

Efeito de diferentes fotoperíodos em genótipo de cana-de-açúcar (*saccharum officinarum*) para acúmulo de Protoporfirina IX com uso de herbicidas inibidores da Protox, precursores e antioxidantes.

Barberis, L.R.M.¹ ; Trindade, M.L.B.¹ ; Velini, E.D.¹

¹ UNESP – Faculdade de Ciências Agrônômicas - Botucatu/SP

RESUMO

O objetivo do experimento foi avaliar as melhores condições de fotoperíodo, em genótipo de cana-de-açúcar selecionado para acúmulo de Protoporfirina IX (Proto IX) com o uso de inibidores da Protox, precursores e antioxidantes. O experimento foi montado em câmara climatizada, sendo aplicados 7 tratamentos: 1.Oxyfluorfen; 2.Oxyfluorfen + Glutamato Monossódico + Vitamina C e E; 3.Carfentrazone; 4.Carfentrazone + Glutamato Monossódico + Vitamina C e E; 5.Testemunha + Ácido levulênico; 6.Testemunha + Glutamato Monossódico + Vitamina C e E, 7.Testemunha sem aplicação, em 1 genótipo de cana-de-açúcar, SP903414; as condições de fotoperíodo foram desenvolvidas para: claro, escuro, 1h de luz / 3h de escuro, 0:15h de luz / 3:45h de escuro, 0:05h de luz / 3:55h de escuro, dispostos em esquema fatorial 7 x 5, com 4 repetições. As repetições se constituíram de folhas (20cm) destacadas do genótipo, sendo as mesmas pulverizadas em simulador estacionário, tendo a umidade da folha repostada a cada 24horas. Foram realizadas avaliações visuais de controle 2DAA, e no fim do estudo determinações analíticas, via extração da biomassa fresca, verificando os teores de protoporfirina IX por cromatografia líquida. Os resultados mostraram que foram detectados aumentos significativos nas concentrações de proto IX para a condição de fotoperíodo escuro, no tratamento 4, indicando que o acúmulo de protoporfirina IX foi preservado pela não formação do oxigênio singleto produzido pela luz.

PALAVRAS CHAVES: cana-de-açúcar, fotoperíodo, cromatografia

ABSTRACT: Effect of different photoperiods in genotype of sugarcane (*saccharum officinarum*) for accumulation of Protoporfi IX com use of herbicides gives inibidores Protox, precursors and antioxidants.

The objective of the experiment was to evaluate as best conditions of photoperiod, in genotype sugarcane of selected for accumulation of Protoporfirina IX (Proto IX) with use of

inhibitors gives Protox, precursors and antioxidants. The experiment was mounted em heated chamber, being applied treatments 7: 1.Oxyfluorfen; 2.Oxyfluorfen Monossodium Glutamate + + Vitamin C and E; 3.Carfentrazone; 4.Carfentrazone Monossodium Glutamate + Vitamin C and E; 5.Witness + Acid Levulenic ; 6.Witness Monossodium Glutamate + Vitamin C and E, 7.Witness without spraying, in 1 genotype of sugarcane, SP903414; the conditions of photoperiod were developed for: light, dark , 1h light /-3h dark, 0:15 h light / h dark 3:45, 0:05 h light / h 3:55 dark, arranged in scheme factorial 7 x 5, with 4 replications. As replications were formed of leaves (20cm) deployed in each genotype, being as same pulverized simulator estacionário, having to give humidity leaf response each 24horas, and sprayed them with the appropriate treatments mentioned in stationary simulator. Evaluations were carried out visual control 2DAA, and at the end of the study, analytical determinations by extraction of fresh biomass, checking the contents of protoporphyrin IX by high performance liquid chromatography. The results showed that significant increases were detected in the concentrations of proto IX for the condition of dark photoperiod, in the treatment 4, indicating that the accumulation of protoporfirina IX was preserved by the non formation of the oxygen singletproducedbythelight.

KEYWORDS: sugarcane, photoperiod, cromatograph

INTRODUÇÃO

A síntese de porfirinas é fundamental para a produção de clorofilas em plantas e heme em plantas e animais. As principais diferenças referem-se à alimentação da rota, feita a partir do glutamato em plantas e a partir de glicina e Succinil CoA em humanos. A partir do ácido 5-aminolevulênico, as enzimas envolvidas são praticamente as mesmas em todas as transformações necessárias para a produção dos tetrapirróis.

