

27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP

## Avaliação do perfil micromolecular de genótipos de cana-de-açúcar com diferente suscetibilidade à ferrugem alaranjada

Isabel Duarte Coutinho<sup>\*,1,4</sup>; Livia de Lima Thomaz<sup>2,4</sup>; Pedro L. C. A. Alves<sup>3,5</sup>; Silvana Creste<sup>3,6</sup>; Renato Lajarim Carneiro<sup>3,7</sup>; Alberto José Cavalheiro<sup>3,4,1</sup>

### RESUMO

Genótipos de cana-de-açúcar suscetível (SP 89-1115) e resistente (IAC 95-5000) ao fungo *Puccinia kuehnii* foram germinados em Câmara de Crescimento. Folhas de 10 mudas com 5, 10, 15, 30 e 45 dias foram coletadas às 20:00 horas e às 6:00 horas. Posteriormente, as amostras foram imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido, liofilizadas, trituradas em moinho criogênico e os extratos analisados empregando CLAE-DAD. Os dados cromatográficos foram alinhados e normalizados. PCA foi realizado para investigar a existência de correlação entre o perfil cromatográfico e resistência a *P. kuehnii*. Foram observados dois agrupamentos, um para o genótipo resistente e outro para o genótipo suscetível. Os picos cromatográficos responsáveis pela separação foram identificados como flavonoides. O gráfico de loadings da PC2 mostrou que a segunda componente teve a variância explicada devido ao composto orientina/isoorientina, enquanto o gráfico de loadings da PC3 teve a variância explicada devido aos compostos schaftosídeo, isochaftosídeo, diosmetina-C-glicosídeo, vitexina, tricina-7-O-glicosídeo, tricina-4'-O-treo/treo-guaiacilgliceril-éter-7-O-glucupiranosídeo e tricina-4'-O-eritro/treo-guaiacilgliceril-éter-7-O-glucupiranosídeo. Portanto, até o presente momento, podemos inferir que os flavonoides são os principais compostos responsáveis pela separação entre genótipos de cana-de-açúcar resistente e suscetível a *Puccinia kuehnii*.

**Palavras-chave:** cana-de-açúcar, metabolômica, ferrugem alaranjada, PCA

## Evaluation of the micromolecular profile of sugarcane genotypes with different susceptibility to orange rust

### SUMMARY

The sugarcane genotypes susceptible (SP 89-1115) and resistant (IAC 95-5000) to orange rust were germinated in growth chamber. Leaves of ten seedlings of 30, 35, 40, 45, 60 and 75 days old were harvested at 8 pm and 6 am. Afterwards, the samples were then immediately frozen under liquid nitrogen and stored at -80 °C, lyophilized and milled in a cryogenic mill. The extracts were prepared and analyzed by HPLC-DAD and HPLC-DAD-MS. The chromatographic data were aligned and normalized. PCA was then performed to investigate the existence of correlation between chromatographic profiles and the resistance to *P. kuehnii*. Scores and loading plots for PC2 versus PC3 showed two clusters, with the samples from resistant seedlings clustered in one group and the susceptible ones grouped in the other one. The chromatographic peaks responsible for the separation were identified as flavonoids. The loading plot of PC2 indicated that the second component had the variance explained due to the orientin/isoorientin compound, while the loading plot of PC3 had its variance explained as a result of the following compounds: schaftoside, isochaftoside, diosmetin-C-glycoside, vitexin, tricinin-7-O-glycoside, tricinin-4'-O-erythro/treo-guaiacylglyceril-ether-7-O-glucopyranoside and tricinin-4'-O-erythro/treo-guaiacylglyceril-ether-7-O-glucopyranoside. Thus, it can be inferred until further investigations prove otherwise that the flavonoids are the main compounds responsible for the separation between genotypes of the sugarcane resistant and susceptible to *Puccinia kuehnii*.

