

ANÁLISE DO POTENCIAL HERBICIDA DE UM INIBIDOR (SBC) DA ENZIMA O-ACETILSERINA(TIOL) LIASE

Rafaela Andreza de Souza Soares (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Rogério Marchiosi (Orientador), e-mail: rmarchiosi@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Maringá, PR.

Botânica/Fisiologia Vegetal

Palavras-chave: assimilação do enxofre, sítios de ação herbicida, desenvolvimento de herbicidas

Resumo:

O aumento da produtividade agrícola deve-se a habilidade de controlar, de forma eficiente, as plantas daninhas em conjunto com o uso de fertilizantes sintéticos. O uso intensivo ou indiscriminado de um dado herbicida sobre uma população tem acarretado o desenvolvimento de biótipos de plantas daninhas resistentes. Desta forma, a procura por novas moléculas ativas é uma necessidade eminente. Neste trabalho, avaliamos o potencial herbicida de um inibidor da enzima O-acetilserina(tiol) liase (SBC), previamente selecionado por ferramentas de bioinformática. Nas plantas, esta enzima catalisa a assimilação do sulfeto em cisteína, aminoácido doador de enxofre para a síntese de todos os compostos que contém este elemento. Inicialmente determinamos os efeitos do SBC sobre o crescimento inicial de plantas de milho e, em um segundo momento, sobre o conteúdo de cisteína de raízes. Nossos dados revelaram uma redução acentuada do comprimento e das biomassas fresca e seca de raízes de plantas de milho expostas ao SBC. Também verificamos redução dos níveis de cisteína, demonstrando a capacidade do SBC de inibir a enzima O-acetilserina(tiol) liase. Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que o SBC possui potencial para ser usado como futuro herbicida.

Introdução

As plantas daninhas representam um dos principais empecilhos à produção agrícola, pois competem com as culturas por recursos naturais como luz, água, nutrientes e espaço (Vargas e Roman, 2006). Segundo o *Herbicide Resistance Action Committee (HRAC)*, os herbicidas atuais podem afetar os processos luminosos, o metabolismo celular ou o crescimento/divisão celular.

O enxofre é um macronutriente vital. As plantas são capazes de captar e reduzir as formas inorgânicas do enxofre e assimilá-lo em uma variedade de compostos orgânicos. As plantas são capazes de reduzir sulfato em uma via conhecida como via de assimilação do sulfato, cujo produto final é a cisteína. A incorporação do enxofre reduzido neste aminoácido é um passo central na assimilação do enxofre inorgânico. Em plantas, assim como em bactérias, a reação é catalisada pela O-

acetilserina(tiol) liase (OAS-TL) ou cisteína sintase, e requer dois substratos: (1) sulfeto livre, fornecido pela via de redução do sulfato, e (2) O-acetilserina (OAS), um derivado ativado da serina que é metabolicamente usado apenas na síntese da cisteína (Kredich, 1996; Hell et al., 2002; Hell, 2003).

Devido a importância da OAS-TL para a sobrevivência das plantas, neste trabalho nós avaliamos o potencial herbicida do SBC (um inibidor da OAS-TL previamente selecionado através de ferramentas de bioinformática) sobre plantas de milho.

Materiais e métodos

Sementes de milho (cv. IPR-164) foram sanitizadas com HClO 2%, distribuídas em papel Germitest umedecido e germinadas por 72 h a 25°C. Então, 25 plântulas viáveis foram selecionadas e transferidas para recipientes contendo 200 mL de solução nutritiva contendo, ou não, SBC (125–1000 µM). Os recipientes foram mantidos em câmara de germinação por 24–96 h a 25°C, fotoperíodo 12h/12h (claro/escuro) e irradiância de 300 µmols fótons m⁻² s⁻¹. O comprimento e a biomassa fresca foram determinados após o período de incubação. A biomassa seca foi mensurada após desidratação dos tecidos em estufa a 70°C por 72 h. Os teores de cisteína foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) após derivatização das amostras com bromobimane. Acetato de potássio 100 mM (pH 5,5) e metanol a 25% foi utilizado como fase móvel a um fluxo de 1 mL min⁻¹. Uma coluna de fase reversa (CLC-ODS; 250 x 4,6 mm, 5 µm) foi usada para a separação. O tempo de corrida cromatográfico foi de 50 min.

Resultados e Discussão

Nossos dados revelaram um efeito inibitório promovido pelo SBC no comprimento das raízes (figura 1). Após 24 h de exposição ao SBC, uma redução média de 34% foi observada sobre o comprimento das raízes, em comparação com o controle. A redução do comprimento das raízes foi ainda mais evidente após 48 h de exposição ao SBC, chegando a 56% na concentração de 1000 µM. Máxima atividade inibitória foi observada já no tempo de 72 h e 750 µM de SBC, chegando a 63%. Reduções de 71% e 68% foram observadas no comprimento das raízes após tratamento das plântulas com 750 e 1000 µM de SBC, respectivamente, por 96 h.

O SBC (125–1000 µM) reduziu, em média, 15% a biomassa fresca (figura 2A) das raízes após 24 h de exposição. Após 48 h de tratamento, reduções na biomassa fresca foram observadas apenas com 750 (29%) e 1000 µM (24%) de SBC. No tempo de 72 h, o efeito inibitório sobre a biomassa fresca foi dose dependente, alcançando 45% com 750 e 1000 µM de SBC. A maior redução na biomassa fresca das raízes foi observada nos tratamentos com 750 (62%) e 1000 (61%) de SBC após 96 h de exposição.