A produção e acúmulo de porfirinas em plantas tem sido bastante estudada em função de estes compostos serem precursores das clorofilas e do heme. Adicionalmente, a enzima protoporfirinogênio IX oxidase (PPO ou PROTOX) constitui-se no sítio da ação dos herbicidas difenil-éteres (oxyfluorfen, lactofen, fomesafen), oxadiazolinas (oxadiazon e oxadiargil) e ariltriazolinonas (sulfentrazone e carfentrazone). Este mecanismo de ação dos herbicidas e os compostos que nele atuam, são apresentados em detalhes por alguns autores, Dodge (1992), Hess (1993) e Weller (2002) as principais informações são apresentadas a seguir. A inibição da síntese da protoporfirina IX gera um intrigante acúmulo

deste pigmento nas plantas tratadas com os herbicidas deste grupo. Em plantas, a protoporfirina IX também apresenta grande reatividade produzindo, na presença de luz, Oxigênio singleto. A protoporfirina IX é produzida nos cloroplastos, pela ação da Protoporfirinogênio IX (Protox), que tem o protoporfirinogênio IX como substrato. Como a regulação da rota depende prioritariamente da concentração de protoporfirina IX e seus derivados no interior dos cloroplastos, a paralisação da atividade desta enzima gera um grande acúmulo de protoporfirinogênio IX que extravasa para o citosol. No citosol, o protoporfirinogênio IX é convertido, de modo não enzimático, a protoporfirina IX, que é acumulada em grandes concentrações.

A ação e codificação da Protox, que está presente e atua nos cloroplastos (produzindo clorofila) e mitocôndrias (produzindo heme) é inteiramente codificada no núcleo (Watanabe *et al.* 2001). Os autores também estudaram e demonstraram a existência da translocação intracelular do Protoporfirinogênio e da Protoporfirina IX. Os resultados indicam que os excessos destes compostos presentes nos cloroplastos e citosol, em decorrência da ação sub-letal de herbicidas (aplicados em baixas doses), podem ser utilizados nas mitocôndrias para a produção de grupos heme (Watanabe *et al.* 2001).

Porfirinas são importantes tanto em plantas quanto em humanos. As principais etapas da rota de produção destes compostos também são similares em animais e vegetais. Na presença de luz com comprimentos de onda adequados, as porfirinas fluorescem e induzem a formação de Oxigênio singleto, tornando-se compostos fototóxicos com capacidade de promover a oxidação de lipídeos, a ruptura de membranas e a morte celular. Estas duas características, associadas às particularidades bioquímicas das células neoplásicas, têm levado ao maior acúmulo e atividade de porfirinas nestas, permitindo o desenvolvimento de sistemas seletivos para o diagnóstico e tratamento de neoplasias de vários tipos e em diferentes órgãos de humanos.

Como a produção de Oxigênio singleto depende obrigatoriamente da presença de luz em comprimentos de ondas adequados, o fornecimento ou indução do acúmulo de porfirinas tem sido amplamente utilizado para que se obtenha a fotossensibilização necessária ao uso da Terapia Fotodinâmica (TFD). Também há a possibilidade de fornecer tanto a luz quanto o agente fotossensibilizante de forma tópica aumentando a seletividade da técnica.

Este trabalho tem como objetivo selecionar fotoperíodos adequados para que o acúmulo de protoporfirina IX ocorra sem perda de tecidos e curto espaço de tempo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia - NUPAM da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, campus de Botucatu/SP. A aplicação dos tratamentos foi feita em pulverizador experimental regulado para um consumo de calda de 1000 l/ha, em pedaços de 20 cm de folhas, dispostas horizontalmente em bandejas plásticas. Após esta etapa, as folhas foram inseridas em copos plásticos com algodão umedecido no fundo e, em seguida, colocadas em cinco sistemas de controle do fotoperíodo que permitiram aplicar às plantas, as condições: claro, escuro, 1h de luz / 3h de escuro, 0:15h de luz / 3:45h de escuro, 0:05h de luz / 3:55h de escuro, sendo, após isso alocados em câmara climatizada a 25°C, 70% de umidade relativa durante 15 dias.

