

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LUIZ HENRYQUE ESCHER GRIZZA

**RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS DE PLANTAS C3 e C4
AOS EFEITOS DE POTENCIAIS HERBICIDAS**

MARINGÁ

2024

LUIZ HENRYQUE ESCHER GRIZZA

**RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS DE PLANTAS C3 e C4
AOS EFEITOS DE POTENCIAIS HERBICIDAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho

Coorientador: Prof. Dr. Rogério Marchiosi

MARINGÁ

2024

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

G846r	Grizza, Luiz Respostas fotossintéticas de plantas C3 e C4 aos efeitos de potenciais herbicidas / Luiz Grizza. -- Maringá, PR, 2024. 87 f. : il. color., figs., tabs. Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho. Coorientador: Prof. Dr. Rogério Marchiosi. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2024. 1. Plantas daninhas. 2. Herbicidas. 3. Fenólicos. 4. Assimilação do enxofre. 5. Fotossíntese. I. Ferrarese-Filho, Osvaldo, orient. II. Marchiosi, Rogério, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). IV. Título. CDD 23.ed. 571.92
-------	--

LUIZ HENRYQUE ESCHER GRIZZA

“RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS DE PLANTAS C3 E C4 AOS
EFEITOS DE POTENCIAIS HERBICIDAS”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, sob apreciação da seguinte banca examinadora:

Aprovado em 28/08/2024



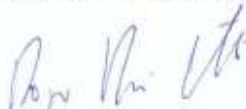
Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho
(presidente)



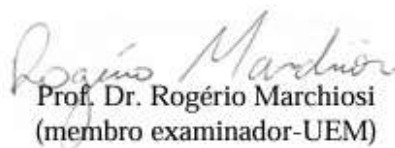
Profa. Dra. Marcela de Paiva Foletto Felipe
(membro examinador externo- UTFPR)



Profa. Dra. Ana Paula Ferro
(membro examinador-UEM)



Prof. Dr. Rodrigo Polimeni Constantin
(membro examinador-UEM)



Prof. Dr. Rogério Marchiosi
(membro examinador-UEM)

BIOGRAFIA

Luiz Henryque Escher Grizza nasceu em 27 de janeiro de 1992, na cidade de Curitiba, Paraná. Possu graduação em Agronomia, pela Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina (2017). Iniciou o mestrado no programa de pós-graduação em Agronomia (PGA – BIOPLAN) na Universidade Estadual de Maringá em 2018, concluindo-o em 2020. Ainda em 2020 ingressou no doutorado em Ciências Biológicas (PBC – BIOPLAN) também na Universidade Estadual de Maringá, cuja defesa da tese e conclusão do curso estão previstas para agosto de 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Amanda, minha esposa, com quem me casei no decorrer do doutorado, e que divide comigo os melhores e piores momentos dos últimos 12 anos.

Agradeço à Clarice, minha mãe, por ser minha bússola moral e suporte.

Agradeço aos meus orientadores Professor Osvaldo e Professor Rogério pelo conhecimento compartilhado, direcionamento e apoio tanto no mestrado quanto do doutorado.

Estendo meus agradecimentos aos colegas e amigos do BIOPLAN pela ajuda nos experimentos e companheirismo ao longo desses anos. De igual modo, agradeço à Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PBC) por possibilitarem a realização deste trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes) - código de financiamento 001.

APRESENTAÇÃO

Esta Tese é composta de dois capítulos, redigidos no formato de artigos científicos.

O capítulo I é um artigo original que descreve o impacto do ácido 3-cianobenzóico no crescimento e fotossíntese de plantas de milho cultivadas em hidroponia durante 14 dias. Este artigo foi intitulado “Assessment of 3-cyanobenzoic acid as a novel herbicide candidate: Effects on maize growth and photosynthesis”, e será submetido à revista *Pesticide Biochemistry and Physiology* (Fator de impacto 2024: 4.2; Qualis 2017-2020: A1).

O capítulo II é um artigo original que descreve como S-benzil-L-cisteína afeta o crescimento e a fotossíntese de duas culturas essenciais (soja e milho) e duas ervas daninhas (*Euphorbia heterophylla* e *Digitaria insularis*). Este artigo foi intitulado “S-Benzil-L-cisteína: um possível herbicida com efeitos diferenciais no crescimento e fotossíntese de plantas C3 e C4) será submetido à revista *International Journal of Molecular Sciences - Basel* (Fator de impacto 2024: 4.9; Qualis 2017-2020: A2).

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO – O controle de plantas daninhas na agricultura é essencial para garantir que os cultivos alcancem seu potencial máximo; entretanto, representa o maior custo em termos de produtos fitossanitários. Atualmente, esse controle é majoritariamente químico e, apesar de sua superioridade em relação a outros métodos, enfrenta desafios das espécies tolerantes. Esse cenário é agravado pela seleção de biótipos resistentes a certos princípios ativos e modos de ação. O aumento nos casos de resistência e o mercado multibilionário dos fitossanitários impulsionam a busca constante por novos alvos enzimáticos. Uma abordagem promissora é o uso da bioinformática, que permite a prospecção *in silico* de inibidores para enzimas cruciais no metabolismo das plantas. Para avaliar a eficácia desses inibidores *in vivo*, a análise de seus efeitos na fotossíntese é uma ferramenta valiosa, proporcionando uma avaliação direta do impacto no crescimento vegetal e no metabolismo de acúmulo de biomassa. Estudos recentes no BIOPLAN prospectaram inibidores para as enzimas piruvato O-fosfato diquinase (PPDK), envolvida no metabolismo C₄, e O-acetilserina (tiol) liase (OAS-TL), do metabolismo do enxofre. O inibidor ácido 3-cianobenzoico, inicialmente direcionado para a enzima PPDK, teve sua inibição a enzima descartada, mas apresentou resultados promissores na inibição de raízes de plântulas de *Zea mays*. Dado o papel conhecido dos ácidos fenólicos como aleloquímicos, sua ação na fotossíntese de *Z. mays* foi investigada. Já o inibidor S-benzil-L-cisteína (SBC), prospectado para a enzima OAS-TL, demonstrou eficácia ao reduzir a formação de L-cisteína em *Z. mays* e *Ipomoea grandifolia*. As diferenças observadas nos efeitos entre estas espécies despertam interesse para investigar os impactos da molécula em diferentes metabolismos, C₃ e C₄.

OBJETIVOS – O trabalho teve como objetivo, no Capítulo I, avaliar os efeitos do ácido 3-cianobenzoico sobre o crescimento, fotossíntese, trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* de *Z. mays*, cultivada hidropônicamente por 14 dias com diferentes concentrações do composto. No Capítulo II, o foco foi investigar os efeitos do SBC, um inibidor já estabelecido da enzima OAS-TL, na germinação, crescimento e fotossíntese de duas culturas agrícolas, *Glycine max* e *Z. mays*, e duas plantas daninhas, *Euphorbia heterophylla* e *Digitaria insularis*, avaliando a possível seletividade do inibidor entre plantas C₃ e C₄.

MATERIAL E MÉTODOS – No Capítulo I, plantas de milho foram cultivadas hidropônicamente por 14 dias na presença do ácido 3-cianobenzoico, sendo avaliados parâmetros biométricos, como comprimentos e biomassas, e fotossintéticos, como índice SPAD de clorofila, fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas, curvas de luz, CO₂ e transiente da clorofila *a*. No Capítulo II, foram realizadas análises de germinação e cultivo em substrato por 21 dias, nas quatro espécies expostas ao SBC, com avaliações biométricas e fotossintéticas, além da quantificação da atividade enzimática da OAS-TL e proteínas totais por *Bradford*, em folhas e raízes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO – O ácido 3-cianobenzoico comprometeu o crescimento das raízes e da parte aérea de *Z. mays*, com danos à fotossíntese observados em todos os parâmetros analisados, destacando-se a redução na assimilação líquida (*A*), na

captação e transmissão de energia luminosa, e no fechamento estomático. Esses resultados indicam que o ácido 3-cianobenzoico possui potencial para desenvolvimento como herbicida, além dos danos radiculares previamente relatados. Já o SBC apresentou maior impacto na espécie *D. insularis*, cuja germinação foi inibida, enquanto o crescimento das outras plantas foi afetado de forma semelhante, com inibições superiores a 90% em plantas daninhas nas concentrações mais altas. A fotossíntese foi prejudicada em todas as espécies, mas com variações nas causas do dano, refletindo as diferenças entre os metabolismos C3 e C4 na interação entre o metabolismo do enxofre e da assimilação de carbono. As análises de atividade da OAS-TL e do perfil proteico em folhas e raízes corroboram a existência de estratégias distintas entre os tipos de plantas para lidar com a inibição da enzima.

CONCLUSÃO – Tanto o ácido 3-cianobenzoico quanto o SBC foram eficazes em comprometer o crescimento e a fotossíntese das plantas avaliadas, evidenciando seu potencial para o desenvolvimento de herbicidas. O efeito diferencial do SBC entre plantas C3 e C4 indica a possibilidade de uso como herbicida seletivo e como ferramenta para investigar mecanismos da via de assimilação do enxofre em plantas C4, que ainda não são totalmente compreendidos.

PALAVRAS-CHAVE: Plantas daninhas, fenólicos, herbicidas, assimilação do enxofre, C3, C4.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION – Weed control in agriculture is essential to ensure crops reach their maximum potential, but it also represents the highest cost in terms of crop protection products. Currently, this control is predominantly chemical, and despite its superiority over other methods, it faces challenges with the tolerant species. This situation is exacerbated by the selection of biotypes that become resistant to certain active ingredients and modes of action. The increasing number of resistance cases and the multi-billion-dollar crop protection market drive the continuous search for new enzymatic targets. A promising approach is the use of bioinformatics, which enables in silico screening of inhibitors for enzymes that play a crucial role in plant metabolism. To assess the effectiveness of these inhibitors in vivo, analyzing their effects on photosynthesis is a valuable tool, providing a direct evaluation of the impact on plant growth and biomass accumulation metabolism. Recent studies at BIOPLAN have identified inhibitors for the enzymes pyruvate phosphate dikinase (PPDK), involved in C₄ metabolism, and O-acetylserine (thiol) lyase (OAS-TL), related to sulfur metabolism. The inhibitor 3-cyanobenzoic acid, initially targeted for PPDK, did not inhibit the enzyme but showed promising results in the roots of *Zea mays* seedlings. Given the known role of phenolic acids as potent allelochemicals, its effect on the photosynthesis of *Z. mays* was investigated. Meanwhile, S-benzyl-L-cysteine (SBC), an inhibitor screened for OAS-TL, proved effective in reducing L-cysteine formation in *Z. mays* and *Ipomoea grandifolia*. The differences observed in the effects between these species raise interest in investigating the molecule's impact on different metabolisms, C₃ and C₄.

OBJECTIVES – The aim of Chapter I was to evaluate the effects of 3-cyanobenzoic acid on the growth, photosynthesis, gas exchange, and chlorophyll *a* fluorescence of *Z. mays*, cultivated hydroponically for 14 days at different compound concentrations. Chapter II focused on investigating the effects of SBC, an established OAS-TL enzyme inhibitor, on the germination, growth, and photosynthesis of two crop species, *Glycine max* and *Z. mays*, and two weed species, *Euphorbia heterophylla* and *Digitaria insularis*, assessing the potential selectivity of the inhibitor between C₃ and C₄ plants.

MATERIALS AND METHODS – In Chapter I, maize plants were grown hydroponically for 14 days in the presence of 3-cyanobenzoic acid, and biometric parameters, such as length and biomass, as well as photosynthetic parameters, such as chlorophyll content (SPAD index), chlorophyll *a* fluorescence, gas exchange, light curves, CO₂ curves, and chlorophyll *a* transient, were analyzed. Chapter II involved germination tests and 21-day cultivation on a substrate for the four species exposed to SBC, with assessments of biometric and photosynthetic parameters, in addition to quantifying OAS-TL enzyme activity and total protein by Bradford assay in leaves and roots.

RESULTS AND DISCUSSION – 3-cyanobenzoic acid impaired root and shoot growth in *Z. mays*, with damage to photosynthesis observed across all parameters, particularly in net assimilation (A), light energy capture and transfer, and stomatal closure. These results indicate that 3-cyanobenzoic acid has potential for development as a herbicide, beyond the root damage previously reported. SBC had a greater impact on *D. insularis*, whose germination was inhibited, while growth was similarly affected across the other

species, with reductions exceeding 90% in weed species at the highest concentrations. Photosynthesis was impaired in all species but with different underlying causes, reflecting the distinct ways C3 and C4 plants manage sulfur metabolism and carbon assimilation. The analyses of OAS-TL activity and protein profiles in leaves and roots support the idea of different strategies among plant types to cope with enzyme inhibition.

CONCLUSION – Both 3-cyanobenzoic acid and SBC effectively impaired the growth and photosynthesis of the tested plants, indicating their potential for herbicide development. The differential response caused by SBC among C3 and C4 plants suggests the possibility of using it as a selective herbicide and as a tool to investigate mechanisms in the sulfur assimilation pathway in C4 plants, which are still not fully understood.

KEYWORDS: Weeds, phenolics, herbicides, sulfur assimilation, C3, C4.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	12
1. Introduction	16
2. Material and methods	18
2.1. Biometric measurements	18
2.2. SPAD index, chlorophyll a fluorescence and gas exchange	19
2.3. Net assimilation curves in response to changes in photosynthetically active radiation (A/PAR)	20
2.4. Transient responses of the chlorophyll a fluorescence (OJIP curve) and derived parameters (JIP test)	21
2.5. Statistical Analysis	22
3. Results	22
3.1. Effects on A/PAR curve and derived parameters	23
3.2. Effects on A/C _i curve and derived parameters	23
3.3. Effects on chlorophyll a transient curve and derived parameters	24
4. Discussion	24
5. Conclusions	28
6. References	28
CAPÍTULO II	45
1. Introdução	47
2. Materiais e métodos	49
2.1 Material genético	49
2.2 Análise da germinação	49
2.3. Análise de plantas jovens	50
2.3.1. Parâmetros biométricos	50
2.3.2. Eficiência quântica fotoquímica máxima do fotossistema II (F _v /F _M) e Índice SPAD	50
2.3.3. Curva de assimilação em resposta à variação da concentração intercelular de CO ₂ (A/C _i)	52
2.3.4. Avaliação da atividade da OAS-TL de raízes e folhas	52
2.4. Análises estatísticas	53
3. Resultados	53
3.1. Efeitos do SBC sobre a germinação das espécies cultivadas e daninhas	53
3.2. Efeitos do SBC sobre os parâmetros biométricos das espécies cultivadas e daninhas	54
3.3. Efeitos do SBC sobre o SPAD e a eficiência fotoquímica máxima (F _v /F _M) das espécies cultivadas e daninhas	54
3.4. Curvas A/C _i ajustadas e parâmetros derivados, e efeitos do SBC sobre os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência nas condições de irradiância saturante (PAR de 1400 µmol m ⁻² s ⁻¹)	55
3.5. Curvas A/PAR ajustadas e parâmetros derivados, e efeitos do SBC sobre os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência nas condições de alta irradiância (PAR de 2000 µmol m ⁻² s ⁻¹)	56
3.6. Atividade da OAS-TL de raízes e folhas	58
4. Discussão	59
5. Conclusões	67
6. Referências	68

CAPÍTULO I

Assessment of 3-cyanobenzoic acid as a novel herbicide candidate: Effects on maize growth and photosynthesis

Luiz Henryque Escher Grizza and Osvaldo Ferrarese-Filho*

Laboratory of Plant Biochemistry, State University of Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brazil

*Corresponding author:

E-mail address: osferrarese@gmail.com (O. Ferrarese-Filho)

Abstract

Chemical weed control is a significant agricultural concern, and reliance on a limited range of herbicide action modes has increased resistant weed species, many of which use C4 metabolism. As a result, the identification of novel herbicidal agents with low toxicity targeting C4 plants becomes imperative. An assessment was conducted on the impact of 3-cyanobenzoic acid on the growth and photosynthetic processes of maize (*Zea mays*), a representative C4 plant, cultivated hydroponically over 14 days. The results showed a significant reduction in plant growth and notable disruptions in gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence due to the application of 3-cyanobenzoic acid, indicating compromised photosynthetic activity. Parameters such as the chlorophyll index, net assimilation (A), stomatal conductance (g_s), intercellular CO₂ concentration (C_i), maximum effective photochemical efficiency (F_v'/F_m'), photochemical quenching coefficient (q_P), quantum yield of photosystem II photochemistry (ϕ_{PSII}), and electron transport rate through PSII (ETR) all decreased. The $A/$ PAR curve revealed reductions in the maximum net assimilation rate (A_{max}) and apparent quantum yield (ϕ), alongside an increased light-compensation point (LCP). Moreover, 3-cyanobenzoic acid significantly decreased the carboxylation rates of RuBisCo (V_{cmax}) and PEPCase (V_{pmax}), electron transport rate (J), and mesophilic conductance (g_m). Overall, 3-cyanobenzoic acid induced substantial changes in plant growth, carboxylative processes and photochemical activities. The treated plants also exhibited heightened susceptibility to intense light conditions, indicating a significant and potentially adverse impact on their physiological functions. To conclude, these findings suggest that 3-cyanobenzoic acid or its analogs could be promising for future research targeting photosynthesis.