Na biomassa seca (figura 2B) o SBC apresentou padrão inibitório semelhante ao verificado para comprimento e biomassa fresca de raízes. Plântulas de milho tratadas com 250–750 µM de SBC apresentaram biomassa seca 21% menor, em média, do que plântulas controle. O efeito inibitório foi ainda mais evidente com exposições mais prolongadas ao SBC. Por exemplo, reduções de até 56% foram verificadas na biomassa seca após tratamento das plântulas com 750 µM por 96 h.

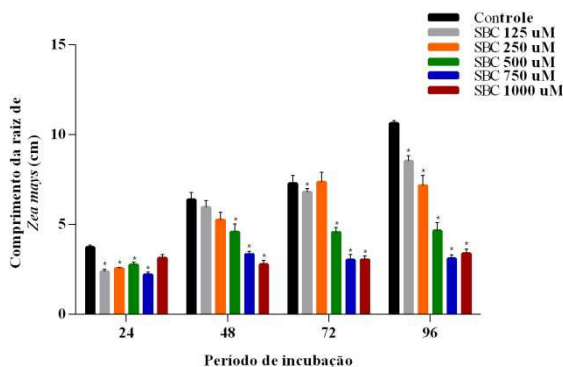


Figura 1 – Efeitos do SBC sobre o comprimento de raízes de plântulas de milho.

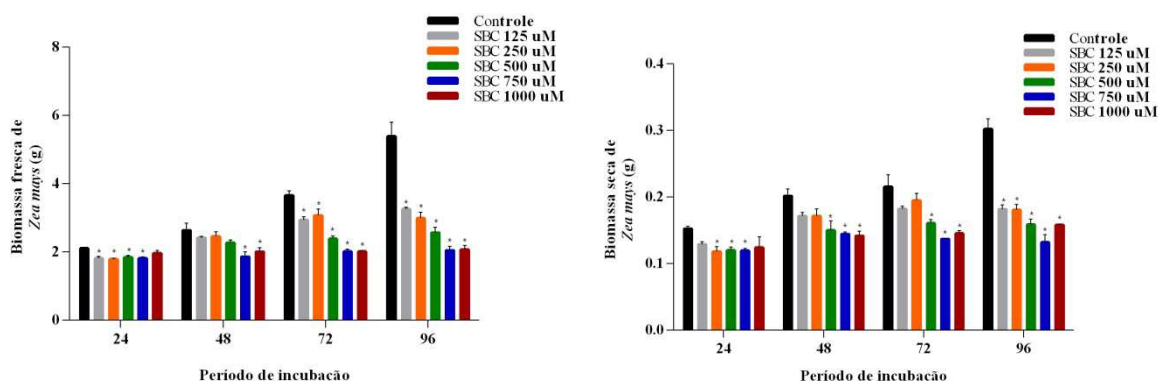


Figura 2 – Efeitos do SBC sobre (A) a biomassa fresca e (B) a biomassa seca de raízes de plântulas de milho.

A curva padrão de cisteína demonstrou relação linear satisfatória entre as concentrações de cisteína utilizadas e as áreas dos picos cromatográficos. Também é importante destacar que, por se tratar de detecção por fluorescência, o método é muito sensível, permitindo a quantificação de cisteína em amostras que apresentam baixas concentrações deste aminoácido. A determinação do teor de cisteína foi feita em raízes de milho tratadas ou não com SBC 750 μ M. Houve diminuição significativa na quantidade de cisteína livre no tratamento em relação ao controle, demonstrando inibição da enzima OAS-TL pelo SBC.

Tabela 1 – Determinação da cisteína em raízes de milho tratados ou não com SBC 750 μ M por 72 h de incubação.

Parâmetro	Controle	SBC 750 μ M
Área	374.836 \pm 19.918	325.017* \pm 10.251

Médias* ($N = 5 \pm$ EPM) significância ($p \leq 0,10$) comparado ao controle (Teste t não-paramétrico).

Nossos dados sugerem que a redução dos níveis de cisteína podem ter diminuído a síntese de proteínas e, dessa forma, o desenvolvimento das plântulas. Além disso, o

enxofre é elemento essencial para a síntese de coenzima A (Romero, 2014), que possui importante papel na obtenção de energia metabólica, principalmente em plântulas que não realizam fotossíntese (Fulda, 2004).

As análises de microscopia propostas no projeto não foram realizadas devido ao tempo dispendido na padronização do método cromatográfico para quantificação de cisteína.

Conclusões

Com base nos dados é possível afirmar que o SBC inibe a atividade da enzima OAS-TL em raízes de milho, reduzindo os níveis de cisteína livre e, conseqüentemente, o crescimento das plântulas. O SBC possui potencial para ser utilizado como futuro herbicida.

Agradecimentos

Agradeço imensamente meu orientador Rogério Marchiosi, à Marcela de Paiva Foletto-Felipe pela ajuda e à Fundação Araucária e CNPq pela bolsa de estudos concedida.

Referências

FULDA, M. et al. Peroxisomal Acyl-CoA Synthetase Activity Is Essential for Seedling Development in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**. v. 16, p. 394-405, 2004.

HELL, R. et al. Molecular and biochemical analysis of the enzymes of cysteine biosynthesis in the plant *Arabidopsis thaliana*. **Amino Acids**, v. 22, p. 245–257, 2002.

KREDICH, N. M.; TOMKINS, G. M. The enzymic synthesis of L-cysteine in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 241, p. 4955-4965, 1996.

ROMERO, L. C. et al. Cysteine and Cysteine-Related Signaling Pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant**, v.7, n.2. p. 264-276, 2014.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. Resistência de plantas daninhas a herbicidas: conceitos, origem e evolução. Passo Fundo: **Embrapa Trigo**, 2006. p. 22. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 58). Disponível em:
<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do58.htm> Acesso em: 02 jul. 2019.