Foram adotados sete tratamentos: 1. Oxyfluorfen (6ml p.c./l); 2. Oxyfluorfen (6ml p.c./l) + Glutamato Monossódico (10g/L) + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L), 3. Carfentrazone (0,250ml p.c./l); 4. Carfentrazone (0,250ml p.c./l) + Glutamato Monossódico (10g/L) + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L); 5. Testemunha + Ácido levulênico (0,1% imersão das folhas 1 hora antes da pulverização); 6. Testemunha + Glutamato Monossódico (10g/L) + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L); 7. Testemunha; sendo aplicados em 1 genótipo de cana-de-açúcar, SP903414, escolhido por se comportar como acumulador de protoporfirina IX em ensaios anteriores.

Portanto, o delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado por esquema fatorial 7 x 5, com quatro repetições (cada repetição constituiu-se de um pedaço de 20cm de folha de cana). Os sintomas de acúmulo de porfirinas foram avaliados aos 5 DAA dos tratamentos. A avaliação consistiu na determinação da porcentagem da superfície com a cor característica da porfirina (marrom-avermelhada) através de notas visuais de controle, baseadas em uma escala percentual, onde “0” representa nenhum sintoma e “100” sintomas por toda superfície da folha (tabela 2). Após a avaliação, as folhas foram coletadas e acondicionadas em freezer à -20°C.

A parte laboratorial envolveu duas etapas: extração e análise do material. Para a extração foi utilizada 0,2g de matéria fresca de cana congelada, moída em Turrax com 10 ml de metanol por 5 minutos, sendo posteriormente, filtrada em filtro tipo membrana Millex (Millipore) de 0,2µ. As análises foram realizadas em CLAE-EM (cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massa tipo quadropolo), marca Shimadzu, modelo 2010EV, que apresenta resposta uniforme a grupos de compostos com

características similares, mantendo uma relação aproximadamente constante entre a intensidade de sinal (área do pico cromatográfico) e a concentração dos diferentes compostos expressas em unidades molares.

Para as análises, as condições do CLAE estabelecidas foram os seguintes gradientes dos solventes (metanol, água e metanol/0,1 N de NH₄OH e acetonitrila 9/1 v/v) na fase móvel. A coluna empregada foi uma pré-coluna de C₁₈ de 5 x 2mm, marca Shimadzu com volume de injeção de 5µl. O tempo total de corrida foi de 15 minutos e o tempo de retenção da protoporfirina IX foi de 7,1 minutos. Foram estabelecidos 6 pontos para a curva de calibração sendo empregada a quantificação em diferentes concentrações do padrão de protoporfirina IX. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e comparação de médias com uso do teste Tukey no nível de 5% de probabilidade, para tanto, os dados foram transformados devido aos resultados apresentarem grande amplitude dentro das variáveis, sendo a análise de interação realizada no desdobramento dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o acúmulo de Protoporfirina IX, ocorreu influência do fotoperíodo para os tratamentos 4, 6 e 7, sendo os maiores teores significativos observados no escuro (tabela 1). Este resultado é explicado pela instabilidade e alta capacidade da Proto IX produzir Oxigênio singleto na presença de luz. No escuro, tanto a Proto IX quanto os tecidos das plantas foram preservados.

Os teores de Proto IX foram bastante variáveis nos tecidos de acordo com os sintomas encontrados. Houve influência do fotoperíodo para os tratamentos 1, 2 e 7, sendo os sintomas mais significativos encontrados em 1 hora de luz e claro (tabela 2). Mesmo nos tratamentos com maior produção de porfirinas, parte dos tecidos se manteve sem a presença de sintomas que indicassem a presença destes compostos.