Keywords: Chlorophyll *a* fluorescence, gas exchange, phenolics, weeds

Abbreviations

A	net assimilation
ABS/RC	absorption flux per reaction center at $t = 0$ or a measure for an average antenna size
$A_{\max}$	net assimilation rate
C_i	intercellular CO_2 concentration
DI ₀ /RC	energy dissipation per reaction center
E	transpiration rate
ET ₀ /ABS	quantum yield for electron transport (at $t = 0$) from Q_A to Q_B
ET ₀ /RC	electron transport flux per reaction center at $t = 0$
ET ₀ /TR ₀	probability (at $t = 0$) that a trapped exciton moves an electron into the electron transport chain beyond Q_A^-
ETR	electron transport rate through PSII
F_0	minimal fluorescence intensity, when all reaction centers of PSII are open
F_m	maximum fluorescence intensity, when all reaction centers of PSII are closed
F_v	variable fluorescence
F_v/F_m	maximum quantum yield of PSII photochemistry
F_v'/F_m'	maximum quantum yield of PSII photochemistry in light
g_m	mesophilic conductance
g_s	stomatal conductance
J	photosynthetic electron transport rate
LCP	light-compensation point
NPQ	non-photochemical quenching
OJIP	chlorophyll <i>a</i> fluorescence transient with O-J-I-P phases
PAR	photosynthetically active radiation
PEPCase	phosphoenolpyruvate carboxylase
PI _{ABS}	indicator of the conservation of energy absorbed by PSII until the decrease of the Q_B
PI _{TOTAL}	indicator of the conservation of energy absorbed by PSII until the decrease in the final PSI acceptors
PPDK	pyruvate O-phosphate dikinase
Q_A	primary quinone acceptor of PSII
Q_B	secondary quinone acceptor of PSII
q_P	photochemical quenching coefficient
RC/CS	amount of active PSII reaction centers per cross-section
R_D	dark respiration rate
RuBisCo	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
TR ₀ /ABS	maximum quantum yield of primary photochemistry at $t = 0$
TR ₀ /ABS	quantum efficiency of primary PSII photochemistry
TR ₀ /RC	trapped energy flux per reaction center at $t = 0$
$V_{c\max}$	maximum RuBisCo carboxylation rate
$V_{p\max}$	maximum PEPCase carboxylation rate
ϕ	apparent quantum yield
ϕ_{PSII}	effective quantum yield of PSII photochemistry

1. Introduction

Agroecosystems, much like any other ecosystem, are greatly influenced by their surrounding environment and climate, which in turn impacts the various living organisms within them. Since the primary goal of an agroecosystem is to meet specific human needs, not all organisms within it are desirable. For instance, pests, diseases, and weeds are typically unwelcome. Weeds, in particular, pose a major challenge due to rapid growth, the ability to absorb resources, and the interception of sunlight, all of which can disrupt the agroecosystem. These resilient weeds compete with crops, depleting soil water and nutrients, and ultimately leading to reduced crop yields ([Pitelli, 1987](#); [Lamego et al., 2005](#); [Kaur et al., 2018](#)).

Herbicides are frequently used to manage weeds, but the continuous application of the same type of herbicide can lead to the selection of resistant weed biotypes. These resistant weeds survive, proliferate, and dominate the plant population ([Brighenti and Oliveira, 2011](#); [Perotti et al., 2020](#)). Currently, there are 533 documented cases of herbicide-resistant weeds worldwide, involving 273 species (156 dicots and 117 monocots). These resistant weeds have evolved to survive against 21 out of 31 known herbicide sites of action and 168 different herbicides, impacting 101 crops in 72 countries. Some species, such as maize (*Zea mays*), have shown resistance to up to seven herbicide sites of action, highlighting the significant challenge posed by resistant weeds in the Poaceae family, which contains 92 resistant species — double that of the second most affected family, Asteraceae ([Heap, 2024](#)).

C4 plants, such as maize, sugarcane (*Saccharum officinarum*), millet (*Pennisetum glaucum*), and sorghum (*Sorghum bicolor*), efficiently absorb and utilize atmospheric CO₂ through specialized photosynthetic pathways involving mesophyll and bundle sheath cells ([Fan et al., 2022](#)). This process results in higher growth rates and greater biomass accumulation, particularly in high-temperature and high-light environments, giving C4 plants a competitive edge over crops ([Brighenti and Oliveira, 2011](#)). The carbon fixation process in C4 plants is facilitated by the enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase), which concentrates CO₂, enhances the carboxylative activity of RuBisCo and

minimizes photorespiration (Zhou et al., 2019). Apart from these agriculturally productive plant species, many of the most noxious weeds are C4 plants (Elmore and Paul, 1983). Among the 18 species classified as the worst weeds, 14 are C4 plants (Rao, 2000). Due to the inevitable emergence of resistant weeds and the competitive advantages of C4 plants, coupled with the lack of new herbicides with unique modes of action since 1980 (Jablonkai, 2011; Dayan and Duke, 2020), there is an urgent need to develop more effective, selective, and environmentally friendly herbicides.

Targeting enzymes involved in C4 photosynthesis, such as pyruvate O-phosphate dikinase (PPDK), could provide a new approach to herbicide developing (Doyle et al., 2005; Nguyen et al., 2016). Inhibiting PPDK, a crucial enzyme in mesophyll cells, has been shown to reduce photosynthetic activity, potentially providing a method for controlling C4 weeds (Haines et al., 2005; Motti et al., 2007; Minges and Groth, 2017). Enzymatic inhibitors are down-regulators of target enzymes and are essential to controlling plant metabolism. Because PPDK is essential for C4 plants to assimilate CO₂ through photosynthesis, we evaluate selective inhibitors of this enzyme as a way to discover new herbicides. We have already tested a few compounds, selected from a virtual library and anchored to the PPDK active site of *Digitaria sanguinalis*, to develop specific PPDK inhibitors. By using virtual screening and drug repositioning analysis, we discovered eight chemicals (bromoacetic, bromopyruvic, 2-bromobutyric, 2-bromopropionic, and 3-cyanobenzoic acids) as potential PPDK inhibitors. Notably, bromoacetic acid decreased PPDK activity in maize in a dose-dependent manner, altering gas exchange and reducing the photosynthetic rate (Constantin et al., 2021).

More recently, we demonstrated that 3-cyanobenzoic acid inhibited maize seedling growth by inducing oxidative stress and increasing reactive oxygen species (ROS) production (Souza et al., 2023). This compound is similar to certain O-group herbicides that mimic auxin and inhibit microtubule assembly (Délye et al., 2013; Gupta, 2018). Based on our previous findings, we postulated that the adverse impacts of 3-cyanobenzoic acid extend beyond root damage and that this compound could potentially serve as a targeted herbicide for C4 plants. Thus, we assessed the impact of 3-cyanobenzoic acid on maize photosynthesis.

Using maize as a model plant due to its C4 metabolism and ease of cultivation, we measured intercellular CO₂ concentration (C_i) and irradiance light curves to evaluate enzyme activity and photochemical efficiency. We analyzed chlorophyll a fluorescence emission, which is a noninvasive and quantitative method used to analyze changes in photosynthetic processes. From the fluorescence data, we were able to calculate the photochemical yield, electron transport capacity, and energy dissipation. To understand the effects further, we created OJIP curves and conducted the JIP fluorescence test, which helps quantify the energy flow through the reaction centers and photosystems, and assess plant photosynthetic performance.

2. Material and methods

The maize (*Zea mays* L. cv. IPR-164) seeds were cleaned by soaking them in 2% sodium hypochlorite for three minutes, followed by thorough rinsing with deionized water. The seeds were then evenly spread on pre-moistened germination paper (Germitest® CEL-060) and covered with another sheet before being rolled up and kept in the dark at 25 °C for three days to germinate. Germinated seedlings with radicle lengths between 5 and 6 cm were randomly selected and grouped into sets of 12, then transferred to hydroponic systems. These seedlings were placed in Styrofoam trays and placed in glass containers filled with 200 mL of ¼ strength nutrient solution at pH 6.0 ([Dong et al., 2006](#)), which contained either 0 (control), 0.5 or 1.0 mM of 3-cyanobenzoic acid (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). The seedlings were then grown under a 12-h light/12-h dark photoperiod at 25 °C with an irradiance of 300 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The nutrient solution was replaced every other day. On the 14th day, the whole plants (V2 stage) were removed to measure biometric parameters. Other assays were conducted using the second fully expanded leaf.

2.1. Biometric measurements

The plant height was determined by measuring from the point where the seed is attached to the culm to the base of the last leaf and the main root. Using a caliper,

the stem was measured at the first internode. To assess the fresh biomass of shoots and roots, gravimetric measurements were conducted. The leaf area was estimated using the Easy Leaf Area Free 1.02 software for mobile devices (Easlon and Bloom, 2014). A total of eighteen plants were evaluated for each treatment.

2.2. SPAD index, chlorophyll a fluorescence and gas exchange

The chlorophyll content was measured using a SPAD-502 meter (Konica Minolta®, Ramsey, NJ, USA). The fluorescence emitted by chlorophyll *a* was measured using a pulse-modulated fluorometer (PAM) of the LI-6800 portable photosynthesis system (Li-Cor®, Lincoln, NE, USA). The middle region of the last fully expanded leaf of plants, which had been adapted for 10 h to full darkness to ensure that photosystem II was fully oxidized, was eclipsed by the 2 cm² chamber of the apparatus (Murchie and Lawson, 2013). The minimal fluorescence intensity (F_0), when all reaction centers of PSII are open, was recorded even in the absence of light, serving as a reference for other related variables. The maximum fluorescence intensity (F_m), when all reaction centers of PSII are closed, was elicited by a high-intensity multiphase flash of light (8000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Loriaux et al., 2013). After that, the maximum photochemical efficiency ($F_m - F_0/F_m$) of the plants was calculated. A total of eighteen plants were evaluated for each treatment.

The same leaf regions of the plants were adapted under light (1400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ irradiance and a fixed CO_2 concentration of 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) until complete photosynthetic induction, and served as the basis for recording fluorescence emission and gas exchange in plants, using the PAM fluorometer and the LI-6800 infrared gas analyzer (IRGA, Li-Cor®, Lincoln, NE, USA). The values of net assimilation (A), stomatal conductance (g_s), maximum quantum yield of PSII photochemistry (F_v'/F_m'), effective quantum yield of PSII photochemistry (ϕ_{PSII}), electron transport rate (ETR), photochemical quenching coefficient (q_P) and non-photochemical quenching (NPQ) were recorded. The measurements were performed at 27 °C, relative humidity of 60%; air flow of 700 μmol^{-1} ; CO_2 concentration of 400 μmol^{-1} ; photosynthetically active radiation (PAR) of 1400

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and multiphase saturating light flash of $8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Values were recorded from duplicated points obtained when constructing light curves and A/C_i curves, which are explained in detail in the following sections. The values were recorded point by point with adaptation times ranging from 60 to 120 s after changing the parameters associated with the curve (light or CO_2), indicating the steady state of the leaf area when the instantaneous rate of change of water, CO_2 concentration, and chlorophyll *a* fluorescence was varied in the recorded less than one in the device sample chamber. Twenty-two plants were evaluated per treatment.

2.3. Net assimilation curves in response to changes in photosynthetically active radiation (A/PAR)

Plants were adapted under light ($1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ irradiance and a fixed CO_2 concentration of $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ in the sample chamber) until full photosynthetic induction; other conditions were fixed as previously described. The net assimilation (A) curve was constructed by recording PAR at a series of points on the LI-6800 IRGA. Each point was recorded at intervals of 60 s, up to a maximum of 120 s, to ensure the plant reached a stable state. The PAR points recorded were 2000, 1800, 1600, 1400, 1200, 1000, 800, 600, 400, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 25, and $0 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, with measurements taken from four plants per treatment. The A/PAR curve was appropriate for the range of 0 to $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, highlighting the linear phase between 0 and $175 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The parameters linked to the curves were calculated using the Microsoft® Excel spreadsheet provided by Lobo et al. (2013). The parameters chosen were maximum net assimilation rate (A_{max}), apparent quantum yield (ϕ), light-compensation point (LCP), and dark respiration rate (R_d).

2.4. Net assimilation curves in response to changes in intercellular CO_2 concentration (A/C_i)

Like the A/PAR curve, the same precautions were taken to acclimatize the plants to light at $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and the recording time was the same as

when the plants were in steady state. The light intensity was maintained at a PAR of $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ while the concentration of available CO_2 was varied. The measurements began with a CO_2 concentration of $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ and then progressively decreased CO_2 levels for each measurement without reaching zero. The concentrations and recording points were then increased in the following order: 400, 200, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 270, 300, 325, 350, 400, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, and $2000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, with measurements taken on six plants per treatment (Bellasio et al., 2016; Zhou et al., 2019). Spreadsheets provided by Zhou et al. (2019) were used to adjust assimilation curves based on the concentration of specific intercellular CO_2 for C4 plants. The average curves were used to calculate the maximum RuBisCo carboxylation rate (V_{cmax}), maximum PEPCase carboxylation rate (V_{pmax}), photosynthetic electron transport rate (J), and mesophilic conductance (g_m).

2.5. Transient responses of the chlorophyll a fluorescence (OJIP curve) and derived parameters (JIP test)

Fast fluorescence kinetics were measured using the inductive flash of the LI-6800 IRGA PAM fluorometer in plants that were adapted in the dark for 10 h. Emissions were recorded every millisecond for one second. Data from 18 plants per treatment were collected to produce OJIP curves, with time converted to a logarithmic scale, showcasing different stages between O (F_0) and P (F_M) phases. The photochemical phase (O–J) corresponds to the complete decrease of the first acceptor (Q_A), the thermal phase (J–I) refers to the electron transfer between the acceptors Q_A and Q_B , and the I–P corresponds to the release of fluorescence by the pool of oxidized plastoquinone (Strasser et al, 2000; Avarseji et al., 2012; Banks, 2017).

In the data analyses, the fluorescence emissions, measured using the OJIP curve, were obtained through the JIP test using specific energy fluxes. These energy fluxes represent different aspects of the photosynthetic process, providing insights into the absorption flux per reaction center (ABS/RC), trapped energy flux per reaction center (TR_0/RC), electron transport flux per reaction center

(ET_0/RC), energy dissipation per reaction center (Dl_0/RC), and amount of active PSII reaction centers per cross-section (RC/CS). These measurements help to understand the efficiency and dynamics of the photosynthetic system in detail. The maximum quantum yield of primary photochemistry (TR_0/ABS), quantum yield for electron transport from Q_A to Q_B (ET_0/ABS), and the probability that a trapped exciton moves an electron into the electron transport chain beyond Q_A^- (ET_0/TR_0). The performance indices are PI_{ABS} (an indicator of the conservation of energy absorbed by PSII until the decrease of the Q_B) and PI_{TOTAL} (an indicator of the conservation of energy absorbed by the PSII until the decline in the final PSI acceptors) (Strasser et al, 2000; Avarseji et al., 2012; Banks, 2017).

