

EFEITOS DA FLORETINA SOBRE O CRESCIMENTO E FOTOSSÍNTESE DE PLANTAS DE MILHO

Alissa Borges de Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Isabela de Carvalho Contesoto, Larissa Fonseca Tomazini, Luiz Henryque Escher Grizza, Renato Polimeni Constantin, Rogério Marchiosi (Orientador). E-mail: rmarchiosi@uem.br.

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

Ciências biológicas /Bioquímica

Palavras-chave: enzima; herbicida; bioquímica.

RESUMO

Sendo a enzima piruvato ortofosfato dicinase (PPDK) essencial para o metabolismo de plantas C₄ e presente em plantas daninhas, tem sido considerada como um alvo para o desenvolvimento de novos herbicidas. Em estudos anteriores, a floretina foi identificada como uma substância inibidora da atividade da PPDK de milho *in vitro*. Dessa forma, no presente trabalho, foram monitorados os efeitos da floretina sobre o crescimento de plantas de milho e atividade da enzima PPDK, com posterior avaliação dos impactos sobre as trocas gasosas. Para isso, plantas de milho foram cultivadas em sistema hidropônico na ausência ou presença de floretina (500 µM) por 21 dias. De modo geral, a floretina reduziu o crescimento das raízes em torno de 30%, mas não afetou significativamente o crescimento dos caules. Experimentos *in vitro* revelaram uma inibição dose-dependente da PPDK pela floretina, alcançando um grau de inibição de 75% a 500 µM. A floretina também reduziu drasticamente a taxa de assimilação de CO₂ nas curvas de respostas à luz e ao CO₂, o que deve estar relacionado com a capacidade da floretina afetar a atividade da PPDK *in vivo*. Também foram verificadas reduções em parâmetros da fluorescência da clorofila a. Em conjunto, os resultados obtidos revelam que a ação inibitória da floretina sobre a enzima PPDK foi capaz de inibir o crescimento de plantas de milho e a performance fotossintética das plantas.

INTRODUÇÃO

As plantas daninhas constituem um dos principais empecilhos à produção agrícola, podendo ocasionar perdas de até 80%. Apesar do sucesso de controle das plantas daninhas obtido com os herbicidas, a pequena diversidade de herbicidas utilizando um reduzido número de mecanismos de ação está aumentando a ocorrência de resistência aos herbicidas (LEIN, W., 2004). As piores plantas daninhas do mundo utilizam a via fotossintética C₄. Logo, as enzimas envolvidas na fotossíntese C₄ representam um alvo atrativo para o desenvolvimento de herbicidas seletivos para estas plantas (DOYLE, J.R., 2005). A enzima piruvato ortofosfato dicinase (PPDK) tem um papel de destaque na via fotossintética C₄, sendo responsável pela

conversão do piruvato em fosfoenolpiruvato, o substrato para a fixação primária do CO₂. Dessa forma, compostos que inibam especificamente a PPDK podem funcionar como um herbicida eficiente e seletivo. Com o objetivo de explorar esse potencial, neste trabalho foram monitorados os efeitos de uma substância inibidora da PPDK sobre o crescimento e fotossíntese de plantas de milho.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal e procedimentos gerais

Sementes de milho (*Zea mays* L.), cv. IPR-164, foram sanitizadas com hipoclorito de sódio, lavadas com água deionizada e postas a germinar entre duas folhas de papel Germitest[®] por 72 h. Plântulas uniformes foram transferidas para sistema de cultivo hidropônico contendo solução nutritiva (pH 6,0). Os sistemas contendo as plântulas foram mantidos por 21 dias em sala de crescimento com temperatura de 25°C, fotoperíodo de 12h/12h (claro/escuro) e uma irradiância de 300 µmol fótons m⁻² s⁻¹. Solução nutritiva contendo floretina foi adicionada ao sistema experimental no 14º dia de cultivo, sendo substituída a cada 48 h. No 21º dia de cultivo, as plantas foram determinados os comprimentos e as biomassas fresca e seca de raízes, caules e folhas.

Análise combinada dos parâmetros de trocas gasosas

Curvas de resposta à luz e ao CO₂, além de análises de fluorescência da clorofila *a*, foram realizadas utilizando um sistema portátil de fotossíntese com fluorômetro acoplado Li-6800-F2 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA), conforme descrito por (Foletto-Felipe, 2021). O teor de clorofila foi estimado usando um clorofilômetro (SPAD-502, Minolta).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados indicaram que a floretina reduziu o crescimento das raízes, em média, em 27,7%, quando comparado com o controle. Entretanto, o crescimento dos caules não foi afetado pela floretina (tabela 1).

Relevantemente, foram verificadas reduções notáveis nos parâmetros de trocas gasosas (Fig. 1). A figura 1A mostra uma redução acentuada na curva de resposta à luz em plantas tratadas com floretina, quando comparado com plantas controle. A assimilação do CO₂ foi massivamente reduzida, especialmente sob altas intensidades luminosas. Em adição, o mesmo comportamento foi notado em curvas de respostas ao CO₂ (Fig. 1B), isto é, redução da assimilação sob altas concentrações de CO₂. Também foram verificadas reduções na condutância estomática, transpiração e concentração intercelular de CO₂. Esse perfil fisiológico sugere limitações fotossintéticas, muito possivelmente acarretada pela inibição da enzima PPDK, a qual possui papel crucial na regeneração do fosfoenolpiruvato necessário à assimilação primária do CO₂ em plantas C4.

Tabela 1. Efeitos da floretina sobre o crescimento de plantas de milho.

