, a database containing nucleotide sequences obtained from SUCEST EST project (<http://sucest.lad.ic.unicamp.br/>) was constructed. These bank allowed us to know the main peroxidases of sugarcane, and the phylogentic analyses can be usefull to atribute the probable functions for the peroxidases in sugarcane.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) é uma cultura altamente eficiente na produção de biomassa, sendo cultivada para obtenção de sacarose, utilizada para a produção de açúcar

e álcool (etanol). O Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar e com produção estimada para 2008/2009 de 498,1 milhões de toneladas (ÚNICA - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo; <http://www.portalunica.com.br>).

Atualmente, como já ocorre em outras culturas, a expansão da canavicultura a regiões mais áridas demandará a busca por cultivares mais tolerantes ao déficit hídrico.

O déficit hídrico (ou seca) é um importante fator limitante de crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas cultivadas, levando a modificações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, diminuindo a produtividade.

Assim, este trabalho tem por objetivo: a) estudar alguns aspectos da resposta de algumas cultivares de cana-de-açúcar dos programas de melhoramento do IAC, da RIDESA e do CTC ao déficit hídrico; b) caracterizar o sistema de isoenzimas peroxidase nas cultivares analisadas; c) a identificação, categorização e filogenia dos genes que codificam peroxidases em cana-de-açúcar.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal:

Foram utilizados cultivares comerciais do IAC, RIDESA e CTC: SP79-1011, IAC95-5000, IACSP94-4004, IAC93-2101, IACSP96-2094, RB867515, IACSP93-3046, RB72454, RB855536. Mini-toletes foram plantados em copos plástico com substrato, mantendo-se irrigação contínua. Transcorrido aproximadamente um mês a irrigação foi suspensa para avaliar o teor de umidade no ponto de murcha permanente (PMP) e percentual de sobrevivência.

Isoenzimas Peroxidases:

Aproximadamente 1ml de tecido (foliar e radicular) macerado em nitrogênio líquido foi colocado em tubos *ependorfs* e adicionado 0,25 ml de polivinilpirrolidona (PVP) e 0,75 ml de tampão para extração (0,25 M Tris pH 8.6; 0,19 M glicina; 0.001 M EDTA). Após centrifugação (4 °C, 2500 RPM x 10 min) coletou-se o sobrenadante para aplicação em gel de poliacrilamida (5% concentração e 8% separação). Após a eletroforese aplicou-se ao gel solução corante (100 mg de 3-amino-9-ethyl, 2,5 ml de N,N-dimetil-formamida, 60 ml de acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 e 3 ml CaCl₂ (0.10 M) 200ul de H₂O₂) por 10 min.

Dendrograma

Para a construção do dendrograma utilizou-se o software NTSYS v.2.1 (Rohlf, 2000). As bandas geradas na eletroforese foram contabilizadas quanto a sua presença/ausência, sendo uma matriz construída para posterior análise pelo programa.

Banco de dados

Seqüências de aminoácidos de peroxidases foram obtidas no *genBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) por palavras-chave e literatura. A identificação com as

seqüências de cana-de-açúcar (ou SAS, *Sugarcane Assembled Sequences*) foi feita através do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Astchul *et al.*, 1990).

Anotação e filogenia

Os SAS resultantes da análise de similaridade pelo programa BlastX foram anotados manualmente (*e-value* mínimo de e^{-15}). Não foram consideradas a taxa de cobertura do SAS em relação à proteína *driver* original. As seqüências dos SAS foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) formando a filogenia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio de sobrevivência

Os resultados do ensaio de sobrevivência após déficit hídrico podem ser visualizados na tabela 1. Conforme verificamos, as cultivares com maior índice de sobrevivência foram a RB867515, RB72454 e a IACSP96-2094. Entre as cultivares mais sensíveis encontramos às cultivares IAC93-2101, IACSP94-4004 e RB855536.

TABELA 1. Número de plantas e percentual de sobrevivência ao déficit hídrico em diferentes cultivares comerciais do programa de melhoramento genética de cana-de-açúcar do centro de cana - IAC e RIDESA.