2.6. Statistical Analysis

The experimental design used was completely randomized, and the data were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA). Significant differences were then compared using Dunnett's test at both 5% and 1% levels of significance. Data from the A/PAR and A/C_i curves were adjusted according to the Microsoft® Excel spreadsheet provided by Lobo et al. (2013) and Zhou et al. (2019) and analyzes statistically. Additionally, the parameters of the JIP test were calculated from data of the chlorophyll *a* transient curve, normalized, and subjected to the same tests. All statistical analyses were conducted using GraphPad Prism® program, version 8 (La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Effects on biometric measurements

Treatment with 3-cyanobenzoic acid significantly decreased maize growth (Table 1). At 1.0 mM, plant height decreased by 20.3%. The leaf area decreased 21.4% at 0.5 mM and 42% at 1.0 mM, while the culm diameter decreased by 26.5% at 0.5 mM and 34.9% at 1.0 mM. Shoot fresh biomass saw a 45.9% decrease at 1.0 mM compared to the control. Root length also showed a significant decrease, *i.e.*,

by 45.5% at 0.5 mM and 65.7% at 1.0 mM. Fresh root biomass decreased by 62.9% at 1.0 mM. These decreases are illustrated in [Figure 1](#).

3.2. Effects on SPAD index, chlorophyll a fluorescence and gas exchange

Maize plants grown with 3-cyanobenzoic acid for 14 d exhibited mild chlorosis. The total chlorophyll (SPAD index) in the second fully expanded leaf decreased by 19.3% at 1.0 mM ([Fig. 2A](#)). F_v/F_m values remained unchanged ([Fig. 2B](#)).

Under full photosynthetic induction ($1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ irradiance and $400 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$), several parameters decreased compared to controls. The A ([Fig. 2C](#)) decreased by 23% at 0.5 mM and 56.7% at 1.0 mM. The g_s ([Fig. 2D](#)) decreased by 32.8% at 0.5 mM and 68.2% at 1.0 mM. The C_i ([Fig. 2E](#)) decreased by 21.4% at 0.5 mM and 44% at 1.0 mM. The F_v'/F_m' ([Fig. 2F](#)) decreased by 24.8% at 1.0 mM. While NPQ ([Fig. 2G](#)) remained stable, q_P ([Fig. 2H](#)) decreased by 10.9% at 0.5 mM and 39.3% at 1.0 mM.

The ϕ_{PSII} ([Fig. 3A](#)) and ETR ([Fig. 3B](#)) decreased by 15.3% (at 0.5 mM) and 51.4% (at 1.0 mM).

3.3. Effects on A/PAR curve and derived parameters

Significant changes were seen in the A versus PAR ([Fig. 4](#)). At 0.5 mM, A levels were lower than the control. At 1.0 mM, there was a decrease in A at high PAR and in the slope of the initial linear phase.

The A_{max} decreased ([Fig. 5A](#)) 82% (at 1.0 mM). The ϕ ([Fig. 5B](#)) decreased by 57% at 1.0 mM. The LCP ([Fig. 5C](#)) increased by 175% at 1.0 mM, while R_D ([Fig. 5D](#)) remained unaffected.

3.4. Effects on A/Ci curve and derived parameters

To isolate CO_2 diffusion effects through the stomata, the A versus C_i curve was used to derive parameters like V_{cmax} , V_{pmax} , J , and g_m . The impact of 3-cyanobenzoic acid was evident even at low CO_2 levels and intensified with higher

concentrations (Fig. 6). At 1.0 mM, V_{cmax} decreased by 32% (Fig. 7A), V_{pmax} by 42% (Fig. 7B), J by 34.8% (Fig. 7C), and g_m by 28% (Fig. 7D).

3.5. Effects on chlorophyll a transient curve and derived parameters

No changes were noted in the OJIP curve (Fig. 8). Significant results were only observed in RC/CS, which decreased by 25.8% at 0.5 mM (Fig. 9).

4. Discussion

3-Cyanobenzoic acid led to an overall decrease in growth parameters, including both foliar and root growth, as well as in the photosynthetic, photochemical and carboxylative, parameters of maize plants grown in hydroponics for 14 d. Further steps aim to understand the reasons behind these declines and identify primary targets.

Our previous study revealed root growth and development damage in maize seedlings exposed to 3-cyanobenzoic acid for four days, including decreased length and biomass, fewer secondary roots, increased root respiration, heightened antioxidant activity, and elevated ROS production. The mitochondrial respiratory chain was not directly affected; damage was attributed to membrane destabilization, nutrient and water absorption deficiencies, and hormonal imbalances (Souza et al., 2023). The damage observed is similar to that in other plants exposed to monophenols, like cinnamic and benzoic acids. These acids undergo deprotonation, dissipate the proton gradient, and cause membrane depolarization upon absorption. This leads to increased ROS and antioxidant activity, affecting ion transport, nutrient absorption, and water balance (Chiple, 2020; Zhou and Yu, 2006; Gao, 2018; Marchiosi et al., 2020). These effects extend to hormonal imbalances, stomatal closure, less chlorophyll, reduced RuBisCo activity, and damage to photosynthesis reaction centers and electron transport chains (Marchiosi et al., 2020).

Maize plants grown for 14 d exhibited similar damage as observed in seedlings (Souza et al., 2023), indicating acclimatization to unfavorable conditions. Therefore, it is necessary to determine whether the findings result solely from

continuous root damage or if there are direct effects on the aerial parts of the plant and photosynthesis. Regardless of irradiation or CO₂ supply, we observed reduced net photosynthesis. The negative correlation between compound concentration and photosynthesis – a *trade-off* between defense and growth – is expected (Sumbele et al., 2012; Kostidis and Karabourniotis, 2024). Therefore, one cannot solely attribute a decrease in photosynthesis to the energy partition. A comprehensive understanding requires identifying and incorporating other relevant parameters.

Different simple phenolics impact photosynthetic parameters, with stomatal closure being the most frequent effect (Yu et al., 2003; Zhou and Yu, 2006; Lu et al., 2018; Li et al., 2020). Generally, an increase in C_i accompanies a reduction in g_s, signifying a decrease in carboxylative cycles. This has been proven in soybean plants exposed to L-DOPA (Marchiosi et al., 2016) and in poplar seedlings exposed to a phenolic mixture (Li et al., 2020). However, other scenarios exist. In decreased photosynthesis caused by stomatal limitation, a decrease in g_s is usually accompanied by a decline in C_i (Zhou and Yu, 2006). Similar results were observed in cucumber treated with cinnamic and benzoic acid derivatives (Yu et al., 2003). As observed in the current study, this pattern suggests more severe diffusion damage than carboxylative system damage (C₄ cycle, Hatch-Slack pathway, and C₃ Calvin-Benson cycle). This fact, *per se*, justifies the observed decrease in C_i.

Stomatal closure likely accounts for the most observed results. It reduces CO₂ availability inside cells, along with lower g_m. This substrate shortage for PEPCase (V_{pmax}) and RuBisCo (V_{cmax}) compromises their carboxylative activities, explaining the observed decreases. Alternatively, 3-cyanobenzoic acid may have had a direct effect on these enzymes. For instance, Gao et al. (2018) proved that salicylic acid reduced RuBisCo activity and inhibited photochemical structures in *Chlamydomonas reinhardtii*. In the same way, Huang and Bie (2010) reported that cinnamic acid reduced RuBisCo activity in *Vigna unguiculata* without affecting C_i or ϕ_{PSII} .

Maize, a C₄ plant, has a CO₂ concentration mechanism that provides an advantage over C₃ plants. This mechanism involves PEPCase, which exhibits a carboxylation rate higher than that of RuBisCO (Zhou et al., 2019). Notably, the decline

in the V_{pmax} was more significant than the decrease in the V_{cmax} , thereby compromising the CO_2 concentration mechanism. Additionally, the absence of ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP), RuBisCO's substrate, further weakens this carboxylation process. The observed decrease in the A/C_i curve plateau signifies inefficiency in RuBP regeneration (Evans and von Caemmerer, 1996; Long and Bernacchi, 2003). This regeneration depends on ATP and NADPH supplied by the electron transport chain, as reflected in the decreased ETR and J .

Photosynthesis involves capturing light energy and converting it into chemical energy, which impacts parameters such as q_P , F_v'/F_m' , ϕ_{PSII} , and ETR. These changes indicate a reduction in ATP and NADPH production, with insufficient energy dissipation affecting the non-photochemical extinction coefficient (NPQ), pointing to lower ROS production in leaves compared to roots (Souza et al., 2023). Studies have shown that phenolics like *O*-methoxybenzoic, benzoic, usnic, salicylic, cinnamic, syringic, and phthalic acids interfere with antenna complexes. These chemicals disrupt reaction centers and block electron transport between Q_A and Q_B , reducing photochemical efficiency and increasing heat dissipation (Gao et al., 2018; Lu, 2018; Li et al., 2020; Marchiosi et al., 2020). Photochemical quenching parameters change similarly to A in plants under growth stress, where ATP and NADPH consumption are critical. Variations in carboxylation efficiency, CO_2 supply, or carbohydrate export from cells can alter this consumption (Baker, 2008).

To assess structural damage in the photochemical process, chlorophyll *a* fluorescence is measured in darkness, where the carboxylation cycle is inactive. Parameters like F_v/F_m , SPAD index, OJIP curve, and JIP test are all relevant. F_v/F_m indicates the maximum efficiency of photosystem II with all reaction centers open. No change in F_v/F_m suggests no severe damage to photochemical structures, although it is not highly sensitive even with reduced chlorophyll levels (Murchie and Lawson, 2013; Gao et al., 2018). The unaltered F_v/F_m by 3-cyanobenzoic acid implies that leaf photochemical structures were not severely damaged, though some damage is possible, given the decrease in reaction centers per cross-section (RC/CS) and total chlorophyll.

Using different phenolics to analyze changes in the photosynthesis of *C. reinhardtii*, Gao et al. (2018) found that while benzoic acid did not affect F_v/F_m , it

significantly altered chlorophyll and carotenoid levels, as well as the OJIP curve and JIP-test parameters. Benzoic acid reduced RC/CS, similar to 3-cyanobenzoic acid, affecting PI_{ABS} , an essential indicator of PSII photoinhibition under abiotic stress, and enhancing J phase in the OJIP curve. These effects mirror those of DCMU, a PSII inhibitor that blocks electron transport between plastoquinones, reducing PSII quantum efficiency by disconnecting smaller antenna molecules blocking electron flow beyond Q_A . Thus, 3-cyanobenzoic acid likely causes some photochemical damage to PSII reaction centers by disrupting antenna molecules, leading to reduced chlorophyll. This reduction in chlorophyll is a primary effect of phenolics on photosynthesis, likely due to decreased biosynthesis and/or increased degradation (Marchiosi et al., 2020). Carotenoids, as accessory pigments in antenna complexes, may also be reduced due to hormonal imbalance, possibly linked to increased abscisic acid, a carotenoid-derived hormone (Chauhan et al., 2023).

The effects of 3-cyanobenzoic acid on maize seedling roots suggest a hormonal imbalance (Souza et al., 2023). Abscisic acid induces stomatal closure (Holappa and Blum, 1991; Yu et al., 2003), but certain phenolics, such as hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids, counteract its effects. Similar to 3-cyanobenzoic acid, 3-hydroxybenzoic acid exhibits different effects (Purohit et al., 1991; Marchiosi et al., 2020). Monosubstituted benzoic acids, like 3-cyanobenzoic acid, can inhibit ethylene synthesis at high concentrations, while some monophenols stimulate auxin degradation (Marchiosi et al., 2020). Hence, it is plausible to speculate that 3-cyanobenzoic acid could potentially lead to root damage, as well as a reduction in maize growth and photosynthesis. This could be attributed to its increased ABA levels compared to other hormones, which could result in reduced stomatal conductance and changes in carotenoid synthesis, potentially explaining the observed damage in the reaction centers.

Last but not least, the LCP, representing the minimum irradiance for sustaining basal metabolism, showed the most significant change (Lobo et al., 2013). The increase in LCP can be attributed to reduced assimilation, impaired quantum efficiency, and heightened root respiration (Souza et al., 2023). Despite the challenges posed by 3-cyanobenzoic acid, maize plants demonstrated adaptability to growth conditions, thereby adjusting their metabolism. However,

in uncontrolled environments, maize plants remain vulnerable to low irradiance conditions, unable to meet high basal metabolic needs. At high irradiance, NPQ would be insufficient to prevent ROS formation in the aerial parts of maize plants.

5. Conclusions

Overall, the presence of 3-cyanobenzoic acid hampers maize growth, disrupting their photosynthetic, photochemical, and carboxylative processes. The main reason for the reduced photosynthesis is root damage, which leads to lower stomatal and mesophilic conductance. This limits CO₂ availability, impairing the functions of RuBisCO and PEPCase. Additionally, there is damage to the antenna complexes and reaction centers of photosystem II, due to decreased chlorophyll and possible carotenoid use for abscisic acid synthesis, which can cause stomatal closure. Despite some resilience to 3-cyanobenzoic acid, maize plants remain vulnerable under low light conditions due to the high metabolic costs. High light conditions also pose a problem as the photosynthetic machinery becomes inadequate, leading to oxidative damage. These findings suggest that 3-cyanobenzoic acid and similar derivatives could be promising candidates for developing herbicides that target photosynthesis processes.

6. References

- Avarseji, Z., Mohassel, M.H.R., Nezami, A., Abbaspoor, M., & Mahallati, N. (2012). Dicamba+2, 4-D affects the shape of the Kautsky curves in wild mustard (*Sinapis arvensis*). *Plant Knowledge Journal* 1(2):41–45.
- Baker, N.R. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Banks, J.M. (2017). Continuous excitation chlorophyll fluorescence parameters: A review for practitioners. *Tree Physiology*, 37(8), 1128–1136. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx059>
- Bellasio, C., Beerling, D.J., Griffiths, H. (2016). An Excel tool for deriving key photosynthetic parameters from combined gas exchange and chlorophyll fluorescence: Theory and practice: Descriptive modelling of gas exchange data. *Plant, Cell & Environment*, 39(6), 1180–1197. <https://doi.org/10.1111/pce.12560>
- Brighenti, A.M., Oliveira, M.F. (2011). Biologia de plantas daninhas. In: OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (Ed.). *Biologia e manejo de plantas*

daninhas. Curitiba: Omnipax, 2011. p. 1-36.
<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/904874>

Chauhan, J., Prathibha, M., Singh, P., Choyal, P., Mishra, U.N., Saha, D., Kumar, R., Anuragi, H., Pandey, S., Bose, B., Mehta, B., Dey, P., Dwivedi, K. K., Gupta, N. K., Singhal, R.K. (2023). Plant photosynthesis under abiotic stresses: Damages, adaptive, and signaling mechanisms. *Plant Stress*, 10, 100296.
<https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100296>

Chipley, J.R. (2020). Sodium Benzoate and Benzoic Acid. *Antimicrobials in Food* (4^o ed). CRC Press.

Constantin, R.P., Melo, G.S.R., Martarello, D.C.I., Abrahão, J., dos Santos, W.D., Ferrarese-Filho, O., Marchiosi, R. (2021). Bromoacetic acid inhibits pyruvate orthophosphate dikinase and reduces photosynthetic activity in maize. *Acta Physiologiae Plantarum* 43, 54 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03222-4>

Dayan, F.E., Duke, S.O. (2020). Discovery for New Herbicide Sites of Action by Quantification of Plant Primary Metabolite and Enzyme Pools. *Engineering*, 6(5), 509–514. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.03.004>.

