



ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E MOLECULARES NA FOTOSÍNTESE DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB DÉFICIT HÍDRICO

PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR CHANGES IN SUGARCANE PHOTOSYNTHESIS UNDER WATER STRESS

Pena, EPN¹; Silva, FAC¹; Souza, AER¹; Oliveira, MS¹; Calsa, T Jr ¹

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Depto de Genética CEP: 56.900-000, Recife-PE. Brasil. eltonnunes1@yahoo.com.br, amandarocha228@gmail.com, fabiana.acs@gmail.com, oliveirams@outlook.com, terciliojr@yahoo.com.br

Resumo

A cana-de-açúcar é uma gramínea de grande relevância para o cenário econômico brasileiro devido a produção de açúcar e etanol. Fatores ambientais como a seca comprometem a produtividade e o desenvolvimento da planta, principalmente por interferir na funcionalidade de suas organelas. Os cloroplastos são organelas semiautônomas, responsáveis pela fotossíntese assim como modulação das respostas iniciais a estresses abióticos. Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar alterações fisiológicas e moleculares da cana-de-açúcar submetidas a condições de déficit hídrico. Foram utilizados segmentos de colmo de cana-de-açúcar (variedade RB92579). As plantas foram propagadas por 90 dias e submetidas a dois tratamentos: controle (irrigado) e déficit hídrico por sete dias (estresse). Os parâmetros fisiológicos realizados foram: fotossíntese líquida (A), transpiração (E) e condutância estomática (gs), utilizando o analisador portátil de CO₂ a infravermelho (IRGA) e o teor relativo de água (TRA). Foi feita uma análise proteômica diferencial dos cloroplastos de ambos os tratamentos buscando correlacionar os dados fisiológicos obtidos com proteínas relacionadas a fotossíntese. As análises fisiológicas revelaram uma redução na condutância estomática, na fotossíntese e transpiração nas plantas sob estresse. Do ponto de vista molecular foi possível identificar que proteínas ligadas ao processo fotossintético possuíam resposta diferencial entre os tratamentos, especialmente aquelas envolvidas com a tradução da RuBisCO, ATP sintase e PEP carboxilase. Os dados obtidos nas análises fisiológicas e moleculares evidenciam as alterações causadas na cana-de-açúcar em resposta ao estresse por déficit hídrico. Tais resultados são de grande importância para seleção de variedades enriquecendo os programas de melhoramento genética da cultura canavieira.

Palavras-chave: Estresse abiótico; Cloroplasto; *Saccharum spp*;

Introdução: A cana-de-açúcar é uma gramínea de grande relevância econômica, por ser uma das principais fontes de açúcar no mundo, sendo o Brasil o responsável por 70 % desta produção (CRUZ; DIERIG, 2015). Alterações nas condições edafoclimáticas e a grande demanda mundial por energia menos poluente têm favorecido a expansão do setor sucroalcooleiro em regiões áridas e semiáridas, principalmente para a produção de bioetanol. A seca é um dos principais fatores que compromete a produtividade da cana-de-açúcar, prejudicando o crescimento e desenvolvimento da planta, pois desencadeia alterações morfofisiológicas, como fechamento dos estômatos, alterações na área foliar e senescência foliar (AKHTAR; NAZIR, 2013; BHARGAVA; SAWANT, 2013). Os danos causados pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a seca levam a alterações na funcionalidade das organelas, principalmente os cloroplastos (CHAN et al., 2016). Estas organelas semiautônomas são responsáveis pela fotossíntese e participam no metabolismo do fósforo, enxofre e nitrogênio, e na síntese de diversos compostos vitais para as plantas, como vitaminas, hormônios, ácidos graxos (JARVIS; LÓPEZ-JUEZ, 2013; REBEIZ, 2010). Devido a sua participação em diversas rotas moleculares e bioquímicas, os cloroplastos são



considerados moduladores iniciais dos mecanismos de regulação das plantas em resposta a fatores abióticos, como a síntese do fitohormônio ácido abscísico, produção de osmoprotetores e síntese de enzimas antioxidantes (BISWAL, 2011). Neste contexto, compreender os mecanismos moleculares de regulação dos cloroplastos, principalmente das vias fotossintéticas, por meio de ferramentas de análise da expressão gênica, como a proteômica, é de suma importância para auxiliar o melhoramento da cultura. Portanto, o presente trabalho objetivou avaliar alterações fisiológicas e moleculares da cana-de-açúcar submetidas a condições de déficit hídrico.

