

EFEITOS DO ÁCIDO *P*-METOXICINÂMICO SOBRE A SOJA: CRESCIMENTO, VARIABILIDADE CELULAR E INCORPORAÇÃO DO ALELOQUÍMICO NA PAREDE CELULAR

Bruna de Sá Barbosa (Bolsista – PIBIC/FA-UEM), Stephane Haracenko, Guilherme Henrique Gonçalves de Almeida, Wanderley Dantas dos Santos, Osvaldo Ferrarese-Filho, Rogério Marchiosi (orientador) e-mail: marchiosi@hotmail.com

Área e subárea: Ciências biológicas – Botânica/Fisiologia Vegetal

Palavras chave: alelopatia, ácido ferúlico, parede celular, crescimento.

Resumo

As plantas são capazes de liberar substâncias no ambiente que irão interferir no crescimento e desenvolvimento de plantas vizinhas. Este fenômeno é conhecido como alelopatia. Nosso grupo de pesquisa identificou o ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) como um dos principais responsáveis pela alelopatia do milheto, uma gramínea muito utilizada em sistemas de cultivo de soja no Brasil. Em estudos preliminares este composto mostrou forte atividade herbicida sobre plantas de *Euphorbia heterophylla*. Neste trabalho, avaliamos os efeitos do AMC sobre o crescimento de plantas de soja. A incorporação de AMC na parede celular foi também avaliada. De modo geral, nossos resultados mostraram que o AMC teve expressivo efeito inibitório sobre o crescimento das plantas de soja, reduzindo significativamente a viabilidade celular das raízes. A incorporação de AMC na parede celular parece ter sido a causa primária da inibição do crescimento. Provavelmente, isso se deve a possibilidade de o AMC realizar ligações cruzadas entre os componentes da parede celular de forma análoga ao ácido ferúlico, causando o enrijecimento desta estrutura.

Introdução

Pesquisadores têm procurado utilizar a alelopatia como uma ferramenta aplicada à agricultura. Em um sistema de rotação de culturas os restos vegetais que permanecem sobre o solo antecedendo o próximo plantio podem liberar compostos que influenciam o estabelecimento da nova cultura ou o aparecimento de plantas indesejáveis. Plantas indesejáveis constituem o principal empecilho ao desenvolvimento de sistemas de agricultura sustentável. Isso porque essas plantas competem com as culturas por água e nutrientes, o que pode trazer prejuízos ao desenvolvimento da cultura.

Nas últimas décadas o controle das plantas indesejáveis tem sido realizado com auxílio de herbicidas. No entanto, algumas espécies desenvolveram resistência aos produtos químicos comercializados para esse fim. Por isso, muitos trabalhos em alelopatia visam identificar

aleloquímicos com potencial para serem utilizados como herbicidas naturais. Esses compostos devem afetar um processo bioquímico essencial para as plantas e possuir um mecanismo de ação diferente daqueles dos produtos já comercializados. Alguns exemplos de herbicidas naturais são **cinmetilina**, um derivado do monoterpeneo 1,4-cineole no qual um grupo benzil reduz a sua volatilidade, e as **tricetonas**, grupo de herbicidas relacionados com o aleloquímico leptospermona.

O milheto (*Pennisetum glaucum*) pertence à família das gramíneas, sendo uma forrageira anual de verão, com ciclos vegetativos curtos que possibilitam sua utilização no consórcio de culturas. Alguns estudos demonstraram os efeitos alelopáticos do milheto na emergência de plantas daninhas tais como *Euphorbia heterophylla*, *Urochloa plantaginea* e *Urochloa brizantha* (Rios et al., 2011). Entretanto, estudos sobre os efeitos alelopáticos do milheto sobre plantas cultivadas tais como a soja e o milho são escassos.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem procurado investigar a alelopatia do milheto sobre plantas de *E. heterophylla*. Em um trabalho realizado recentemente o extrato aquoso de palhada de milheto mostrou forte atividade inibitória sobre o crescimento radicular de *E. heterophylla* (Silva, 2013). Uma cuidadosa análise de ressonância magnética nuclear (RMN) revelou o ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) como o principal componente do extrato.

Dessa forma, neste trabalho avaliamos os efeitos do AMC sobre o crescimento e viabilidade celular de raízes de plantas de soja. Devido à similaridade estrutural com o ácido ferúlico (um importante componente da parede celular), a possível incorporação do AMC na parede celular com conseqüente enrijecimento desta estrutura foi também avaliada.

Metodologia

Material Vegetal e Procedimentos Gerais

Sementes de soja, foram previamente desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio 2% por 5 min. Em seguida, as sementes foram distribuídas em folhas de papel Gernitest CEL-060 umedecidas com água deionizada. Os rolos confeccionados foram acondicionados em câmara escura a 25°C por 3 dias. Após esse período, plântulas uniformes foram selecionadas e transferidas para recipientes de vidro contendo 350 mL de solução nutritiva. Para evitar a deficiência de nutrientes a solução nutritiva foi substituída a cada dois dias. Os tratamentos foram realizados no 10º e 12º dias de cultivo pela adição de solução nutritiva contendo ácido *p*-metoxicinâmico (AMC) nas concentrações de 0, 50, 100 e 250 mg L⁻¹.