**Key-words:** sugarcane, metabolomic, orange rust, PCA.

<sup>1</sup>Doutoranda em Química, <sup>2</sup>Iniciação científica, <sup>3</sup>Pesquisador científico; <sup>4</sup>NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossintese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química – UNESP, Araraquara, SP, Brasil; <sup>5</sup>Departamento de Biologia, Faculdade de Agronomia, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; <sup>6</sup>IAC/APTA, Centro de Cana - Instituto Agrônomo, Ribeirão Preto, SP, Brasil; <sup>7</sup>Departamento de Química, UFSCar, São Carlos, SP, Brasil. \*E-mail: [isadcoutinho@iq.unesp.br](mailto:isadcoutinho@iq.unesp.br)

## INTRODUÇÃO

Começando com Gregor Mendel (1822-1884), que descobriu a herança de características fenotípicas em ervilha (*Pisum sativum*), e em 1953 James Watson e Francis Crick propuseram a estrutura do DNA, houve um avanço no nosso conhecimento sobre conceitos nos processos bioquímicos, genéticos e fisiológicos nos sistemas vivos. Em 2000 o sequenciamento completo do genoma de *Arabidopsis thaliana* foi publicado, seguido pelo sequenciamento completo do genoma humano em 2011. Embora a sequência completa do DNA de *Arabidopsis* é conhecida, somente uma pequena fração tem sido caracterizada funcionalmente (Dixon *et al*, 2006). Nesta era pós genômica, a metabolômica tornou-se a principal ferramenta na determinação da função do gene. Da mesma forma, como o genoma é toda a informação genética em uma planta, o proteoma é todas as proteínas, o metaboloma é todos os metabólitos. Considerando que, os metabólitos são produtos finais de funções celulares, e seus níveis podem ser interpretados como a resposta do sistema biológico para o ambiente ou manipulação genética (Maloney, 2004), a metabolômica associada a estudos genômicos e proteômicos, pode auxiliar na caracterização de fenótipos metabólicos sobre condições específicas (fatores ambientais, genéticos e patológicos) e a ligação destes fenótipos para o corresponde genótipo (Villas-Bôas, Rasmussen & Lane, 2005; Villas-Bôas & Gombert, (2006). Considerando que a cultura da cana-de-açúcar têm sido relevante para a economia brasileira desde o início do século 16, e que, atualmente, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar com 8 milhões de hectares cultivados, com produção aproximada de 626 milhões de toneladas em 2010/2011 (CONAB, 2011). O presente trabalho teve como objetivo estudar a resposta micromolecular (metaboloma) de genótipos de cana-de-açúcar com diferente suscetibilidade ao fungo *Puccinia kuehnii* empregando ferramentas da Quimiometria.

## MATERIAL E MÉTODOS

Toletes das variedades IAC 95-5000 e SP 89-1115 foram fornecidos pelo Instituto Agrônomo (IAC) – Setor Cana em 13/09/2010. O total de 200 gemas de ambos os genótipos foram germinadas em frascos de 180 mL em meio nutritivo Bioplant durante 30 dias. Posteriormente, 74 mudas de cada variedade foram selecionadas aleatoriamente e transferidas para vasos de 3 litros contendo Bioplant (2 mudas por vaso). As plantas permaneceram em Câmara de Crescimento à 26°C com fotoperíodo de 10 horas para o período noturno e 14 horas para o período diurno. As coletas foram realizadas no período de 30, 35, 40, 45, 60, 75 dias, a partir do sorteio aleatório de cinco vasos no intervalo de tempo de 10 horas entre uma coleta e outra para cada período. Após as coletas, a atividade enzimática foi inibida por congelamento com nitrogênio líquido e o material vegetal armazenado em freezer -80°C. As plantas foram liofilizadas. O material vegetal seco foi triturado em moinho criogênico durante 10 minutos. A primeira etapa do procedimento de moagem consistiu de congelamento da amostra seguida por 1 ciclo com dois estágios de pulverização e resfriamento, respectivamente, para obter partículas < 60 µm. A etapa de preparo dos extratos e análise por CLAE foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida por nosso grupo (Dissertação de mestrado - Gabriel Mazzi Leme). Os extratos foram preparados a partir de 200 mg de material vegetal seco, no qual adicionou-se 2 mL da mistura de água/etanol/isopropanol (0,35:0,45:0,25), com sonicação durante 15 minutos em banho de ultra-som. Os 2