Cultivar	N.o de sobreviventes	Porcentagem
IACSP93-2101	1	6,25%
IACSP94-4004	3	23,08%
RB855536	5	38,46%
IACSP93-3046	6	40,00%
SP79-1011	7	50,00%
IACSP96-2094	9	69,23%
IACSP95-5000	10	78,57%
RB72454	13	100,00%
RB867515	13	100,00%

Esse resultado, embora inicial, é consistente com o fato de que a cultivar IAC93-2101 está corretamente classificada como responsiva, isto é, exigente em condições de solo e clima e provavelmente não tolera altos déficit hídricos. Por outro lado, as cultivares IACSP96-2094, RB867515, RB72454 mostraram maior tolerância à seca, o que corrobora com os dados que a cultivar IACSP96-2094 é rústica e adaptada para ambientes mais pobres, ou seja, é menos exigente em termos de ambiente de produção e as cultivares RB são ecléticas, sendo cultivadas em vários ambientes de produção. Embora a IACSP95-5000 seja uma

cultivar responsiva, ela tem se sobressaído em produtividade mesmo em regiões que apresentam déficit hídrico.

Isoenzimas peroxidase

Conforme observamos na Fig.1, houve variabilidade nos perfis isoenzimático de cada cultivar. A cultivar RB85536 não apresentou algumas bandas após a coloração, o que pode significar a falta de algumas peroxidases. Em tecido radicular não foi possível se observar as bandas, provavelmente devido à presença de microorganismos do solo.

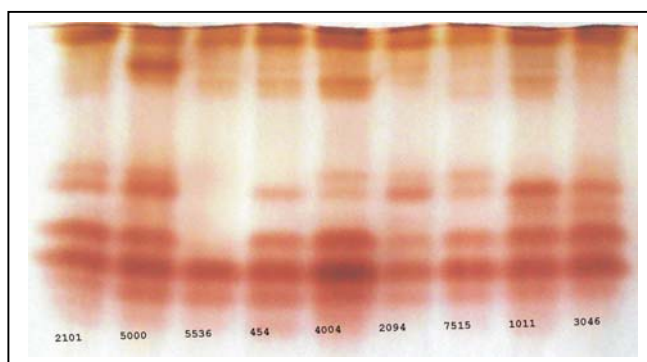


FIGURA 1. Perfil de isoenzimas peroxidases em tecido foliar de cana-de-açúcar (siglas simplificadas).

Análise de similaridade

No dendrograma da Figura 2 são definidos três grupos, o primeiro constituído pelos cultivares IAC93-2101, IAC95-5000, IACSP94-4004, IACSP96-2094, RB867515; o segundo caracterizado pela RB72454, SP791011, IACSP93-3046, e um terceiro, formado apenas pela RB85-5536. Esse resultado é consistente pois a cultivar IACSP93-3046 é progênie da cultivar SP791011. A cultivar RB85536 formou um grupo isolado uma vez que não apresentou algumas bandas no gel, o que pode representar a falta de algumas peroxidases. Futuros ensaios irão determinar se a falta dessas peroxidases podem estar relacionadas com a sensibilidade da planta ao estresse hídrico, entretanto, nos testes de sobrevivência essa cultivar se apresentou muito sensível a seca.

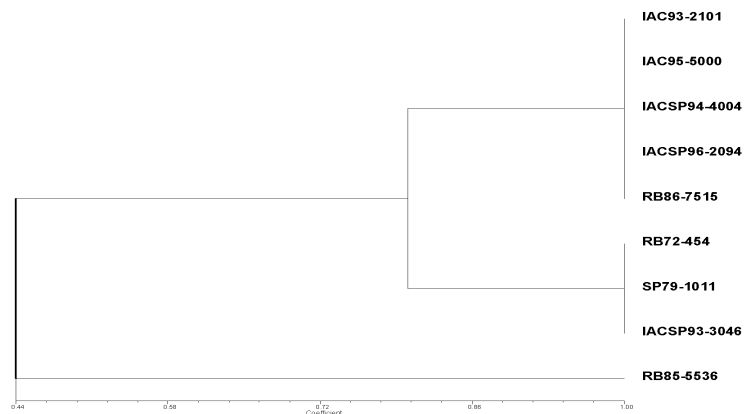


FIGURA 2. Dendrograma formado a partir do padrão de bandas do sistema de isoenzimas peroxidases pelo software NTSYS v2.1, caracterizando três agrupamentos. No eixo horizontal abaixo é mostrado o coeficiente de similaridade.