Floretina (μM)	Raízes		
	Comprimento (cm)	Biomassa fresca (g)	Biomassa seca (g)
0	38,08 \pm 0,888	1,702 \pm 0,1177	0,2344 \pm 0,023
500	29,13 \pm 1,313*	1,207 \pm 0,0705*	0,1624 \pm 0,013*
	Caules		
	Comprimento (cm)	Biomassa fresca (g)	Biomassa seca (g)
0	47,55 \pm 1,338	10,22 \pm 0,428	1,089 \pm 0,053
500	47,92 \pm 1,804	9,250 \pm 0,821	1,044 \pm 0,096

Valores médios \pm EPM (n = 3 a 10) marcados com asterisco (*) diferem do controle de acordo com o teste de comparação múltipla de Dunnett (*One-way ANOVA*) com nível de significância 5% ($P \leq 0,05$).

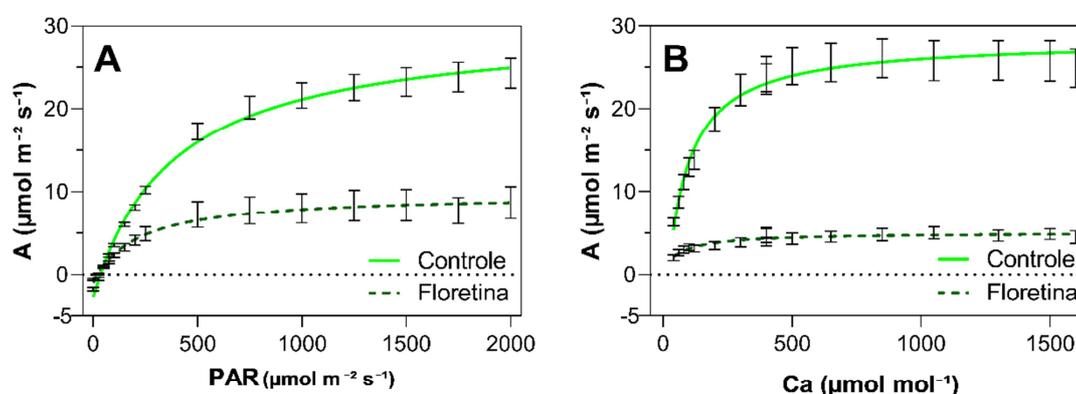


Figura 1. Resposta da assimilação à luz (A) e ao CO_2 (B) de plantas de milho controle ou cultivadas na presença de floretina ($500 \mu\text{M}$) por 14 dias. Para a realização das curvas de resposta à luz a concentração de CO_2 foi ajustada para $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$. Para as curvas de resposta ao CO_2 a densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) foi ajustada em $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

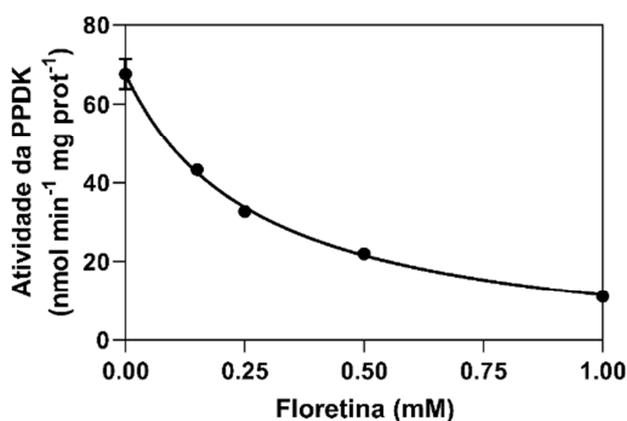


Figura 2. Efeito inibitório da floretina sobre a atividade da piruvato ortofosfato dicinase (PPDK) de milho. A enzima PPDK foi expressa heterologicamente em *Escherichia coli* e purificada em uma coluna de alta afinidade pelo níquel.

Em conjunto, esses dados sugerem que a floretina pode estar inibindo a atividade da PPDK *in vivo*, levando a limitações na capacidade das plantas de assimilarem o CO₂. Isto está de acordo com a menor incorporação de biomassa nas plantas tratadas com floretina. De fato, experimentos de cinética enzimática *in vitro* confirmaram que a floretina inibe a atividade da PPDK de milho de forma dose-dependente (Fig. 2).

CONCLUSÕES

A floretina reduziu o crescimento e a fotossíntese de plantas de milho através da inibição da enzima PPDK.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá que possibilitou a realização do projeto, assim como a Fundação Araucária pelo apoio financeiro. Ao orientador Dr. Rogério Marchiosi e aos demais coautores e pesquisadores do Laboratório de Bioquímica de Plantas (BIOPLAN).

REFERÊNCIAS

DOYLE, J. R. *et al.* A rapid screening method to detect specific inhibitors of pyruvate orthophosphate dikinase as leads for C4 plant-selective herbicides. **J. Biomol. Screen.** 10, 67–75 (2005).

FOLETTTO-FELIPE, Marcela de Paiva. **O-Acetilserina(tiol) liase: estudos in silico, in vitro e in vivo.** 2021. (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PBC), Área de concentração em Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, 2021.

LEIN, W. *et al.* Target-based discovery of novel herbicides. **Current Opinion in Plant Biology** vol. 7 219–225 (2004).

MAROCO, J. P. *et al.* Oxygen requirement and inhibition of C4 photosynthesis. **Plant Physiol.** 116, 823–832 (1998).

MOUALEU-NGANGUE, D. P., CHEN, T. W. & STUTZELI, H. A new method to estimate photosynthetic parameters through net assimilation rate–intercellular space CO₂ concentration (A–Ci) curve and chlorophyll fluorescence measurements. **New Phytol.** 213, 1543–1554 (2017).