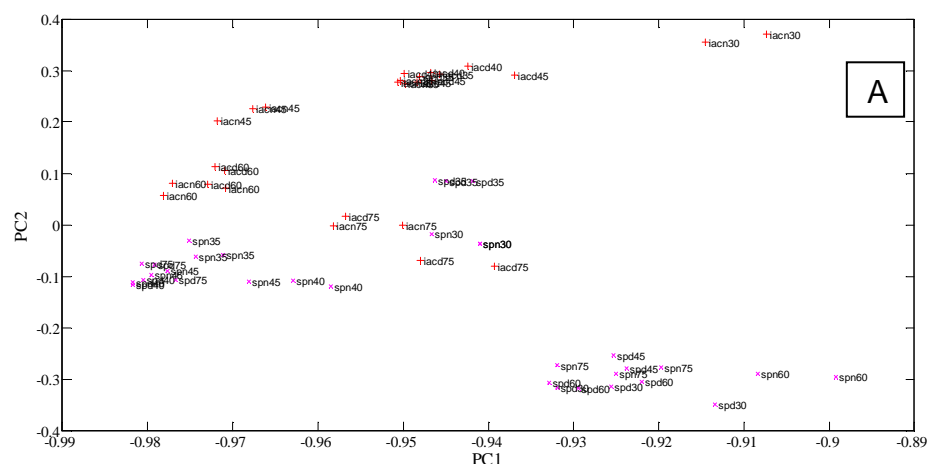
27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP

mL de extrato foram separados e adicionados mais 2 mL para segunda extração, após a segunda extração, o material vegetal restante no frasco foi lavado com 2 mL da mistura de solvente e adicionado mais 2 mL para terceira extração. O volume final de 8 mL foi seco em speedvac. Depois de seco o extrato foi re-solubilizado em 2 mL da mistura água/metanol (1:1), aplicado em cartucho C18 e eluído com 4 mL de metanol. O volume final de 4 mL foi seco em speedvac, o qual teve o volume final reconstituído em 100  $\mu$ L de água/metanol 1:1 para análise. Os extratos foram realizados em triplicata. Os extratos foram analisados empregando Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD). E algumas análises foram realizadas empregando Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLD-DAD-ESI). Os dados cromatográficos obtidos foram organizados na forma de matrizes para a etapa de alinhamento, pré-processamento e análise por PCA (Principal Component Analysis). O processamento dos dados foi realizado empregando o *software Matlab 7.10.0* (The Math Works, Co., Natick, MA, USA) e o pacote computacional *PLS-Toolbox* (Eigenvector Research, Inc.).

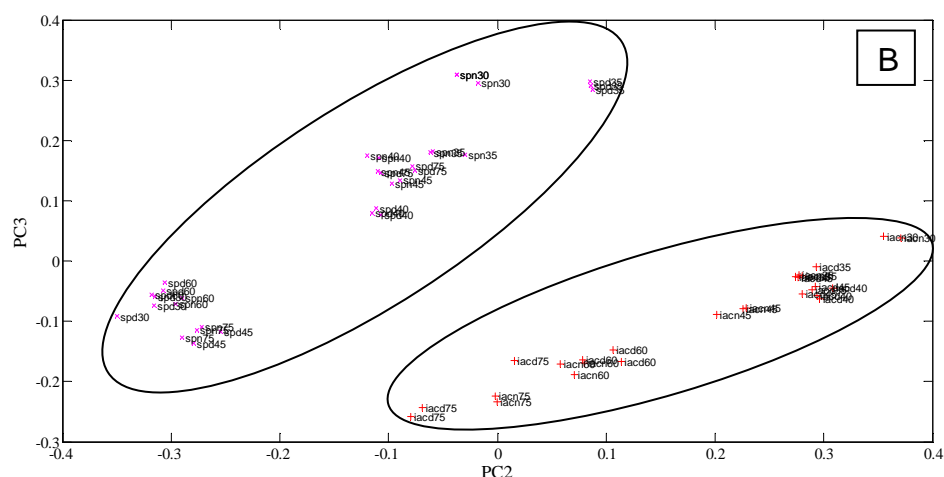
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por PCA foi aplicada neste trabalho com a finalidade de reduzir a dimensionalidade dos dados e fornecer uma melhor visualização dos agrupamentos das amostras, devido principalmente a complexidade das amostras e o grande número de picos nos cromatogramas, os quais são impossíveis de serem avaliados individualmente empregando uma simples inspeção visual. Quando PCA foi aplicada para a investigação das principais diferenças entre as variedades SP 89-1115 e IAC 95-5000, quatro componentes principais explicaram 97,23% da variância dos dados (Figura 3).