Délye, C., Jasieniuk, M., Le Corre, V. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 29(11), 649–658.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.001>

Dong, J., Wu, F., Zhang, G. (2006). Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere*, 64(10). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.030>

Doyle, J., Burnell, J.N., Haines, D.S., Llewellyn, L.E., Motti, C.A., & Tapiolas, D.M. (2005). A Rapid Screening Method to Detect Specific Inhibitors of Pyruvate Orthophosphate Dikinase as Leads for C₄ Plant-Selective Herbicides. *Journal of Biomolecular Screening*, 10, 67–75. <https://doi.org/10.1177/1087057104269978>

Easlon, H.M., Bloom, A. J. (2014). Easy Leaf Area: Automated Digital Image Analysis for Rapid and Accurate Measurement of Leaf Area. *Applications in Plant Sciences*, 2(7). <https://doi.org/10.3732/apps.1400033>

Elmore, C., Paul, R. (1983). Composite List of C₄ Weeds. *Weed Science*, 31(5), 686–692. <https://doi.org/10.1017/S0043174500070193>

Evans, J.R., von Caemmerer, S. (1996). Carbon Dioxide Diffusion inside Leaves. *Plant Physiology*, 110(2), 339–346. <https://doi.org/10.1104/pp.110.2.339>

Fan, Y., Asao, S., Furbank, R.T., von Caemmerer, S., Day, D.A., Tcherkez, G., Sage, T.L., Sage, R.F., Atkin, O.K. (2022). The crucial roles of mitochondria in supporting C₄ photosynthesis. *New Phytologist*, 233(3):1083–1096.
<https://doi.org/10.1111/nph.17818>

Gao, Y., Liu, W., Wang, X., Yang, L., Han, S., Chen, S., Strasser, R. J., Valverde, B. E., & Qiang, S. (2018). Comparative phytotoxicity of usnic acid, salicylic acid, cinnamic acid and benzoic acid on photosynthetic apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.037>

Gupta, P.K. (2018). Toxicity of Herbicides. Em R. C. Gupta (Org.), *Veterinary Toxicology* (Third Edition) (p. 553–567). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00044-1>

- Haines, D.S., Burnell, J.N., Doyle, J., Llewellyn, L.E., Motti, C.A., & Tapiolas, D.M. (2005). Translation of in vitro inhibition by marine natural products of the C4 acid cycle enzyme pyruvate P(i) dikinase to in vivo C4 plant tissue death. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 10, 3856–62. <https://doi.org/10.1021/jf048010x>
- Heap, I. (2024). The International Herbicide-Resistant Weed Database. WeedScience.org. www.weedscience.org
- Holappa, L.D., Blum, U. (1991). Effects of exogenously applied ferulic acid, a potential allelopathic compound, on leaf growth, water utilization, and endogenous abscisic acid levels of tomato, cucumber, and bean. *Journal of Chemical Ecology*, 17(5), 865–886. <https://doi.org/10.1007/BF01395596>
- Huang, X., & Bie, Z. (2010). Cinnamic acid-inhibited ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity is mediated through decreased spermine and changes in the ratio of polyamines in cowpea. *Journal of Plant Physiology*, 167(1), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.07.002>
- Jablonkai, I. (2011). Molecular Mechanism of Action of Herbicides. Em Herbicides—Mechanisms and Mode of Action. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/31251>
- Kaur, S., Kaur, R., Chauhan, B. S. (2018). Understanding crop-weed-fertilizer-water interactions and their implications for weed management in agricultural systems. *Crop Protection*, 103, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.09.011>
- Kostidis, G., & Karabourniotis, G. (2024). The intraspecific trade-off between photosynthesis and phenolics in selected crop species: A meta-analysis study. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4393523/v1>
- Lamego, F.P., Fleck, N.G., Bianchi, M.A., & Vidal, R.A. (2005). Tolerância à interferência de plantas competidoras e habilidade de supressão por cultivares de soja: I. Resposta de variáveis de crescimento. *Planta Daninha*, 23(3), 405–414. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582005000300003>
- Li, K., Zhang, T., Li, H., Zhang, L.D., & Li, F. (2020). Phenolic acids inhibit the photosynthetic productivity of poplar. *Photosynthetica*, 58(5), 1210–1216. <https://doi.org/10.32615/ps.2020.071>
- Lobo, F.A., De Barros, M.P., Dalmagro, H.J., Dalmolin, Â.C., Pereira, W.E., De Souza, É.C., Vourlitis, G.L., & Rodríguez Ortiz, C.E. (2013). Fitting net photosynthetic light-response curves with Microsoft Excel—A critical look at the models. *Photosynthetica*, 51(3), 445–456. <https://doi.org/10.1007/s11099-013-0045-y>
- Long, S.P., & Bernacchi, C.J. (2003). Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany*, 54(392), 2393–2401. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg262>
- Loriaux, S.D., Avenson, T.J., Welles, J.M., Mcdermitt, D.K., Eckles, R.D., Riensche, B., & Genty, B. (2013). Closing in on maximum yield of chlorophyll fluorescence using a single multiphase flash of sub-saturating intensity. *Plant, Cell & Environment*, 36(10), 1755–1770. <https://doi.org/10.1111/pce.12115>
- Lu, X.F., Zhang, H., Lyu, S.S., Du, G.D., Wang, X.Q., Wu, C. H., & Lyu, D.G. (2018). Effects of exogenous phenolic acids on photosystem functions and photosynthetic electron transport rate in strawberry leaves. *Photosynthetica*, 56(2), 616–622. <https://doi.org/10.1007/s11099-017-0702-7>

- Marchiosi, R., Bido, G.S., Böhm, P.A. F., Soares, A.R., Silva, H.A., Ferro, A.P., Ferrarese, L.L.M., & Ferrarese-Filho, O. (2016). Photosynthetic response of soybean to L-DOPA and aqueous extracts of velvet bean. *Plant Growth Regulation*, 80(2), 171–182. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0154-2>
- Marchiosi, R., dos Santos, W.D., Constantin, R.P., Lima, R.B., Soares, A.R., Finger-Teixeira, A., Mota, T.R., Oliveira, D.M., Foletto-Felipe, M.D.P., Abrahão, J., & Ferrarese-Filho, O. (2020). Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. *Phytochemistry Reviews*, 19(4), 865–906. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09689-2>
- Minges, A., Groth, G., (2017) Small-molecule inhibition of pyruvate phosphate dikinase targeting the nucleotide binding site. *PLoS One*, 12(7), e181139. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181139>
- Motti, C.A., Bourne, D.G., Burnell, J.N., Doyle, J.R., Haines, D.S., Liptrot, C.H., Llewellyn, L.E., Ludke, S., Muirhead, A., & Tapiolas, D.M., (2007) Screening marine fungi for inhibitors of the C4 plant enzyme pyruvate phosphate dikinase: Unguinol as a potential novel herbicide candidate. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1921–1927. <https://doi.org/10.1128/AEM.02479-06>
- Murchie, E.H., & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, 64(13), 3983–3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>
- Nguyen, G.T.T., Erlenkamp, G., Jäck, O., Küberl A, Bott, M., Fiorani, F., Gohlke, H., Groth, G., (2016) Chalcone-based selective inhibitors of a C4 plant key enzyme as novel potential herbicides. *Scientific Reports*, 6:27333. <https://doi.org/10.1038/srep27333>
- Perotti, V.E., Larran, A.S., Palmieri, V.E., Martinatto, A.K., Permingeat, H.R. (2020). Herbicide resistant weeds: A call to integrate conventional agricultural practices, molecular biology knowledge and new technologies. *Plant Science*, 290, 10255. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110255>
- Pitelli, R.A. (1987). Competição e controle das plantas daninhas em áreas agrícolas. Piracicaba: IPEF. Série Técnica, v.4, n.12, 15 p. <http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/6867>
- Purohit, S., Laloraya, M. M., & Bharti, S. (1991). Effect of phenolic compounds on abscisic acid-induced stomatal movement: Structure – activity relationship. *Physiologia Plantarum*, 81(1), 79–82. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb01716.x>
- Rao, V.S. (2000). *Principles of Weed Science* (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781482279603>
- Souza, M.C., Constantin, R.P., Abrahão, J., Paiva Foletto-Felipe, M., Grizza, L.H.E., Constantin, R.P., dos Santos, W.D., Ferrarese-Filho, O., & Marchiosi, R. (2023). Inhibitory Effect of 3-Cyanobenzoic Acid on Initial Growth of Maize Seedlings and Its Biochemical Impacts on Antioxidant and Energy Metabolisms. *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-023-11099-5>
- Strasser, R.J., Srivastava, A., & Tsimilli-Michael, M. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples.
- Sumbele, S., Fotelli, M.N., Nikolopoulos, D., Tooulakou, G., Liakoura, V., Liakopoulos, G., Bresta, P., Dotsika, E., Adams, M.A., & Karabourniotis, G. (2012). Photosynthetic capacity is negatively correlated with the concentration of leaf phenolic compounds

across a range of different species. AoB PLANTS, 2012.
<https://doi.org/10.1093/aobpla/pls025>

Yu, J.Q., Ye, S. F., Zhang, M.F., & Hu, W.H. (2003). Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. Biochemical Systematics and Ecology, 31(2), 129–139. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(02\)00150-3](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00150-3)

Zhou, H., Akçay, E., & Helliker, B.R. (2019). Estimating C4 photosynthesis parameters by fitting intensive A/Ci curves. Photosynthesis Research, 141(2), 181–194. <https://doi.org/10.1007/s11120-019-00619-8>

Zhou, Y.H., & Yu, J.Q. (2006). Allelochemicals and photosynthesis. Em M.J. Reigosa, N. Pedrol, & L. González (Orgs.), Allelopathy (p. 127–139). Kluwer Academic Publishers. https://doi.org/10.1007/1-4020-4280-9_6

Table 1. Effects of 3-cyanobenzoic acid on maize plant growth during a 14-day hydroponic cultivation period.

	3-Cyanobenzoic acid (mM)		
	0	0.5	1.0
Plant height (cm)	9.51 ± 0.27	8.77 ± 0.26	7.57 ± 0.20**
Shoot fresh weight (g)	1.11 ± 0.12	0.88 ± 0.06	0.60 ± 0.05**
Leaf area (cm ²)	38.0 ± 2.84	29.9 ± 1.71*	22.0 ± 1.38**
Culm diameter (cm)	3.34 ± 0.19	2.46 ± 0.08**	2.17 ± 0.08**
Root length (cm)	28.7 ± 1.77	15.4 ± 0.81**	9.84 ± 0.47**
Root fresh weight (g)	0.33 ± 0.04	0.25 ± 0.02	0.12 ± 0.01**

Means values (n = 18 ± SEM) significantly different from the control are marked with * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, according to Dunnett's test.

Figure 1. Maize plants grown hydroponically with 3-cyanobenzoic acid for 14 days: 0 mM (**A**), 0.5 mM (**B**), and 1.0 mM (**C**). Scale bars represent 10 cm.

Figure 2. Effects of 3-cyanobenzoic acid on hydroponically grown maize plants for 14 days. Measured parameters include (**A**) chlorophyll content (SPAD index), (**B**) maximum quantum efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m), (**C**) net assimilation (A), (**D**) stomatal conductance (g_s), (**E**) intercellular CO_2 concentration (C_i), (**F**) maximum efficiency of PSII (F_v'/F_m'), (**G**) non-photochemical quenching (NPQ), and (**H**) photochemical quenching (q_P). Means values ($n = 16-22 \pm SEM$) significantly different from the control are marked with * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, according to Dunnett's test.

Figure 3. Effects of 3-cyanobenzoic acid on hydroponically grown maize plants for 14 days on quantum yield of photosystem II photochemistry (ϕ_{PSII}) (**A**) and electron transport rate through PSII (ETR) (**B**). Means ($n = 22 \pm SEM$) marked with * or ** are statistically different from the control according to Dunnett's test at 5% and 1% significance levels, respectively.

Figure 4. Average curves of net assimilation (A) response to varying photosynthetically active radiation (PAR) of plants grown hydroponically with 3-cyanobenzoic acid for 14 days. The initial region of the graph enlarged ($n = 4$).

Figure 5. Effects of 3-cyanobenzoic acid on hydroponically grown maize plants for 14 days on parameters derived from the A/PAR curve: (**A**) net assimilation (A_{max}), (**B**) apparent quantum yield (ϕ), (**C**) light-compensation point (LCP), and (**D**) dark respiration rate (R_D). Means values ($n = 3-4 \pm SEM$) significantly different from the control are marked with * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, according to Dunnett's test.

Figure 6. Average curves of net assimilation (A) response to varying intercellular CO_2 concentration (C_i) of plants grown hydroponically with 3-cyanobenzoic acid for 14 days ($n = 4-6$).

Figure 7. Effects of 3-cyanobenzoic acid on hydroponically grown maize plants for 14 days on parameters derived from the A/C_i curve: **(A)** maximum carboxylation rate of RuBisCO (V_{cmax}), **(B)** maximum carboxylation rate of PEPCase (V_{pmax}), **(C)** rate of photosynthetic electron transport (J), and **(D)** mesophyll conductance (g_m). Means values ($n = 4-6 \pm SEM$) significantly different from the control are marked with * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, according to Dunnett's test.

Figure 8. Chlorophyll *a* fluorescence OJIP transient curves in maize plants grown hydroponically with 3-cyanobenzoic acid for 14 days. Each step indicates the minimal fluorescence intensity when all PS II reaction centers are open (**O** step), the intensity at 0.002 s (**J** step), the intensity at 0.03 s (**I** step), and the maximal intensity when all PSII reaction centers are closed (0.3 s; **P** step). Means ($n = 18 \pm SEM$).

Figure 9. Effects of 3-cyanobenzoic acid on hydroponically grown maize plants for 14 days on specific energy flux: absorption flux per reaction center (ABS/RC), energy trapped per reaction center (TR_0/RC), electron transport per reaction center (ET_0/RC), energy dissipation per reaction center (DI_0/RC), reaction center density per cross-sectional area (RC/CS), quantum yield of primary PSII photochemistry (TR_0/ABS), with which a PSII trapped electron is transferred from Q_A to Q_B (ET_0/TR_0), quantum yield of the electron transport flux from Q_A to Q_B (ET_0/ABS), and performance indices PI_{ABS} and PI_{Total} . Means ($n = 18 \pm SEM$).