Análises de crescimento

No 14º dia de cultivo, as plantas foram retiradas do sistema experimental e lavadas em água deionizada. Em seguida, foram

determinados os comprimentos de raízes e caules, bem como as biomassas frescas de raízes, caules e folhas. A biomassa seca foi determinada após a desidratação dos tecidos em estufa à 60°C por 72 h.

Viabilidade celular

No 14º dia de cultivo, as raízes foram retiradas do sistema experimental e acondicionadas em placa de Petri contendo aproximadamente 15 mL de corante azul de Evans 0,25% por 15 min. Em seguida, as raízes foram lavadas abundantemente em água destilada. Então, as extremidades radiculares (aproximadamente 0,5 cm) foram excisadas e colocadas em tubo eppendorf contendo 1 mL de dimetilformamida para extração do corante por 50 min. A absorbância da solução de dimetilformamida foi realizada em espectrofotômetro a 600 nm.

Determinação do ácido p-metoxicinâmico (AMC) esterificado à parede celular

Biomassa seca de raízes (0,05 g) foi macerada por 1 min com 2 mL de metanol 50%. O extrato metanólico foi adicionado a tubos de ensaio e acondicionados em banho-maria a 80°C por 90 min, sendo agitado o conteúdo na metade do tempo. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo e centrifugados por 15 min a 3000 rpm, sendo reservado o sobrenadante em frasco âmbar. O pellet foi ressuspensionado com 0,5 mL de metanol 50%, os tubos agitados por 30 s e, então, centrifugados por 15 min, sendo o sobrenadante combinado com anterior (este procedimento foi realizado duas vezes). O precipitado foi acondicionado em estufa a 60°C até secagem completa. Então, 2,5 mL de NaOH foram adicionados ao precipitado e os tubos levados à banho-maria a 96°C por 2 h. Após esse tempo a reação de hidrólise foi interrompida em banho de gelo. As amostras foram acidificadas (pH 2,0) com 700 µL de HCl 5 M, centrifugadas por 15 min e o sobrenadante transferido para um funil de separação. Partição foi realizada duas vezes com 3,0 mL de éter etílico, sendo reservada a fase orgânica. As amostras foram secas em evaporador rotativo.

Antes da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) as amostras foram solubilizadas em 300 µL de metanol e 700 µL de ácido acético 4%. As amostras foram diluídas (2 vezes), filtradas e injetadas em cromatógrafo líquido com detector UV. Foi utilizada uma coluna de fase reversa (C18), sendo a fase móvel uma solução de metanol 60% aplicada com um fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e coluna de 25 cm.

Resultados e Discussão

De modo geral, nossos dados revelaram que o AMC reduziu o crescimento de raízes, caules e folhas de plantas de soja. O comprimento das raízes foi reduzido em 25,30% e 27,53% nos tratamentos com 100 e 250 mg L⁻¹ respectivamente. A biomassa fresca das raízes foi mais severamente

afetada, porém apenas com 50 (55,0%) e 100 mg L⁻¹ (39,67%) de AMC. O AMC, na concentração de 250 mg L⁻¹, não afetou significativamente a biomassa fresca das raízes. A biomassa seca das raízes foi reduzida (50,0%) apenas no tratamento com 50 mg L⁻¹ de AMC. O comprimento do caule foi reduzido em média em 23,4% em resposta aos tratamentos com 50, 100 e 250 mg L⁻¹ de AMC. Já a biomassa fresca do caule foi reduzida de modo dependente da concentração, sendo a maior inibição (38,16%) observada com 250 mg L⁻¹. O AMC não afetou significativamente a biomassa seca do caule, exceto por uma redução de 31,04% na concentração de 50 mg L⁻¹. A área foliar também foi expressivamente reduzida, apresentando reduções de 22,31%, 38,93% e 56,29% com 50, 100 e 250 mg L⁻¹, respectivamente. As biomassas fresca e seca das folhas foram reduzidas em média em 90,78% e 57,16%, independentemente da concentração de AMC utilizada. O tratamento com AMC influenciou negativamente a viabilidade das raízes de soja. Foram observados aumentos de 313,51% e 255,52% na liberação do corante NBT a partir das raízes das plantas tratadas com 100 e 250 mg L⁻¹ de AMC. Nossos dados também revelaram que o AMC adicionado exogenamente foi prontamente incorporado na parede celular de raízes de soja. Isso deve ter levado ao aumento no número de ligações cruzadas entre os componentes da parede celular, com consequente enrijecimento da parede celular e inibição do crescimento das plantas de soja.

Conclusões

O AMC influenciou negativamente o crescimento e a viabilidade das raízes de plantas soja. O AMC adicionado exogenamente foi prontamente incorporado na parede celular de raízes de soja, sendo esta incorporação responsável pela inibição de crescimento.

Agradecimentos

Agradeço a todos envolvidos diretamente neste trabalho, ao orientador Prof. Dr. Rogério Marchiosi e a todos os integrantes do Laboratório de Bioquímica de Plantas que me ajudaram na realização dos experimentos, principalmente a Stephane Haracenko.

Referências

RIOS, F. A. et al. Potencial alelopático de diferentes palhadas na emergência de *Euphorbia heterophylla*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO & COTTON, 8., 2011, São Paulo. p. 1574–1579.

SILVA, da H.A. Atividade da fração hidrometanólica de milho sobre o crescimento e alguns aspectos do metabolismo de amendoim-bravo, Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.