Na figura 1, o gráfico de scores PC1XPC2(A) e PC2XPC3(B) é dado em função do horário de coleta das amostras e diferença varietal. Os códigos utilizados para o genótipo SP 89-1115 coletada às 6:00 horas (spd) e às 20:00 horas (spn) com 30, 35, 40, 45, 60 e 75 dias de germinação foram: *spd30, spd35, spd40, spd45, spd60, spd75* e *spn30, spn35, spn40, spn45, spn60, spn75*. Enquanto que para o genótipo IAC 95-5000 coletada às 6:00 horas (iacd) e às 20:00 horas (iacn) com 35, 45, 60 e 75 dias de germinação foram *iacd35, iacd45, iacd60, iacd75* e *iacn35, iacn45, iacn60, iacn75*.



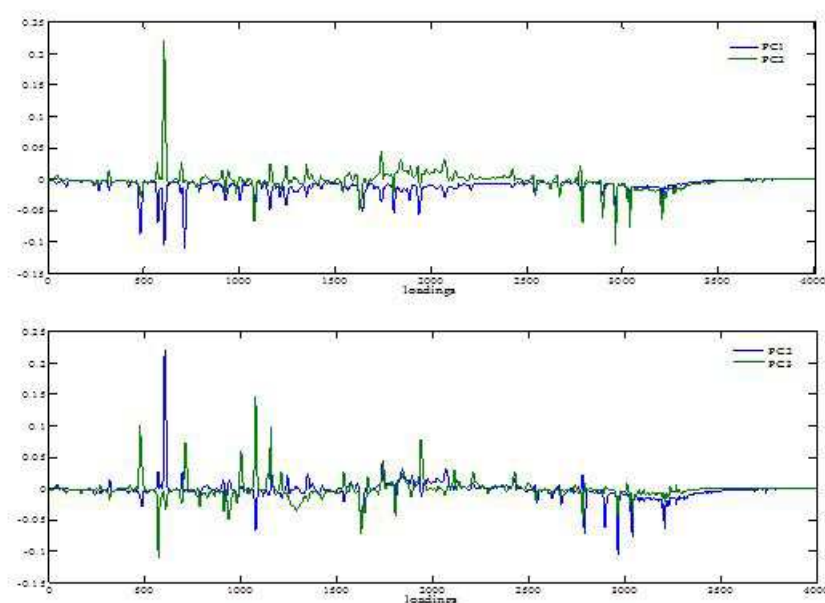
27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP



**Figura 1** – Gráfico de scores. (A) PC1XPC2. (B) PC2XPC3.

No gráfico de scores PC2XPC3 pode-se observar a discriminação de dois grupos separados de acordo com a diferença genética, sendo que a variedade SP 89-1115 é suscetível a ferrugem alaranjada, enquanto a variedade IAC 95-5000 é resistente. Usando PC2 e PC3, os dois genótipos de cana-de-açúcar foram separadas de acordo com a idade. Apesar da PC2 e PC3 explicarem 6,92% da variância, pode-se observar uma importante discriminação das amostras a partir de valores positivos da PC3 para valores negativos de PC3 e PC2, indicando que os genótipos com 30 dias apresentam perfil cromatográfico diferente, mas a medida que “envelhecem” o perfil cromatográfico tende a se tornar semelhante.