Figure 1

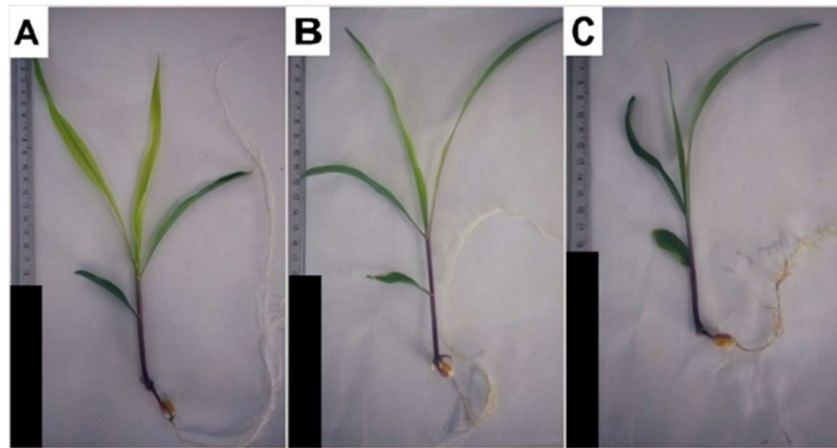


Figure 2

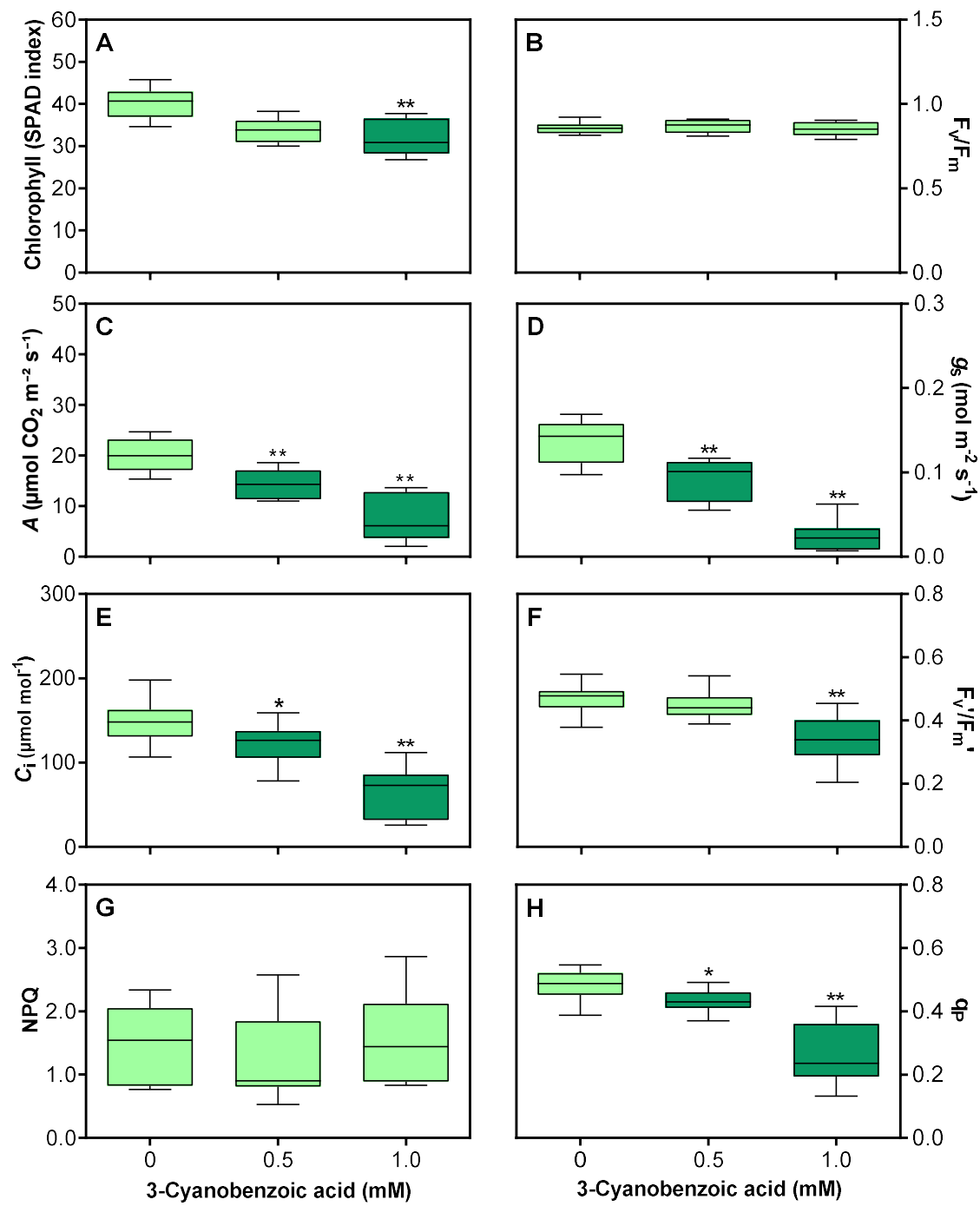


Figure 3

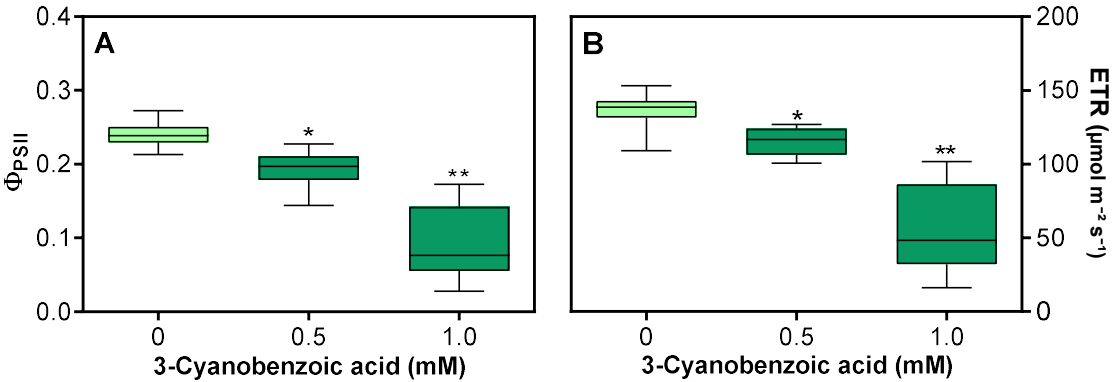


Figure 4

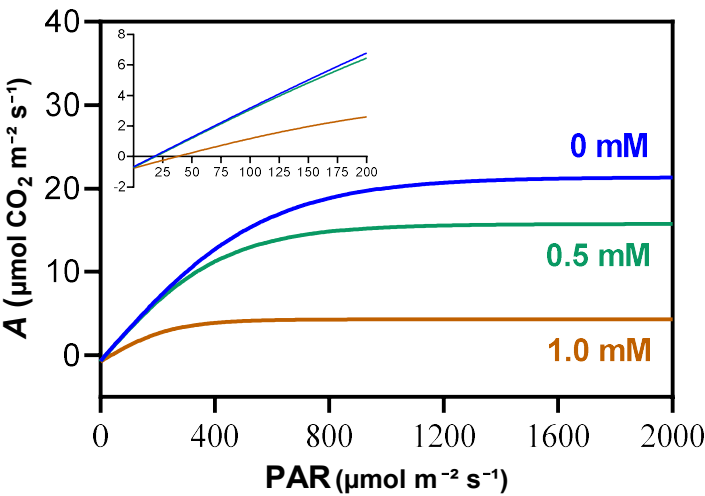


Figure 5

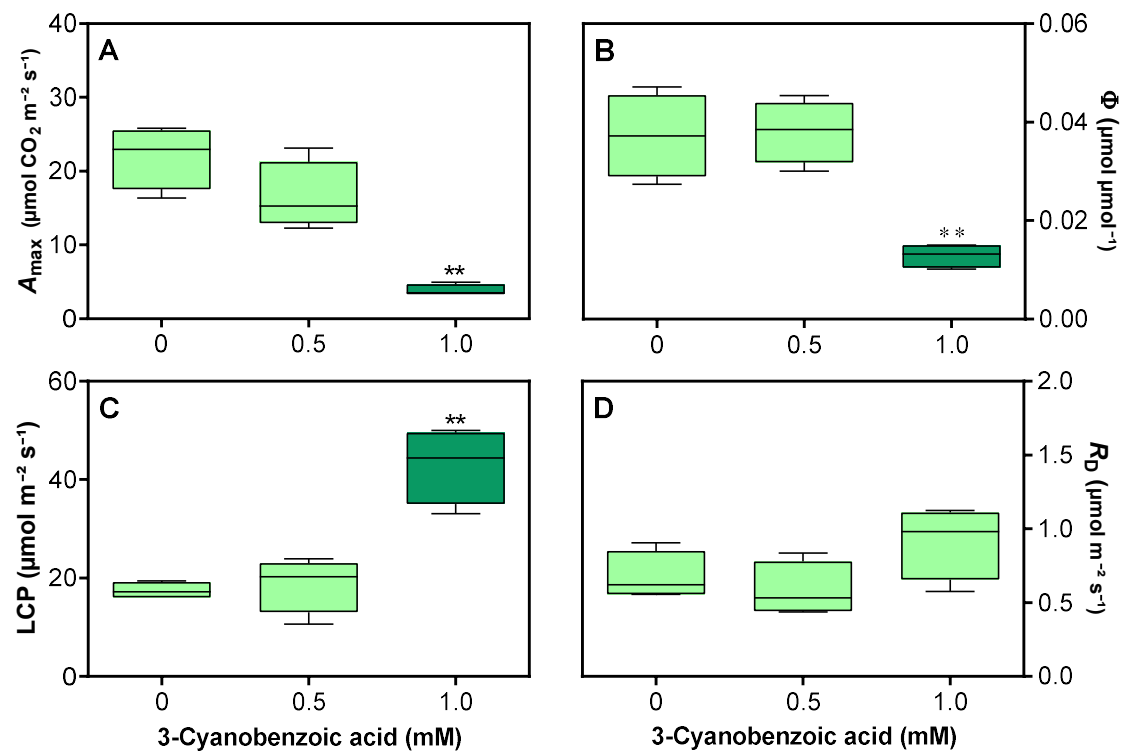


Figure 6

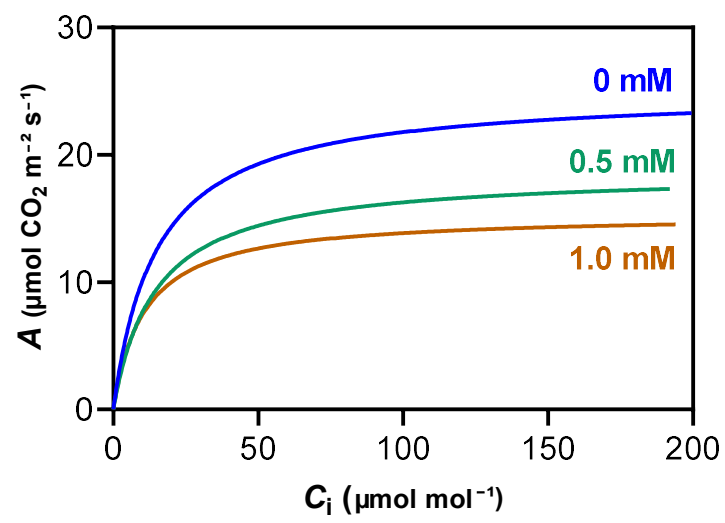


Figure 7

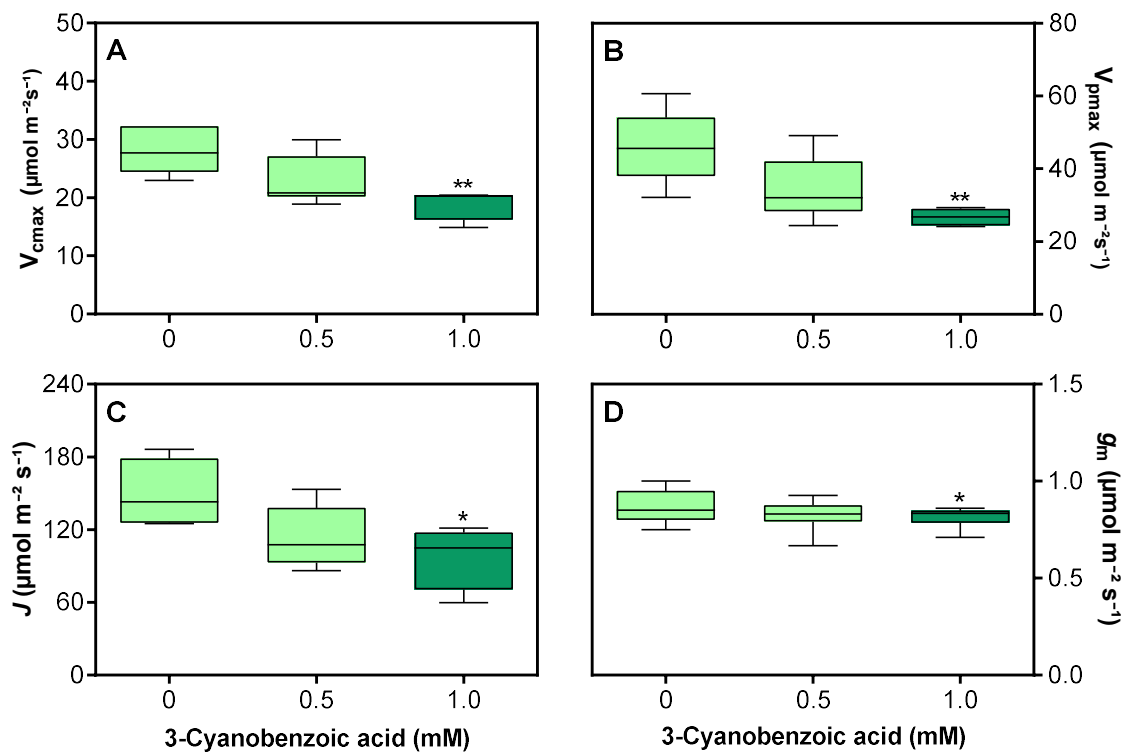


Figure 8

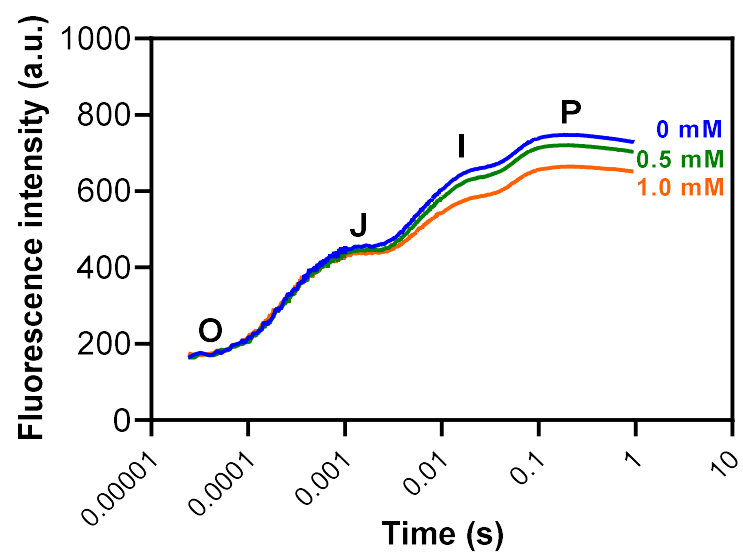
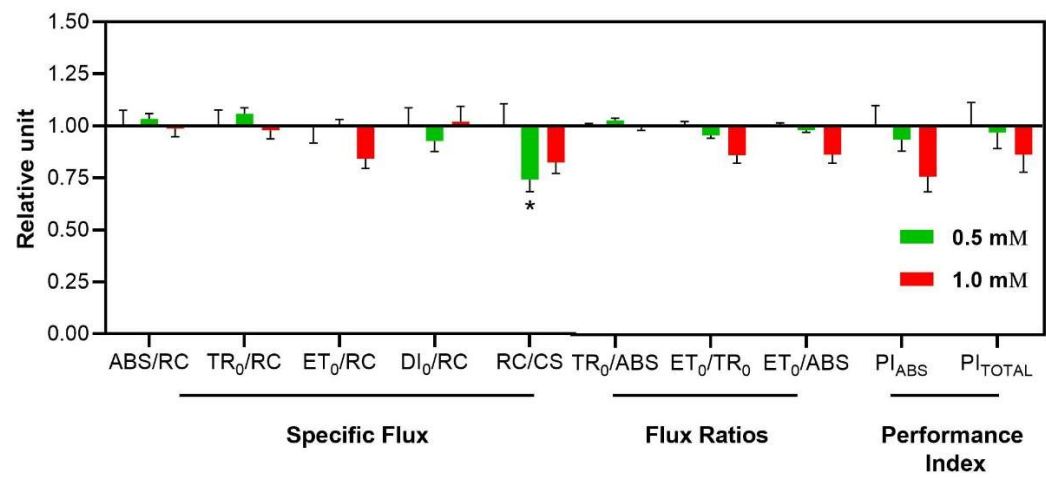


Figure 9



CAPÍTULO II

S-Benzil-L-cisteína: um possível herbicida com efeitos diferenciais no crescimento e fotossíntese de plantas C3 e C4

Luiz Henryque Escher Grizza e Osvaldo Ferrarese-Filho*

Laboratório de Bioquímica de Plantas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil

*Autor correspondente:

E-mail: osferrarese@gmail.com (O. Ferrarese-Filho)

Resumo

A agricultura moderna controla seletivamente plantas daninhas usando diferenças metabólicas entre elas e as culturas. A via de assimilação de enxofre, essencial para plantas e ausente em animais, é um alvo para herbicidas, tendo a O-acetilserina (tiol) liase (OAS-TL) como enzima final. A inibição da síntese de L-cisteína, molécula final da via pode afetar plantas C3 e C4 de forma distinta devido às diferenças na partição do metabolismo de enxofre. Com o intuito de compreender a ação diferencial do S-benzil-L-cisteína (SBC), inibidor da enzima OAS-TL, em plantas cultivadas e daninhas, C3 e C4, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos deste composto sobre a germinação, crescimento e fotossíntese das plantas cultivadas soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*) e das plantas daninhas leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) e capim-amargoso (*Digitaria insularis*). O SBC foi escolhido por seu efeito inibitório sobre a enzima OAS-TL. Os resultados revelaram que a germinação e o índice de velocidade de germinação foram afetados pelo SBC, a 2 e 5 mM, apenas em *D. insularis*, com uma redução de 48% e 52%, respectivamente. Após 21 dias de cultivo, todas as concentrações afetaram o crescimento das espécies testadas. Reduções mais drásticas ocorreram nas plantas daninhas, com 5 mM de SBC, nos parâmetros biométricos de raízes e partes aéreas de 94% (*E. heterophylla*) e 82% (*D. insularis*). A fotossíntese destas plantas também foi afetada, com maiores reduções em parâmetros de trocas gasosas e em menor intensidade em parâmetros referentes a emissão de fluorescência. A 2 mM de SBC, a espécie mais afetada *D. insularis* sofreu reduções na assimilação líquida (A) em 75% a $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e 67% a $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A taxa de transporte de elétrons (ETR) foi reduzida em 32% e 41% nas respectivas condições luminosas. Para lidar com a inibição da OAS-TL nas raízes, diferentes estratégias foram notadas entre as plantas, sendo que as do tipo C4 acumularam proteínas. de *D. insularis* foi a mais afetada, tanto germinação à fotossíntese. A inibição seletiva da OAS-TL poderá ser explorada para desenvolver formulações herbicidas, assim como ferramenta na compreensão das diferenças no metabolismo do enxofre entre esses tipos de plantas.