Metodologia: O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Laboratório de Expressão Gênica na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE. Os segmentos de cana-de-açúcar da variedade RB92579 foram provenientes da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA). Os segmentos de colmo foram propagados em vaso contendo solo e regados diariamente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos: i) controle irrigado e ii) déficit hídrico, totalizando oito unidades experimentais. Após 90 dias de propagação, as plantas foram submetidas ou não (controle irrigado) ao déficit hídrico por sete dias. Ao final do experimento, as folhas de cana-de-açúcar foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. Os dados de fotossíntese líquida (A), transpiração (E) e condutância estomática (gs) foram mensurados com o analisador portátil de CO₂ a infravermelho (IRGA-Modelo LCi Pro, Hoddesdon, U.K.) enquanto que teor relativo de água (TRA) foi determinado de acordo com a metodologia de Barrs e Weatherler (1962), utilizando fragmentos foliares de 1cm². Os dados fisiológicos obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % probabilidade, utilizando o programa estatístico Assistat 7.7 Beta. A análise molecular foi realizada a partir do isolamento de cloroplastos de ambos os tratamentos de acordo com a metodologia de Mariac et al (2000). A extração de proteínas totais dos cloroplastos de acordo com a metodologia de Hurkman e Tanaka (1986) seguida de focalização isoeletrica (pH 3-10 linear, 11 cm) e eletroforese bidimensional (SDS-PAGE 12, 5%). As imagens dos géis obtidos foram analisadas no programa ImageMaster, e os spots com RATIO>1,5 e ANOVA significativa foram excisados, digeridos com tripsina e os peptídeos obtidos analisados no espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF seguindo-se de identificação no programa Mascot para identificação das proteínas. No presente trabalho foram selecionadas todas as proteínas relacionadas a fotossíntese com padrão diferencial entre os tratamentos.

Resultados e discussão: As plantas que estavam em supressão de rega tiveram reduções significativas nos parâmetros fotossintéticos e no teor relativo de água (TRA) em relação às plantas que foram irrigadas diariamente, com decréscimo de 78 % da fotossíntese líquida (A), 82,4 % na condutância estomática (gs), 78 % da transpiração foliar (E) e 20 % do teor relativo de água (TRA) (Tabela 1). Alterações nos níveis hídricos foliares comprometem a regulação da abertura e fechamento dos estômatos, um mecanismo relevante para regulação hídrica, transpiração e captação de gás carbônico. As plantas sob déficit hídrico com o intuito de reduzir a desidratação e manter a turgescência celular, fecharam os estômatos, comprometendo diretamente a captação do gás carbônico e, conseqüentemente, a realização da fotossíntese (SMIT; SINGELS, 2006). Ademais, a redução no conteúdo hídrico nas folhas promove o aumento de espécie reativas de oxigênio, responsáveis pela oxidação das proteínas do fotossistema I (PSI) e fotossistema II (PSII), comprometendo o aparato fotossintético (CHAN et al., 2016). A redução condutância estomática também comprometeu a transpiração, como foi observado no experimento, ocasionando o aumento da temperatura foliar devido a



absorção da radiação solar incidente, este aumento pode ocasionar desnaturação e degradação das proteínas e membranas, interferindo na funcionalidade do cloroplasto.

Corroborando com os dados fisiológicos foram identificadas seis proteínas relacionadas à fotossíntese que sofreram redução na tradução sob estresse, RuBisCO subunidade maior (spot 151) e menor (spot 140), Fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP carboxilase) (spot 153), Piruvato ortofosfato dicinase (spots 75 e 152), subunidade gama da ATP sintase (spot 67), Centro ferro-enxofre do Fotossistema I (spot 134) e Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase B1 (cloroplastidial) (spots 69 e 149), e duas proteínas mais acumuladas sob estresse, RuBisCO subunidade maior (spots 76,78 e 80) e subunidade alfa da ATP sintase (spots 103 e 131) (Figura 1).

O estresse hídrico provavelmente ocasionou oxidação do centro ferro-enxofre do fotossistema I, devido ao acúmulo de EROs (CHAN et al., 2016; TAKAGI et al., 2016). Conjuntamente o déficit hídrico promoveu a redução na produção de H^+ pela fotoxidação das moléculas de água, acarretando a inibição da atividade da ATP sintase (ZHOU et al., 2012), e conseqüentemente redução na fotofosforilação para produção de ATP e comprometimento na redução NADP em NADPH.

A redução na captação do CO_2 , devido a diminuição da condutância estomática, reduziu a funcionalidade da PEP carboxilase (LISAR; MOTAFAKKERAZAD; RAHM, 2012). Visto que, a PEP carboxilase catalisa a reação entre o fosfoenolpiruvato com CO_2 produzindo oxalacetato que posteriormente será transportado para as células do mesófilo para a utilização do CO_2 pela RuBisCO. Conseqüentemente diminui do Piruvato ortofosfato dicinase (PPDK) (LISAR; MOTAFAKKERAZAD; RAHM, 2012) responsável pela regeneração da fosfoenolpiruvato a partir da reação do piruvato com ATP e fosfato inorgânico. Conjuntamente, as subunidades maior e menor RuBisCO foram inibidas, possivelmente devido ao declínio na síntese de ATP e comprometimento na redução NADP em NADPH, conjuntamente com a redução na captação do CO_2 e acidificação do estroma (CARMO-SILVA et al., 2010).