Um sensível acúmulo de Proto IX pôde ser detectado em fatias de cotilédones de pepino e em toda planta de *Lemma pausicostata* dentro de trinta minutos de exposição ao herbicida de difenil ether (Becerril and Duke 1989a. Matsumoto and Duke 1990). Esta acumulação pode ser monitorada na escuridão sem danos fotodinâmicos nas células das plantas ou fotodegradação da Proto IX, relativo a um pigmento fotolábil. Em plantas de *L. pausicostata*, o aumento da acumulação de Proto IX, finalizou dentro de duas horas no escuro; entretanto, em cotilédones de pepino o acúmulo continuou por muito mais tempo. Em

outras plantas de pepino o herbicida causou acumulação muito baixa de Proto IX ou ausente no escuro quando comparado com ao acúmulo no claro (Mastringe e Sealla 1988b, Mayasich et al. 1990, Nandihalli et al 1991).

De uma forma geral, os aumentos nas concentrações em $\mu\text{g/g}$ de protoporfirina IX, no genótipo SP903414 submetido ao tratamento 4, indicam que podem ser utilizadas como fontes acumuladoras sem a presença luz em curto período de exposição.

LITERATURA CITADA:

Becerril, M.; Duke, M.V.; Nandinalli, U.B.; Matsumoto, H.; Duke, S.O. Light control of porphyrin accumulation in acifluorfen-methyl. *Physiol. Plant.* (1992) 86, 6-16.

Dodge, A D. (1992). Photosynthesis. In: Ralph C. Kikwood. Target Sites for Herbicide Action. University of Stranthclyde, Glasgow, United Kingdom. p. 1-27

Hess, F.D. (1993) Herbicide effects on plant structure, physiology and biochemistry. In: Altman, J. Pesticide Interactions in Crop Production Beneficial and Deleterious Effects. CRC Press, London. 579p.

Pornpon, T.; Matsumoto, H.; Usui, K.; Ishizuka, K. Pesticide Biochemistry and physiology (1994) 50,107-114.

Rodrigues, B.N.; Almeida, F.S. (2005). Guia de Herbicidas. 5a Ed. Londrina. 592p.

Sherman, D.T.; Becerril, J.M.; Matsumoto, H.; Duke, M.V.; Jacobs, J.M.; Jacobs, N.J.; Duke, S.O. Physiological basis for differential sensitivities of plant species to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Plant Physiol.* (1973) 51, 130-145.

Watanabe, N.; Fang-Sik Che; Iwano, M.; Takayama, S.; Yoshida, S.; Isogai, A. (2001). Dual targeting of spinach Protoporphyrinogen Oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of in-frame initiation codons. *The Journal of Biological Chemistry.*, v.273, n.23, p.20447-81.

Weller, S. (2002). Photosystem II Inhibitors. In: Herbicide Action Course. Purdue University, West Lafayette. p. 127-80.

Tabela 1: Médias transformadas ($\sqrt{\quad}$) das concentrações de porfirinas em folhas de cana, em função de diferentes condições de fotoperíodo. FCA/UNESP/Botucatu – 2008.

Fotoperíodos	Tratamentos						
	1	2	3	4	5	6	7
1 hora de luz	2,307209 Aa	2,149830 Aa	2,967978 Aa	2,430501 Ba	1,821367 Aa	3,036618 Aa	2,914006 ABa
15 min. de luz	2,078689 Aa	2,745356 Aa	2,580331 Aa	2,265515 Ba	3,076739 Aa	2,351680 Aa	3,158059 Aa
5 min. de luz	2,275764 Aa	2,393847 Aa	2,491393 Aa	3,092639 Ba	2,078689 Aa	1,609476 Aa	2,228519 ABa
Claro	2,412023 Aa	2,354832Aa	2,552285 Aa	2,372629 Ba	2,687086 Aa	3,092639 Aa	1,824045 ABa
Escuro	2,228519 Abc	3,048351 Abc	1,816497 Abc	4,838275 Aab	3,203051 Abc	1,910684 Abc	1,520159 Cc
F (fotoperíodo)	1,93 ns						
F (tratamentos)	0,82 ns						
F (foto x trat.)	2,89 **						
CV (%)	25,91						
D.M.S.	0,74						

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey (P<0,05).

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade; ns – não significativo.

Tabela 2. Médias transformadas ($\sqrt{x+1}$) dos sintomas de injúria de porfirina em genótipo de cana-de-açúcar SP903414 submetidos a diferentes tratamentos. FCA – Unesp – Botucatu/SP, 2008. **Erro! Vínculo não válido.** Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade; ns – não significativo.