PALAVRAS-CHAVE: Herbicida, bioinformática, assimilação do enxofre, C3,C4.

1. Introdução

As plantações agrícolas, como sistemas ecologicamente modificados pelo homem, são complexas e abrigam uma ampla variedade de organismos vivos. Seu objetivo é atender às demandas de uma sociedade em constante crescimento, produzindo alimentos, fibras e outras matérias-primas essenciais. Contudo, a produção agrícola enfrenta desafios contínuos, como pragas, doenças e, em particular, plantas daninhas, que são fatores limitantes para a produtividade das culturas. As plantas daninhas constituem um problema agrícola desde 10.000 a.C., quando seu controle era feito manualmente. Hoje, o controle, majoritariamente químico, movimenta um mercado multibilionário e corresponde a quase 50% dos gastos com pesticidas ([Vats, 2015](#)). No âmbito do controle químico, o metabolismo diferencial entre plantas cultivadas e daninhas permite que os herbicidas afetem principalmente as daninhas, sem prejudicar a produtividade das culturas agrícolas ([Mall et al., 2019](#)). No entanto, nem todos os herbicidas eficientes são naturalmente seletivos. Em tais casos, usam-se técnicas de melhoramento convencional com linhagens tolerantes ou biotecnológicas, como seleção forçada de culturas de células expostas a herbicidas ou transformações genéticas para conferir resistência ([Anderson et al., 2019](#); [Carvalho et al., 2009](#); [Manohar et al., 2018](#)).

A era do controle químico na agricultura começou após a Segunda Guerra Mundial, em 1947, com a comercialização de herbicidas orgânicos mimetizadores de auxinas ([Brighenti e Oliveira, 2011](#); [Vats, 2015](#)). Contudo, o controle químico de plantas daninhas, como de outras pragas, causa pressão de seleção, levando à resistência em espécies inicialmente controláveis. Atualmente, há herbicidas com 31 modos de ação diferentes, dos quais 21 têm casos de resistência registrados, o que implica na necessidade de novos métodos de controle ([Heap, 2024](#)).

A via de assimilação do enxofre emerge como um alvo promissor para o desenvolvimento de herbicidas ([Hirase e Molin, 2003](#)). Essa via é crucial para a conversão do sulfato inorgânico em formas biologicamente ativas e não está presente em animais, que dependem do consumo de compostos de enxofre já

reduzidos (Koprivova e Kopriva, 2016). Nas plantas, o sulfato absorvido pelas raízes é ativado pela ATP sulfúrilase, formando adenosina 5'-fosfossulfato (APS). O APS pode seguir duas vias: a secundária, não essencial para o crescimento, produzindo compostos sulfatados relacionados à resposta ao estresse, e a via primária, onde o APS é reduzido a sulfito pela APS redutase, convertido em sulfeto pela sulfito redutase (SiR), sendo então integrado ao esqueleto de O-acetilserina (OAS) para formar L-cisteína, numa reação catalisada pela O-acetilserina (tiol) liase (OAS-TL) (Jez, 2019; Jobe et al., 2019; Li et al., 2020; Samuilov et al., 2018; Takahashi et al., 2011; Takahashi, 2019).

A OAS-TL, responsável pela etapa final de incorporação do sulfeto, ocorre em diferentes compartimentos celulares: citosol, plastídios e mitocôndrias, com isoformas específicas atuando em cada local e predominando em diferentes tipos celulares (Jobe et al., 2019; Takahashi et al., 2011). O produto, L-cisteína, é essencial na formação de proteínas e de outros compostos contendo enxofre, como metionina, glutatona, cofatores e grupos prostéticos, além de regular o metabolismo do enxofre (Jez, 2019; Li et al., 2021; Samuilov et al., 2018; Takahashi et al., 2011; Takahashi, 2019). L-Cisteína é um ponto de convergência para as vias metabólicas do enxofre, carbono e nitrogênio. Sua síntese depende do esqueleto de carbono da fotossíntese, da assimilação de nitrato para fornecer nitrogênio e da assimilação de sulfato para fornecer enxofre (Jobe et al., 2019). A principal via de síntese de serina, precursora da OAS em tecidos fotossintetizantes, é a fotorrespiração, o qual é reduzida em plantas C4 (Ros et al., 2013; Samuilov et al., 2018). Portanto, avaliar a inibição da OAS-TL em plantas C3 e C4 pode indicar seletividade devido às diferenças na organização espacial da fotossíntese e da assimilação de enxofre entre esses tipos de plantas.

Estudos de bioinformática foram realizados modelando a OAS-TL de *Arabidopsis thaliana* (AtOAS-TL). Por meio de técnicas de *virtual screening* virtual com métodos de *docking*, S-benzil-L-cisteína (SBC) foi identificado como possível inibidor. A atividade inibitória do SBC foi confirmada *in vitro* com AtOAS-TL, caracterizando-o como um inibidor não competitivo. Ensaio *in vivo* com milho (*Zea mays*) e *Ipomoea grandifolia* mostraram redução na produção de L-cisteína e afetaram o crescimento inicial das plantas (Foletto-Felipe et al., 2023).

Como extensão a este estudo, o presente trabalho verifica se SBC pode ser um inibidor seletivo entre espécies C3 e C4. Motivado por experimentos que mostraram maior sensibilidade da espécie daninha C3 (*I. grandifolia*), em comparação com uma C4 (milho) e por estudos recentes sobre as particularidades do metabolismo dessas plantas na assimilação de enxofre, foram testadas quatro espécies: duas C3 (soja – *Glycine max* e leiteiro – *Euphorbia heterophylla*) e duas C4 (milho e capim-amargoso – *Digitaria insularis*), sendo duas culturas agrícolas e duas plantas daninhas. Os efeitos na germinação e em plantas com 21 dias de exposição ao SBC foram avaliados, observando-se os impactos nos parâmetros biométricos, fotossintéticos e na atividade da OAS-TL de folhas e raízes.

2. Materiais e métodos

2.1 Material vegetal

Os experimentos foram realizados de forma independente em quatro espécies de plantas, duas culturas comerciais e duas plantas daninhas, representando plantas do tipo C3 (*G. max* e *E. heterophylla*) e C4 (*Z. mays* e *D. insularis*). Analisaram-se dois estágios de desenvolvimento sob o efeito do SBC: germinação e plantas jovens. As cultivares selecionadas foram cv. 64I63 (*G. max*) e cv. IPR-164 (*Z. mays*), e as sementes das plantas daninhas foram adquiridas da empresa Cosmos Agrícolas Produção e Serviços Rurais Ltda, São Paulo, Brasil.

2.2 Análise da germinação

As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos e colocadas em caixas do tipo Gerbox, constituindo unidades experimentais. Cada caixa continha 25 sementes para culturas e 50 para plantas daninhas, com 5 caixas por tratamento. As sementes foram dispostas sobre duas folhas de papel Germitest® (CEL-060) umedecidas com 5 mL de água destilada (controle)

ou solução de SBC (0, 1, 2 e 5 mM), pH 6. As caixas foram mantidas em uma germinadora a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas por 7 dias. As germinações foram contadas diariamente, e foram aferidos a germinação total média e o índice de velocidade de germinação (IVG).

2.3. Análise de plantas jovens

Em experimentos independentes, as sementes das 4 espécies, previamente sanitizadas, foram germinadas em vasos de plástico contendo 50 g de substrato de pinus e 50 g de vermiculita, 3 plantas por vaso e 4 vasos por tratamento. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação, onde permaneceram por 21 dias. As plantas receberam 100 mL de SBC (0, 1, 2 e 5 mM), diluído em água deionizada com pH final 6 no dia do plantio. Tratamentos subsequentes de 50 mL, nas mesmas concentrações, diluídos em água foram feitos com intervalo de um dia até o 6º dia, a partir do qual o SBC passou a ser diluído em solução nutritiva, pH 6,0 até o 20º ([Hoagland e Arnon, 1950](#)). Os parâmetros biométricos e fotossintéticos foram aferidos no 21º dia.

2.3.1. Parâmetros biométricos

Após 21 dias de cultivo, com auxílio de uma régua milimetrada e balança analítica, foram aferidas as alturas (inserção da raiz até a base da última folha totalmente expandida), comprimento de raiz, e biomassa fresca da parte aérea e raízes. Após secagem em estufa a 60 °C por 72 horas foram determinadas as biomassas secas da parte aérea e raízes.

2.3.2. Eficiência quântica fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_M) e Índice SPAD

Com a utilização de fluorômetro de pulso modulado (PAM) do sistema portátil de fotossíntese LI-6800 (Li-Cor, Lincoln, NE, EUA), as medidas de fluorescência inicial (F_0) e máxima (F_M) foram registradas nas plantas com 21 dias, adaptadas às condições de escuro (*overnight*) e usadas para o cálculo da eficiência

quântica fotoquímica máxima do fotossistema II ($F_M - F_0 / F_M$) (Baker, 2008; Murchie e Lawson, 2013). O teor de clorofila foi estimado pelo índice SPAD, utilizando SPAD-502 164 (Konica Minolta, Ramsey, NJ, EUA). As medições foram realizadas na última folha totalmente expandida.

2.3.4 Curva de assimilação em resposta à variação da radiação fotossinteticamente ativa (A/PAR)

Com a utilização combinada do analisador de gás por infravermelho (Infrared Gas Analyser – IRGA) e do fluorômetro de pulso modulado (PAM) do sistema portátil de fotossíntese LI-6800, as plantas foram adaptadas às condições de CO_2 ambiente ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As medições foram feitas quando as alterações nos valores de assimilação não eram superiores a 2%, por cerca de 5 minutos (Long e Bernacchi, 2003). Com as plantas adaptadas foram registrados os seguintes parâmetros pontuais relacionados a fluorescência modulada da clorofila *a*: eficiência quântica fotoquímica máxima na luz do fotossistema II (F_v' / F_M'), eficiência operacional do fotossistema II (Φ_{PSII}), taxa de transporte de elétrons (ETR), quenching fotoquímico (q_P), quenching não fotoquímico (q_N), e os parâmetros relacionados às trocas gasosas: assimilação (*A*), condutância estomática (g_s), transpiração (*E*) e concentração de CO_2 Interceular (C_i). (Baker, 2004; Baker, 2008; Maxwell e Johnson 2000; Murchie e Lawson, 2013).

Após as medidas pontuais, foi iniciado o programa automático do LI-6800 para a construção da curva de luz. Os pontos foram registrados em ordem decrescente de: 2000, 1750, 1500, 1250, 1000, 500, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com tempo de adaptação para o registro de cada ponto entre 50 e 90 segundos cada. Os dados de assimilação e radiação fotossinteticamente ativa foram então utilizados na planilha de Lobo et al. (2013), sugerida pela empresa fornecedora do equipamento, em que 15 pontos aleatórios entre 0 e $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram utilizados para construção de curvas A/PAR ajustadas pela equação de hipérbole retangular e para retirada dos parâmetros de rendimento quântico aparente (Φ) e respiração no escuro (R_D) (Lobo et al., 2013; Ye, 2007). As medidas foram realizadas na última folha totalmente expandida.

2.3.3. Curva de assimilação em resposta à variação da concentração intercelular de CO₂ (A/C_i)

Plantas foram adaptadas a 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ e PAR saturante de 1400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, onde foram obtidos os mesmos parâmetros pontuais registrados PAR de 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Fv'/Fm', ΦPSII , ETR, qP, qN, qL, A, g_s e E.

A construção automática de curva de assimilação líquida pela variação de CO₂ pelo equipamento foi efetuada, com tempo de adaptação de 90 a 120 segundos entre cada registro, e, seguindo recomendações de Long e Bernacchi (2003). As medidas foram da concentração ambiente de CO₂ para as menores concentrações, e após medidas próximas a zero, os registros foram feitos aumentando a concentração disponível até a máxima possível fornecida pelo aparelho. Os pontos registrados seguiram a ordem: 400, 300, 200, 120, 100, 80, 40, 400, 400, 500, 650, 850, 1050, 1300, 1500 e 1800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ ambiente (C_a) (Bellasio et al., 2016; Moualeu-Ngangue et al., 2017). Os dados registrados de assimilação (A) e de concentração intercelular de CO₂ (C_i) foram usados para ajuste dos pontos no modelo matemático hiperbólico até o C_i máximo estimado de 1600 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ para todas as espécies, e para o cálculo da velocidade máxima de carboxilação da RuBisCo (V_{cmax}) e taxa máxima de transporte de elétrons (J_{max}) em planilha de análise de resposta fotossintética ao CO₂ (Benarcchi, 2024).

2.3.4. Avaliação da atividade da OAS-TL de raízes e folhas

Para quantificação da atividade enzimática, foram utilizadas extrações de folhas e raízes das plantas controle e tratadas nas concentrações de 1, 2 e 5 mM, exceto na maior concentração em *D. insularis*, o qual não foi possível obter biomassa suficiente para o ensaio. Utilizou-se a metodologia de Randewig et al. (2012), na qual 100 μL do sobrenadante do extrato foi combinado com 100 μL de tampão de reação (50 mM HEPES pH 7,5, 10 mM O-acetilserina, 15 mM Na₂S e 5 mM DTT). Após 15 minutos de incubação a 25°C, a reação foi interrompida com 50 μL de TCA a 20%. A solução final foi centrifugada por 5 minutos a 10.000

g, sendo 100 µL do sobrenadante separado para quantificação com ninhidrina. O meio de reação continha 100 µL de ácido acético glacial e 200 µL de reagente (250 mg de ninhidrina, 6 mL de ácido acético concentrado, 4 mL de HCl concentrado). A mistura reativa foi fervida por 10 minutos e a reação interrompida pela imersão do frasco em gelo. As medições foram realizadas no espectrofotômetro a 560 nm, usando-se uma curva de L-cisteína como padrão. Para o cálculo de atividade específica, proteínas do sobrenadante do extrato inicial foram dosadas pelo método de Bradford (Biorad®), com curva padrão utilizando albumina bovina.

2.4. Análises estatísticas

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado. Para análise de germinação, a caixa *Gerbox* foi considerada como unidade experimental (UE). Para análise de plantas jovens foram cultivadas 3 delas por vaso que foram utilizadas individualmente como UE para as análises biométricas, F_vF_M , e índice SPAD. Para as análises fotossintéticas foi considerada uma planta aleatória por vaso como UE. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas usando o pacote GraphPad Prism® (Versão 8.0, GraphPad Software Inc., USA) e as diferenças entre os parâmetros foram avaliadas pelo teste Dunnett, com $p \leq 0,10$ para parâmetros fotossintéticos e $p \leq 0,05$ para demais testes.

3. Resultados

3.1. Efeitos do SBC sobre a germinação das espécies cultivadas e daninhas

Os testes de germinação das quatro espécies, avaliados pelos parâmetros de germinação total média e pelo índice de velocidade de germinação (IVG), apresentaram redução significativa apenas em *D. insularis*, não alterando a germinação das culturas, soja e milho, e da planta daninha *E. heterophylla*. Esta planta daninha C4 teve uma redução na germinação total aos 7 dias a partir de 1 mM de SBC, com uma queda de 22%, chegando a 48% com 5 mM ([Fig. 1A](#)).