Por ser a primeira enzima do Ciclo de Calvin, a diminuição da tradução da RuBisCO possivelmente comprometeu todo o ciclo, pois foi identificado no nosso estudo a redução na tradução da proteína Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase B1 (cloroplastidial) responsável pela redução do 1,3 bifosfatoglicerato em gliceraldeído 3-fosfato na etapa de redução do Ciclo de Calvin, desta forma, acarretando redução fotossíntese, como foi registrada nas análises fisiológicas (Tabela 1). Contudo, foi observada a aumento na tradução da subunidade alfa da ATP sintase e da subunidade maior da RuBisCO sob déficit hídrico. Estudo com cana-de-açúcar sob déficit hídrico evidencia que a subunidade alfa da ATP sintase é naturalmente mais acumulada em condições de déficit hídrico (JANGPROMMA, 2010). O aumento da tradução da subunidade maior da RuBisCO, possivelmente está relacionada a uma isoforma, como foi observado em estudo com cana-de-açúcar submetida estresse osmótico, o houve um aumento na expressão da subunidade menor da RuBisCO (ZHOU et al., 2012).

Tabela 1: Valores médios da fotossíntese líquida (A), da condutância estomática (gs), da transpiração foliar (E) e do teor relativo de água em porcentagem (TRA). (Letras diferentes entre os tratamentos diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % probabilidade)

Tratamento	Parâmetros Fotossintéticos			TRA (%)
	A	gs	E	
Controle	19,37 a	0,222 a	5,55 a	85 a
Estresse	4,25 b	0,039 b	1,22 b	68 b