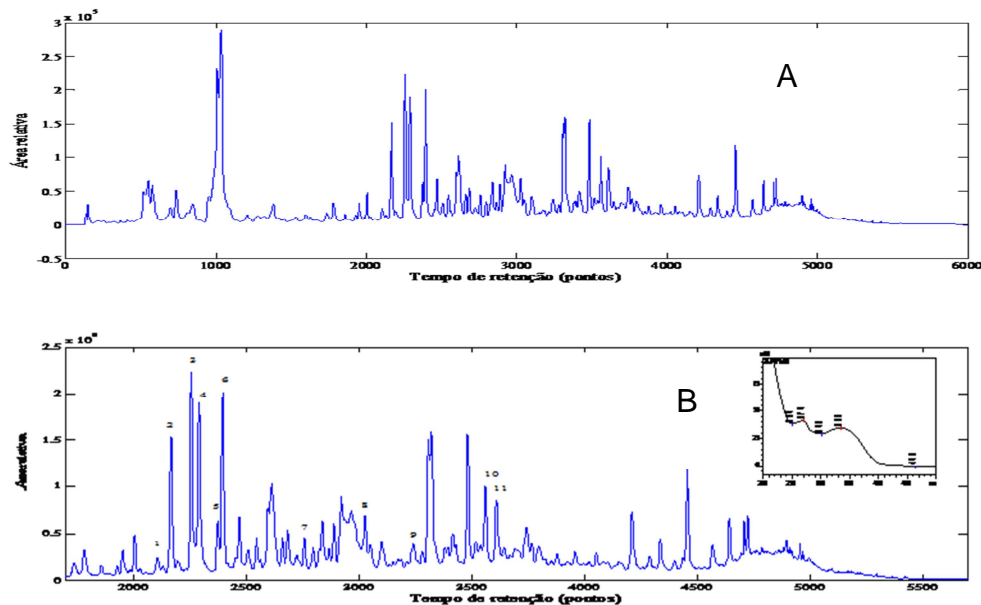
A análise do gráfico de loadings (figura 2) permitiu atribuir os principais picos (variáveis) responsáveis pela discriminação das amostras. Sendo que a segunda componente teve a variância explicada, devido, principalmente ao pico em 24,6 minutos (604), enquanto que a PC3 do gráfico de loadings teve a variância explicada devido aos picos em 21,5(316); 23,2(476); 24,2(568); 25,5(694); 25,7(712); 29,6(1077); 31,0(1210); 34,5(1537); 38,2(1885); e 38,8(1937) minutos.



27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP

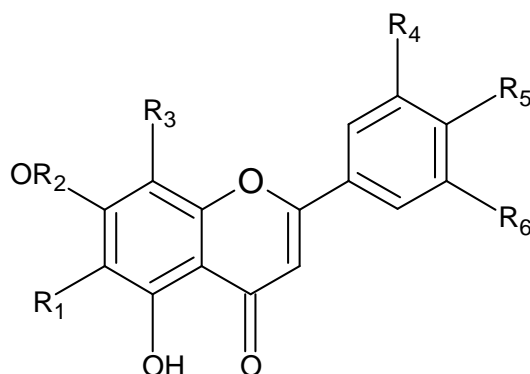
**Figura 2** – Gráfico de loadings para PC1XPC2 e PC2XPC3.

Com a finalidade de caracterizar os picos de 1-11 a amostra IACN75(figura 3) foi analisada empregando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-DAD- MS).



**Figura 3** – Cromatograma do genótipo IAC 95-5000 com 75 dias de germinação coletado às 20 horas. A: Cromatograma com o número original de variáveis(1-60,8 minutos); B: Cromatograma com o número de variáveis reduzida (18,1-60,8 minutos).

A análise dos espectros de massa e comparação com dados da literatura (Colombo *et al*,2005; Colombo *et al*,2006; Colombo *et al*,2008; Colombo *et al*, 2009) permitiu identificar a presença de ácidos fenólicos e flavonoides (figura 4). Através destes dados foi possível identificar o íon molecular dos picos de 1-11, assim como propor identificação para as substâncias referentes aos picos 2,3,4,5,6,7,10 e 11 de acordo com a tabela 1.