A velocidade de germinação foi afetada apenas a partir de 2 mM de SBC, com uma redução de 25% no IVG, atingindo um atraso de 52% na germinação com 5 mM (Fig. 1B).

3.2. Efeitos do SBC sobre os parâmetros biométricos das espécies cultivadas e daninhas

No que diz respeito aos parâmetros biométricos, as plantas daninhas mostraram-se as mais sensíveis ao SBC, apresentando reduções expressivas com 2 e 5 mM. Em média, observou-se uma redução de 46% na altura e 40% no comprimento da raiz (Fig. 2A, B). Além disso, a biomassa fresca e seca, tanto da parte aérea quanto das raízes (Figs. 2C, D, E, F), diminuiu em 67% com 2 mM. A 5 mM, a redução foi de 88% e 59% para *E. heterophylla*, e de 97% e 93% para *D. insularis*, respectivamente. Dentre estes parâmetros, a biomassa fresca da raiz foi o parâmetro mais afetado, com redução de 98% para *E. heterophylla* e de 96% para *D. insularis*, após exposição com 5 mM de SBC.

Nas culturas, essa redução nos parâmetros biométricos ocorreu apenas com a dose de 5 mM, resultando em uma diminuição média de 29% e 49% na altura e no comprimento da raiz em *G. max.* e *Z. mays*, respectivamente. As biomassas frescas e secas diminuíram 72% e 58%, sendo que a soja também foi afetada com 2 mM, apresentando uma redução média de 21% em suas biomassas. Assim como nas plantas daninhas, o parâmetro mais afetado foi a biomassa fresca da raiz, com reduções de 85% na soja e 66% no milho com 5 mM de SBC. As plantas daninhas apresentaram reduções significativamente maiores que as culturas, com inibição quase completa a partir de 2 mM e completa com 5 mM, enquanto as culturas mostraram reduções próximas de 50% no crescimento com a maior concentração de SBC (Fig. 3).

3.3. Efeitos do SBC sobre o SPAD e a eficiência fotoquímica máxima (F_v/F_m) das espécies cultivadas e daninhas

Não foram observadas diferenças no parâmetro F_v/F_m . O índice SPAD foi reduzido em 10% em *D. insularis* com 1 mM de SBC e em 12% e 14% em *E.*

heterophylla e *D. insularis*, respectivamente, com 2 mM de SBC, sendo as culturas não afetadas. As plantas daninhas não apresentaram área foliar suficiente para análises dos efeitos com 5 mM de SBC (Fig. 4).

3.4. Curvas A/Ci ajustadas e parâmetros derivados, e efeitos do SBC sobre os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência nas condições de irradiância saturante (PAR de 1400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

As curvas de assimilação fotossintética líquida (A) em função da variação de CO_2 intercelular (C_i) (Fig. 5) mostraram uma diferença expressiva no comportamento da fotossíntese das culturas apenas com 5 mM de SBC. Para as espécies daninhas com área foliar suficiente para análise fotossintética, *E. heterophylla* não revelou comportamento diferenciado com 2 mM, enquanto *D. insularis* apresentou uma redução na assimilação fotossintética já na dose de 1 mM, acentuando-se com 2 mM.

Nos parâmetros derivados da curva ajustada, o $V_{C_{\max}}$ foi reduzido apenas nas espécies do tipo C4, com uma redução de 40% em *Z. mays* com 5 mM de SBC e de 69% em *D. insularis* com 2 mM (Fig. 6A). A redução do $J_{\max}$ foi observada também na espécie daninha *E. heterophylla*, com uma diminuição de 31% com 2 mM, e novamente em *D. insularis*, com 68% de redução a 2 mM, e em *Z. mays*, com 37% a 5 mM (Fig. 6B).

Os parâmetros registrados no início da realização da curva, quando as plantas estavam estabilizadas na condição de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 e PAR de 1400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mostraram as maiores diferenças nas trocas gasosas: condutância estomática, assimilação e transpiração (Figs. 7A, B, C). Em *G. max*, a redução média desses três parâmetros ocorreu apenas com 5 mM, com uma diminuição de 30%, sendo a condutância estomática a mais afetada (36%) e a assimilação a menos impactada (27%). Em *Z. mays*, também com 5 mM, a redução média foi de 30%. Para as plantas daninhas analisadas, as reduções significativas ocorreram apenas com 2 mM. Em *E. heterophylla*, houve uma redução média de 33% nos três parâmetros. O comportamento foi similar em *G. max* (a outra C3) com a menor redução na assimilação (17%) e a maior na condutância estomática (42%). *D. insularis* foi altamente impactada pelo SBC, com reduções médias de

78% na transpiração, 75% na assimilação e 80% na condutância estomática após tratamento com 2 mM. O último parâmetro de trocas gasosas, a concentração intercelular de CO₂ (C_i; Fig. 7D), revelou comportamento similar entre as plantas do tipo C3, sem alterações significativas. Em *Z. mays*, foi observado um aumento de 44% com 5 mM de SBC, enquanto em *D. insularis* ocorreu uma redução de 63%.

Quanto às análises de fluorescência da clorofila *a*, que proporcionam uma melhor compreensão dos eventos fotoquímicos, a redução ocorreu apenas nas representantes C4 sob essa intensidade luminosa (Figs 7E, F, G, H, I), *Z. mays* e *D. insularis*. Em *Z. mays*, ocorreu uma redução de 29% apenas com 5 mM de SBC nos parâmetros de eficiência operacional do fotossistema II (ΦPSII) e taxa de transporte de elétrons (ETR). Por outro lado, em *D. insularis*, após tratamento com 2 mM, ocorreu uma redução geral nos parâmetros fotoquímicos: 32% para ΦPSII e ETR, 27% no *quenching* fotoquímico (qP), além de um aumento significativo de 28% no *quenching* não fotoquímico (qN) em comparação à planta controle.

3.5. Curvas A/PAR ajustadas e parâmetros derivados, e efeitos do SBC sobre os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência nas condições de alta irradiância (PAR de 2000 μmol m⁻² s⁻¹)

As curvas modeladas referentes à assimilação líquida em função da variação de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) apresentaram um comportamento semelhante às curvas A/C_i na resposta das plantas ao SBC, com exceção de *E. heterophylla*, que mostrou uma diferença acentuada na assimilação com o tratamento de 2 mM (Fig. 8). As espécies cultivadas, *G. max* e *Z. mays*, apresentaram uma redução expressiva na assimilação apenas com a dose de 5 mM de SBC. Em contraste, *D. insularis*, a mais afetada, apresentou uma redução considerável na assimilação já a partir da menor concentração (1 mM) de SBC.

Nas possibilidades apresentadas na planilha de ajuste proposta por Lobo et al. (2013), foram selecionados os parâmetros de eficiência quântica aparente (Φ) e respiração no escuro (R_D) (Figs. 9A, B). Em Φ a redução foi de 37% e 54% em *D. insularis* com 1 e 2 mM de SBC, respectivamente; 31% em *E. heterophylla*

com 2 mM; e 41% em *Z. mays* com 5 mM. A respiração no escuro, um parâmetro derivado da curva que prediz a respiração, afetou apenas as plantas do tipo C4, com reduções de 42% e 56% em *D. insularis* nas concentrações testadas e de 42% na maior concentração em *Z. mays*.

Nos valores registrados no início da construção da curva A/PAR, com as plantas estabilizadas para medição em alta irradiância ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), observou-se que as reduções nos parâmetros de trocas gasosas foram acentuadas pelo aumento da irradiância (Figs. 10A, B, C). Por exemplo, *G. max* apresentou uma redução média de 33% nesses parâmetros, enquanto *Z. mays* mostrou uma redução de 40%, com uma diminuição significativa na condutância estomática (40%) e na transpiração (38%), além da assimilação, em ambas as espécies submetidas a 5 mM. Em *E. heterophylla*, os efeitos de 2 mM foram mais pronunciados em comparação aos parâmetros observados a $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, com uma redução média de 48%, em contraste com 33% na condição anterior. A assimilação, que havia sido reduzida em 17% na condição anterior, passou a ser reduzida em 41% nesta condição de maior irradiância. *D. insularis* apresentou uma redução média de 68% com 2 mM, e também revelou uma redução significativa (45%) com 1 mM. As reduções na concentração intercelular de CO_2 (C_i) permaneceram ausentes nas plantas C3 (Fig. 10D). O aumento observado anteriormente não foi mais registrado em *Z. mays*, e *D. insularis* passou a ser afetada com 1 mM de SBC, com uma redução de 22%, e 44% com 2 mM.

Nos eventos fotoquímicos sob alta irradiância (Figs. 10E, F, G, H, I), *G. max* não apresentou danos aparentes. *Z. mays* exibiu reduções apenas com 5 mM nos parâmetros ΦPSII e ETR, com uma diminuição de 26%. *E. heterophylla* mostrou danos significativos com 2 mM, com uma redução de 16% na eficiência quântica fotoquímica máxima efetiva do fotossistema II ($F_v'F_m'$) e um aumento expressivo de 25% no *quenching* não fotoquímico (qN). *D. insularis* apresentou uma redução média de 32% com 2 mM de SBC em todos os parâmetros analisados, exceto na dissipação não fotoquímica, que não mostrou diferenças significativas sob alta irradiância.

3.6. Atividade da OAS-TL de raízes e folhas

A atividade da OAS-TL (Figs. 11A, B) medida nas raízes foi reduzida em todas as espécies. Nas plantas do tipo C3, *G. max* apresentou uma redução de 65% apenas com 5 mM de SBC. Em *E. heterophylla*, as reduções foram observadas desde 1 mM, com diminuições de 17%, 38% e 52% para 1, 2 e 5 mM, respectivamente. Em *Z. mays*, a atividade foi reduzida em 23% com 2 mM e 24% com 5 mM. Já, *D. insularis* mostrou reduções de 23% e 35% com 1 e 2 mM, respectivamente, não sendo possível conduzir os experimentos com 5 mM devido ao tamanho diminuto das raízes. Nas folhas, o comportamento variou entre as espécies: *G. max* apresentou um aumento de 14% com 1 mM; *Z. mays*, um aumento de 44% a 5 mM, e *E. heterophylla* mostrou reduções de 11% e 16% com 2 e 5 mM, respectivamente. Em *D. insularis*, a redução não foi significativa.

Os teores de proteínas (Figs. 11C, D) nas plantas do tipo C3 apresentaram reduções tanto nas folhas quanto nas raízes. Em contraste, as plantas C4 mostraram um padrão comum de redução nas folhas e aumento nas raízes. Em *G. max*, a redução nas folhas foi de 50% na maior concentração, enquanto nas raízes variou de 28% a 46%. Em *E. heterophylla*, as reduções nas folhas foram de 21% a 47%, e nas raízes, as reduções ocorreram com 2 mM (11%) e 5 mM (16%). Em *Z. mays*, foram observadas reduções de 13% (2 mM) e 23% (5 mM) nas proteínas das folhas e aumentos de 46% (2 mM) a 121% (5 mM) nas raízes. *D. insularis* apresentou reduções nas folhas de 25% (2 mM) a 65% (5 mM), e aumentos de 32% (1 mM) a 62% (2 mM) nas raízes.

As reduções acentuadas nas proteínas das folhas de *G. max* resultaram em aumentos mais pronunciados nas atividades específicas da enzima (Figs. 11E, F) nessa mesma parte da planta, com um incremento de 28% a 115% de 1 a 5 mM de SBC. A atividade específica também aumentou nas folhas de *Z. mays* (88% com 5 mM) e em *E. heterophylla* (58% com 5 mM), enquanto em *D. insularis* foi observada apenas uma tendência de aumento. Nas raízes, *G. max* apresentou um aumento na menor dose, que depois foi reduzido em 37% com 5 mM. Em *E. heterophylla*, a redução na atividade específica ocorreu apenas com 5 mM, com uma diminuição de 38% em relação ao controle. Para as plantas C4,

a atividade específica foi reduzida em todas as concentrações de SBC, com quedas de 35%, 55% e 66% em *Z. mays* e de 45% e 60% em *D. insularis*.

4. Discussão

Na avaliação da seletividade, o resultado mais notável foi na germinação. A planta daninha *D. insularis* foi a única afetada pela exposição ao SBC, enquanto *Z. mays*, outra planta da mesma família Poaceae e tipo C4, não sofreu impacto, assim como as outras espécies avaliadas (*G. max* e *E. heterophylla*). Apesar de a germinação de *D. insularis* ser a única afetada, o experimento de crescimento revelou que o SBC possui um efeito herbicida em todas as plantas, com reduções significativas nos parâmetros biométricos. As espécies daninhas, *E. heterophylla* e *D. insularis*, mostraram uma redução superior a 90% com 5 mM de SBC. Embora não tenha sido observada seletividade quanto ao tipo fotossintético no crescimento, notou-se uma diferença na fotossíntese e na atividade enzimática e acúmulo de proteínas nas raízes, com similaridades nas respostas, especialmente entre *Z. mays* e *D. insularis*.

Os experimentos aqui discutidos, alinhados com estudos anteriores sobre o efeito do SBC na OAS-TL, identificam a redução da L-cisteína como o principal fator de dano, mas também buscam outros fatores de influência com base nas diferentes respostas das plantas analisadas. Em estudos sobre a identificação da OAS-TL como alvo enzimático e a prospecção do SBC, observou-se uma maior sensibilidade na planta daninha *I. grandifolia* em comparação com *Z. mays*. Essa diferença não pôde ser atribuída à estrutura da OAS-TL, já que os alinhamentos *in silico* da enzima entre várias espécies (*Z. mays*, *A. thaliana*, *I. triloba*, *G. max* e *Spinacia oleracea*) mostram uma identidade superior a 80% e similaridade acima de 88%. Assim, características morfofisiológicas parecem ser responsáveis pela ação diferencial (Foletto-Felipe et al., 2023). Outro estudo avaliou os efeitos do SBC na fotossíntese e no sistema antioxidante de *I. grandifolia*, revelando que a deficiência de L-cisteína causa disfunções nos componentes com enxofre na cadeia de transporte de elétrons, como citocromo, complexo b6f, ferredoxina e centros ferro-enxofre (Fe-S). Isso reduz a capacidade fotossintética e aumenta a produção de espécies reativas de

oxigênio (ROS), além de diminuir o potencial antioxidante, uma vez que as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e catalase (CAT) permaneceram inalteradas apesar do aumento de ROS (Martarello et al., 2024).

No presente trabalho, as análises do SBC começaram na fase inicial do crescimento das plantas, antes da emergência, um período crítico para o controle químico de plantas daninhas. Nessa fase, as plantas são mais permeáveis aos herbicidas, com folhas que têm a cutícula pouco desenvolvida e pouca ou nenhuma camada de cera. Além disso, em gramíneas, as estrias de Caspary, que formam uma barreira para a absorção radicular, ainda não estão presentes (Brighenti e Oliveira, 2011). Durante os testes de germinação e no índice de velocidade de germinação (IVG), a planta daninha *D. insularis* foi a única espécie afetada pelo SBC. Essa planta é um dos maiores problemas entre as pragas agrícolas (Gazola et al., 2016). Dentre as espécies analisadas, *D. insularis* tem o menor tamanho de semente e, devido ao seu crescimento lento e à formação de rizomas após 35 dias de emergência, seu controle na fase inicial é crucial para evitar que se torne difícil de manejar (Machado et al., 2006; Mendonça et al., 2014). O controle diferencial de herbicidas é mais eficaz nas fases iniciais do crescimento, podendo afetar uma espécie e não outra, devido ao tamanho e à sensibilidade das sementes (Brighenti e Oliveira, 2011).