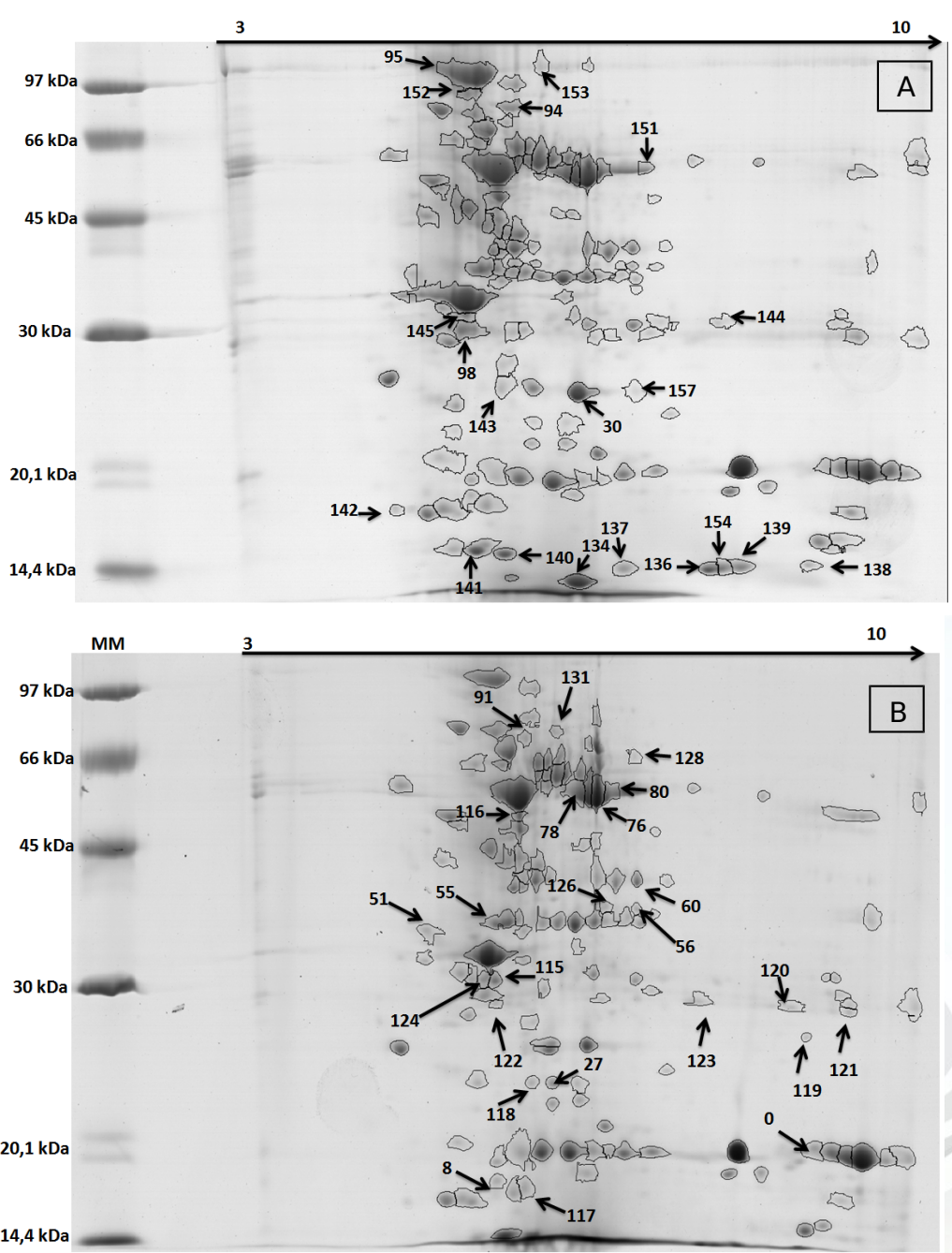


Figura 1: Imagens dos géis 2D-PAGE: A - Gel do tratamento sem supressão de rega (controle); B – Gel do tratamento com supressão de rega por sete dias.

Conclusões: O déficit hídrico ocasionou alterações na fisiologia da cana-de-açúcar. O proteoma cloroplastidial de cana-de-açúcar mostrou-se responsivo ao estresse por déficit hídrico. As proteínas diferencialmente acumuladas identificadas estão associadas a mecanismos de regulação gênica e ligadas as variações fisiológicas e fotossintéticas potencialmente responsivas ao déficit hídrico. O acúmulo observado principalmente na subunidade alpha da ATP sintase e na subunidade maior da RuBisCO podem ser possíveis biomarcadores para o melhoramento da cana-de-açúcar.

Agradecimentos: CAPES, CETENE e LGPP/UFPE





Referências:



AKHTAR, I.; NAZIR, N. Effect of waterlogging and drought stress in plants, *Int J Water Res Env Sci*, n. 2, p. 34–40, 2013.

BARRS, H.D.; WEATHERLEY P.E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves, *Aust. J. Biol. Sci.* n. 15, p. 413–428, 1962.

BHARGAVA, S.; SAWANT, K. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression., *Plant Breed*, n. 132, p. 21–32, 2013.

BISWAL, B. et al. Photosynthesis, a global sensor of environmental stress in green plants: stress signaling and adaptation, *Curr Sci*, n. 101, p. 47–56, 2011.

CARMO-SILVA, A.E. et al. Rubisco activities, properties, and regulation in three different C4 grasses under drought, *J Exp Bot*, n. 61, p. 2355–2366, 2010.

CHAN, Z. et al. Song, Editorial: ROS Regulation during Plant Abiotic Stress Responses, *Front. Plant Sci.* 7 p., 2016.

CRUZ, V.M.V.; DIERIG, D.A. eds., *Industrial Crops*, Springer, 2015.

HURKMAN, W.J. & TANAKA, C.K. Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis, *PLANT Physiol*, n. 8, p. 802–806, 1986.

JANGPROMMA, N. A Proteomics Analysis of Drought Stress-Responsive Proteins as Biomarker for Drought-Tolerant Sugarcane Cultivars, *Am. J. Biochem. Biotechnol*, n. 6, p. 89–102, 2010.

JARVIS, P.; LÓPEZ-JUEZ, E. Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, n.14, p. 787–802, 2013.

LISAR, S.Y. S.; MOTAFAKKERAZAD, R. M. M.; RAHM, I.M. M. Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses, in: I.M.M. Rahman (Ed.), *Water Stress*, InTech, 2012.

MARIAC, C. et al. Chloroplast DNA extraction from herbaceous and woody plants for direct restriction fragment length polymorphism analysis. *BioTechniques*, n. 28, p. 110–113, 2000.

REBEIZ, C.A. *The chloroplast: basics and applications*, Springer, Dordrecht, 2010.

SMIT, M.A.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress, *Field Crops Res*, n. 98, p. 91–97, 2006.

TAKAGI, D. et al. Superoxide and Singlet Oxygen Produced within the Thylakoid Membranes Both Cause Photosystem I Photoinhibition, *Plant Physiol*, n.171, p. 1626–1634, 2016.

ZHOU, G. et al. Proteomic Analysis of Osmotic Stress-Responsive Proteins in Sugarcane Leaves, *Plant Mol. Biol. Report*, n. 30, p. 349–359, 2012.