27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP

pico	substância	R1	R 2	R3	R4	R5	R6
2	schaftosídeo	glc	H	ara	H	OH	H
3	isoschaftosídeo	ara	H	glc	H	OH	H
4	Orientina ou isorientina	H	H	glc	OH	OH	H
5	Diosmetina 8-C-glicosídeo	H	H	glc	OH	OCH <sub>3</sub>	H
6	Vitexina ou isovitexina	H	H	glc	H	OH	H
7	tricina 7-O-glicosídeo	H	H	glc	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
10	Tricina-4'-O-treo/treo-guaiacilgliceril-éter-7-O-glucupiranosídeo	H	H	glc	OCH <sub>3</sub>	eritro ou treo guaiacilgliceril	OCH <sub>3</sub>
11	Tricina-4'-O-eritro/treo-guaiacilgliceril-éter-7-O-glucupiranosídeo	H	H	glc	OCH <sub>3</sub>	eritro ou treo guaiacilgliceril	OCH <sub>3</sub>

Figura 4 – Substâncias identificadas.

## CONCLUSÕES

Os principais compostos responsáveis pela discriminação entre o genótipo IAC 95-5000 e IAC 89-1115 foram flavonóides C-glicosilado e flavonas metoxiladas. As amostras referentes ao genótipo resistente à ferrugem alaranjada mostrou área relativa dos compostos identificados superior em relação ao genótipo suscetível. Esses resultados indicam que a resistência ao fundo da ferrugem alaranjada pode ser relacionada a teores maiores desse grupo de metabolitos secundários.

## LITERATURA CITADA

1. COLOMBO, R., YARIWAKE, J. H., QUEIROZ, E. F., NDJOKO, K., HOSTETTMANN. On-line identification of minor flavones from sugarcane juice by LC/UV/MS and post-column derivatization. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1574-1579, 2009.
2. COLOMBO, R., YARIWAKE, J. H., QUEIROZ, E. F., NDJOKO, K., HOSTETTMANN, K. On-line identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Journal of Chromatography A**, v. 1082, p. 51-59, 2005.
3. COLOMBO, R., YARIWAKE, J. H., QUEIROZ, E. F., NDJOKO, K., HOSTETTMANN, K. On-line identification of further flavone C- and O-glycosides from Sugarcane (*Saccharum officinarum* L., Gramineae) by HPLC-UV-MS. **Phytochemical analysis**, v. 17, p. 337-343, 2006.
4. COLOMBO, R., YARIWAKE, J. H., MCCULLAGHB, M. Study of C- and O-glycosylflavones in sugarcane extracts using liquid chromatography-exact mass measurement mass spectrometry. **Journal Brazilian Chemical Society**, v, 19, p. 483-490, 2008.
5. DIXON, R. A.; GANG, D. R.; CHARLTON, A. J.; FIEHN, O.; KUIPER, H. A.; REYNOLDS, T. L.; TJEERDEMA, R. S.; JEFFERY, E. H.; GERMAN, B.; RIDLEY, W. P.; SEIBER, J. N. Applications of Metabolomics in Agriculture. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, p. 8984-8994, 2006.
6. LEME, G.M. **Desenvolvimento de método analítico para estudo metabolômico de cana-de-açúcar**. (2011). Dissertação de mestrado – Instituto de Química – Departamento de Química. Universidade Estadual de São Paulo (UNESP Araraquara).
7. MALONEY, V. Plant metabolomics. **BioTeach Journal**, v. 2, p. 92-99, 2004.
8. VILLAS-BÔAS, S. G., GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma: uma ferramenta biológica emergente na era pós-genômica. **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, v. 36, p. 58-69, 2006.
9. VILLAS-BÔAS, S. G., RASMUSSEN, S., LANE, G. A. Metabolomics or metabolite profiles? **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 385-386, 2005.