Peroxidases em cana-de-açúcar

Um banco de dados contendo 6360 peroxidases de diversos organismos foi criado para comparação com ESTs (*Expressed Sequences Tags*) de cana, o projeto SUCEST. O Banco de peroxidases pode ser visualizado em http://vicenterj.tripod.com/peroxidase_db.htm. A busca por seqüências homólogas aos *drivers* resultou em 301 SAS de cana. Esses SAS foram re-blastados no *genBank* (NCBI), resultando em 148 SAS com identidade.

Filogenia

Os resultados da análise filogenética resultaram na formação de 14 grupos de peroxidases. O dendrograma dessa análise está disponível no site <http://vicenterj.tripod.com/filo.htm>. Na Figura 3 apresentamos um ramo da árvore filogenética.

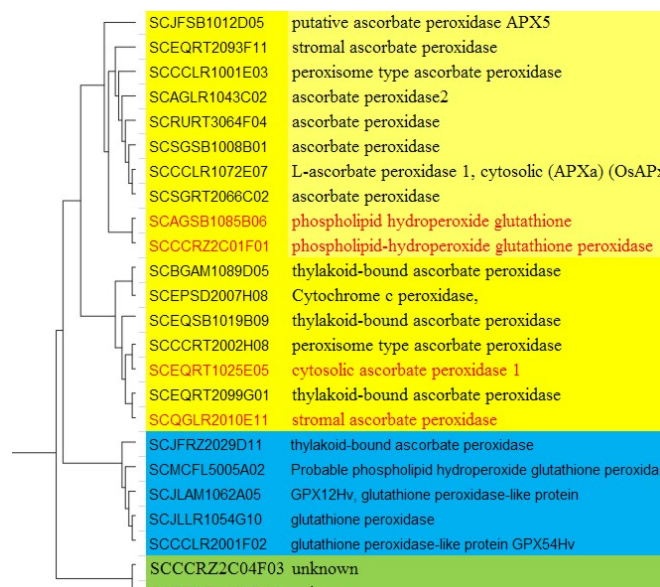


FIGURA 2. Árvore filogenética de peroxidases de cana de açúcar (apenas um ramo é mostrado). A filogenia foi feita utilizando-se o software ClustalX v.1.8.

Conforme observamos nesse agrupamento, o primeiro grupo de SAS (em amarelo) foi em sua maioria classificados como peroxidase dependente de ácido ascórbico, o segundo grupo (azul) se destaca na maioria como peroxidase dependente de glutatona e no terceiro (verde) são peroxidases desconhecidas.

CONCLUSÃO

O PMP não demonstrou ser uma boa avaliação em cana-de-açúcar para avaliação da resposta à seca.

Os testes de sobrevivência indicaram que as cultivares IAC93-2101 e IACSP94-4004, ambas exigentes a clima e solo foram sensíveis à seca. As cultivares IACSP96-2094, IAC95-5000, RB867515, e RB72454 obtiveram os melhores índices de sobrevivência.

O padrão isoenzimático do sistema peroxidase demonstrou variação entre os cultivares. A cultivar RB855536, sensível a seca, não apresentou algumas peroxidases.

Um banco de dados contendo 148 seqüências de peroxidases de cana-de-açúcar foi criado e a análise filogenética dessas seqüências apresentou 14 grupos principais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTCHUL, S. F. et al. Basic local alignment tool. **J. Mol. Biol.** v. 215, p. 403–410, 1990.

THOMPSON, J. D., et al.,. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.** v. 25, p. 4876-4882, 1997.

ROHLF, F. J. NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1: Exeter Software, Setauket, NY, 2000.