Na germinação, as sementes não dependem de nutrientes externos, já que suas necessidades de nitrogênio, carbono e enxofre são supridas por proteínas de armazenamento (SSPs). No entanto, ainda se sabe pouco sobre a influência do enxofre na regulação dessas proteínas, nos fitohormônios e na própria germinação (Mondal et al., 2022). Pode-se postular que o SBC esteja afetando a quantidade de sulfeto de hidrogênio (H_2S), formado tanto enzimaticamente quanto não enzimaticamente. A enzima sulfito redutase (SiR) é uma das fontes de H_2S e requer a atividade da OAS-TL para evitar níveis tóxicos (Álvarez et al., 2012; Caverzan et al., 2022; Corpas, 2019). O H_2S é uma molécula gasosa sinalizadora que atua através da persulfidação e modificação pós-traducional oxidativa dos resíduos tiol (R-SH para R-SSH). Em níveis adequados, o H_2S é essencial para a germinação, ajudando na metabolização do amido no endosperma, interagindo com a via do ácido abscísico e ativando o sistema

antioxidante enzimático e não enzimático (Corpas, 2019; Khanna et al., 2021; Zhang et al., 2010). Contudo, em concentrações nanomolares, o H₂S pode se tornar tóxico, inibindo as oxidases do citocromo c mitocondrial e retardando a germinação por mecanismos ainda não completamente compreendidos. Assim, as sementes de *D. insularis* podem ser mais afetadas pelo H₂S (Álvarez et al., 2012; Caverzan et al., 2022).

Apesar de outras sementes não apresentarem redução na germinação e na velocidade de germinação, no experimento de crescimento, todas foram expostas ao SBC desde a fase inicial. Esse fator reflete-se na análise realizada aos 21 dias. Os parâmetros biométricos foram afetados em todas as plantas, independentemente dos mecanismos fotossintéticos (C3 e C4). No entanto, observou-se uma maior suscetibilidade das plantas daninhas, cujos parâmetros foram reduzidos drasticamente com 2 mM de SBC, atingindo mais de 90% de inibição a 5 mM. Esses resultados indicam uma seletividade relacionada à concentração, sendo que não se trata de uma característica absoluta, mas sim uma diferença de tolerância entre as plantas daninhas e a cultura de interesse ao princípio ativo utilizado (Brighenti e Oliveira, 2011).

Entre as espécies analisadas, *Z. mays* mostrou-se a mais tolerante às menores concentrações do SBC, sendo a única a não ter seus parâmetros biométricos alterados a 2 mM de SBC. Isso pode ser explicado por diferenças nos mecanismos de absorção, translocação e assimilação de enxofre em comparação com a soja, além de um mecanismo de desintoxicação mais eficiente que o da *D. insularis*, também C4 e da família Poaceae (Carvalho et al., 2009; Silva et al., 2003). Segundo Silva et al. (2003), o milho possui uma maior capacidade de absorção de enxofre do solo em comparação com a soja, mantendo maiores concentrações de sulfato em suas raízes. O aumento do substrato, sulfato e, subsequentemente, sulfeto, pode estar superando parcialmente a barreira imposta pela inibição da OAS-TL nas menores doses, favorecendo a formação de L-cisteína. O milho pode direcionar o SBC para os vacúolos, uma estratégia conhecida na desintoxicação de herbicidas, resultando em menos efeitos prejudiciais para o crescimento da planta (Carvalho et al., 2009). Essa capacidade diferenciada entre milho e *D. insularis* é observada também com outros herbicidas, como o nicosulfuron, inibidor da enzima

acetolactato sintase (ALS), e o mesotrione, inibidor da biossíntese de carotenos, aos quais certas cultivares de milho são tolerantes, enquanto servem para controlar *D. insularis* na cultura do milho (Ogliari et al., 2009; Cavalieri et al., 2008). A menor sensibilidade do milho ao SBC em relação a outra planta daninha, *I. grandifolia*, também foi observada em raízes (Foletto-Felipe et al., 2023).

Altas concentrações de SBC não foram capazes de eliminar as plantas, mas causaram paralisação no crescimento, como observado em *I. grandifolia* cultivada por 14 dias com 2,5 e 5 mM (Martarello et al., 2024). Essa paralisação alinha-se aos relatos de deficiência de enxofre, que indicam redução da taxa de crescimento e desenvolvimento, especialmente da parte aérea das plantas, sem necessariamente iniciar o programa de senescência (Burke et al., 1986; Gilbert et al., 1997; Hirai et al., 2003). A redução no crescimento devido à deficiência de enxofre parece ter duas principais causas: a fotossíntese e as relações hídricas (Kastori et al., 2000).

A assimilação de carbono, resultado da fotossíntese, foi afetada apenas na maior concentração testada: 2 mM para plantas daninhas e 5 mM para plantas cultivadas, sem diferenciação entre plantas C3 e C4, exceto em *D. insularis*, que, sob alta irradiância ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), foi afetada a partir de 1 mM de SBC. É importante notar que as reduções causadas com 5 mM de SBC nas plantas daninhas impediram a realização de medições fotossintéticas.

Uma possível influência para a redução da fixação de carbono é a diminuição da clorofila total (índice SPAD). Assim como nos parâmetros de crescimento, as plantas daninhas foram mais suscetíveis aos danos do SBC. A clorose é um sintoma de deficiência de enxofre, uma vez que a biossíntese de clorofila depende da S-adenosilmetionina, afetando as folhas novas tanto de monocotiledôneas quanto de dicotiledôneas. Diversos estudos apontam que a redução da clorofila é uma das principais causas da diminuição da fotossíntese (Burke et al., 1986; Gilbert et al., 1997; Houhou et al., 2018; Lunde et al., 2008; Resurrection et al., 2001).

A eficiência quântica máxima da fotoquímica do fotossistema II (F_v/F_m), medida no escuro, não foi alterada em nenhuma planta ou concentração, indicando a integridade deste fotossistema. Contudo, este parâmetro não

fornece informações sobre o funcionamento do FSI ou sobre as reações bioquímicas da fotossíntese que ocorrem independentemente do PSII (Murchie e Lawson, 2013). Alterações em F_v/F_m também não foram observadas em *Beta vulgaris* e *Oryza sativa* frente à deficiência de enxofre; no entanto, em *O. sativa*, a capacidade do FSI de reduzir $NADP^+$ foi 60% menor do que em plantas saudáveis, indicando que os danos relacionados ao enxofre estão mais associados ao FSI, centro de reação do tipo ferro-enxofre, do que ao PSII, centro de reação do tipo quinona (Chen et al., 2020; Kastori et al., 2000; Lunde et al., 2008).

Danos a outros parâmetros fotoquímicos foram observados, com diferenciação entre a resposta das plantas C3 e C4. Sob irradiância de $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, declínios na eficiência operacional do FSII (ΦPSII) e, consequentemente, na taxa de transporte de elétrons (ETR), foram notadas apenas em *Z. mays* e *D. insularis*. Semelhante ao que foi observado por Lunde et al. (2008) em *O. sativa*, esse efeito é justificado pela pressão de excitação aumentada devido ao acúmulo de elétrons na cadeia de transporte de elétrons, com o *pool* de plastoquinonas excessivamente reduzido e o FSI e/ou o ciclo de Calvin não conseguindo acompanhar a atividade do FSII. A atividade carboxilativa da RuBisCo também foi afetada nessas espécies, sugerindo um ciclo de Calvin deficitário para lidar com o excesso de energia. Esses danos afetaram a relação entre a dissipação não fotoquímica e os centros de reação abertos (qP) apenas em *D. insularis*, confirmando a maior sensibilidade da espécie em vários aspectos. As plantas do tipo C3 não tiveram a atividade carboxilativa da RuBisCo reduzida; mesmo que houvesse uma redução, a fotorrespiração contribui para que o fluxo de elétrons não sofra pressão de excitação na cadeia de transporte de elétrons, como observado nas plantas C4 (Baker, 2004). A fotorrespiração também é a principal via de formação de serina em tecidos fotossintetizantes, o aminoácido precursor da O-acetilserina, substrato da OAS-TL, e seu aumento pode estar contribuindo para o acúmulo de precursores, gerando um descompasso entre a via de assimilação de enxofre e a fotossíntese (Ros et al., 2013; Samuilov et al., 2018).

Sob alta irradiância ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), é esperado que os danos fotoquímicos se intensifiquem devido ao aumento da absorção luminosa e

sobrecarga na cadeia de transporte de elétrons, o que reduz a eficiência do sistema, como observado por Lunde et al. (2008). A eficiência operacional do FSII é reduzida em *D. insularis*, resultando em centros de reações fechados (qP) e em uma diminuição da eficiência fotoquímica máxima na luz do FSII (F_v'/F_m'), o que indica um desvio da energia que seria utilizada na fixação de carbono (Baker, 2008; Murchie e Lawson, 2013). Danos fotoquímicos, ausentes em condições de menor intensidade luminosa nas plantas C3, se acentuam em *E. heterophylla*, com uma redução de F_v'/F_m' e aumento de qN, sugerindo que a fotorrespiração não é mais suficiente como sumidouro de elétrons, com o oxigênio provavelmente recebendo esses elétrons e aumentando a formação de superóxido e demais ROS, como visto com a aplicação de SBC em *Ipomea grandifolia* (Baker, 2004; Martarello et al., 2024). As plantas C4, adaptadas a altas intensidades luminosas e com maior quantidade de componentes da cadeia de transporte de elétrons, apresentariam menor dano em condições naturais (Wasilewska-Dębowska et al., 2022).

Em relação aos parâmetros de trocas gasosas, observou-se uma queda na assimilação, acompanhada por uma redução na condutância estomática e na transpiração. O fechamento dos estômatos evita a perda excessiva de água, mas limita a difusão de CO₂ para dentro da planta, explicando parte da redução na assimilação pela menor quantidade de CO₂ disponível (Long e Bernacchi, 2003). As limitações da fotossíntese estomáticas e não estomáticas podem ser caracterizadas pela análise do CO₂ intercelular (C_i), cuja redução indica que o fechamento estomático é um fator limitante (Zhou e Yu, 2006).

O comportamento de C_i variou entre as quatro espécies: enquanto nas plantas C3 permaneceu inalterado em ambas as intensidades luminosas analisadas, *D. insularis* apresentou uma grande redução e *Z. mays*, sob a intensidade de 1400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mostrou um grande aumento a 5 mM de SBC. Isso demonstra que o fechamento estomático leva a uma assimilação crítica em *D. insularis*. Contudo, ao considerar a velocidade de carboxilação da enzima RuBisCo ($V_{C_{\text{max}}}$), que leva em conta C_i para eliminar limitações estomáticas, a redução de sua atividade também contribui para as reduções observadas. As plantas C3 mostram uma tendência de redução na atividade da enzima, com a não alteração de C_i , apesar do fechamento estomático, indicando um distúrbio moderado na

enzima. A redução observada em J_{max} , parâmetro referente à regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), substrato da enzima RuBisCo, afetada em todas as plantas exceto *E. heterophylla*, sugere que a diminuição dos componentes enzimáticos do ciclo de Calvin contribui para a redução na assimilação líquida das plantas inibidas pelo SBC.

A fotossíntese, principal diferença entre as plantas C3 e C4, e sua interação com o metabolismo do enxofre foram os principais motivadores deste estudo da ação diferencial da inibição da OAS-TL. Revisões da literatura sobre plantas com deficiência de enxofre destacam a redução na síntese de clorofila, na quantidade de RuBisCo e em componentes contendo enxofre dos fotossistemas, como os centros de reação do FSI e a cadeia de transporte de elétrons, como principais responsáveis pela redução da assimilação e crescimento ([Burke et al., 1986](#); [Gilbert et al., 1997](#); [Houhou et al., 2018](#); [Kastori et al., 2000](#); [Lunde et al., 2008](#); [Resurrection et al., 2001](#)). No entanto, há uma lacuna de informações sobre a resposta fotossintética de plantas do tipo C4 à deficiência de enxofre, e que possuem mais etapas enzimáticas na assimilação e podem ser igualmente afetadas pela redução de enxofre ([Zhou et al., 2019](#)).

Ainda neste contexto, a inibição da OAS-TL não se limita à deficiência de enxofre. Reduções na condutância estomática podem, assim como em plantas deficientes em enxofre, ser causadas pela desregulação do balanço hídrico devido à deficiência mineral, danos nas raízes e à influência da L-cisteína na expressão de enzimas limitantes da biossíntese de ABA ([Batool et al., 2018](#); [Chan et al., 2019](#); [Zhou e Yu, 2006](#)). Por outro lado, pode ser uma resposta a distúrbios causados pelo acúmulo de metabólitos antes da ação da OAS-TL, como é o caso da 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAP). PAP está relacionado à via secundária do metabolismo de enxofre e é capaz de ativar componentes da sinalização de ABA por uma via paralela independente, e ao H_2S , que realiza a persulfidação de proteínas-chave na via de sinalização de ABA ([Chan et al., 2019](#); [Khanna et al., 2021](#)).

Apesar da complexidade na conexão entre o metabolismo de assimilação de carbono e os danos ao metabolismo de enxofre devido à inibição da OAS-TL, é possível afirmar que todas as espécies avaliadas sofreram danos na fotossíntese, com origens diferentes, levando a fotoinibição, geração de ROS e

redução de crescimento, como observado em *I. grandifolia* (Martarello et al., 2024). Os danos na assimilação líquida foram mais pronunciados em plantas do tipo C4, que também mostraram redução em suas eficiências quânticas (Φ) e uma redução na respiração no escuro (R_D). Por outro lado, *G. max* não apresentou redução na eficiência quântica nem na respiração foliar, indicando que diferentes estratégias são adotadas pelas espécies para lidar com o SBC ou com os danos da inibição da OAS-TL.

A atividade da enzima OAS-TL aumentou ou se manteve em folhas nas espécies mais tolerantes ao SBC, *G. max* e *Z. mays*, e reduziu em raízes em todas as espécies, mas apenas em doses maiores nas mesmas. Isso indica uma maior tolerância dessas culturas em comparação com as plantas daninhas. Um indicativo que reforça as diferentes estratégias adotadas entre plantas do tipo C3 e C4 é a dinâmica proteica. As plantas C4 tiveram reduções mais drásticas na atividade específica de raízes e podem ter respondido com um aumento da expressão da enzima, o que foi suficiente para manter níveis de atividade mais próximas ao controle do que nas plantas C3. Nas folhas, a redução de proteínas foi semelhante em todas as espécies avaliadas; no entanto, *G. max*, como produto final, possui uma atividade específica muito aumentada. Conjectura-se que esse efeito decorra de uma redução geral no crescimento, favorecendo a manutenção da enzima OAS-TL ativa, uma vez que, na deficiência de enxofre, as plantas podem utilizar glutatona e outros compostos secundários contendo enxofre para manter sua função primária (Maruyama-Nakashita, 2017).

É possível que o SBC não tenha sido totalmente translocado, ou apenas em pequena quantidade para a parte superior da planta. Isso talvez seja possível devido a sua similaridade com a L-cisteína, uma vez que pouco se sabe sobre os transportadores de L-cisteína além dos transportadores celulares e sua distribuição pelo floema (Jobe et al., 2019). Por exemplo, OAS, quando aplicado exogenamente em *A. thaliana*, permanece quase exclusivamente nas raízes, sem aumentar os níveis nas folhas (Hirai et al., 2003). Portanto, pode-se supor que a planta responda à inibição da OAS-TL na raiz priorizando sua atividade nas folhas. O aumento de proteínas nas espécies C4 pode estar relacionado ao aumento de transportadores de sulfato nas raízes, já que plantas com deficiência de enxofre têm sua translocação de sulfato estimulada das raízes para as folhas.

Esse transporte é naturalmente superior em *G. max* em comparação com *Z. mays*, que, assim como *D. insularis*, depende do aumento de transportadores para superar a inibição na raiz (Maruyama-Nakashita, 2017; Silva et al., 2003; Takahashi et al., 2000).

Comparado a outros macronutrientes, o estudo da via de assimilação e absorção do enxofre está atrasado, com os principais mecanismos conhecidos derivados do estudo da planta modelo *A. thaliana*, que não correspondem totalmente aos mecanismos presentes em plantas filogeneticamente distantes, especialmente plantas do tipo C4. Pouco se sabe sobre como o arranjo bioquímico e estrutural das plantas C4 impacta o metabolismo do enxofre, a participação do mecanismo secundário do enxofre e, principalmente, o particionamento entre os mecanismos primário e secundário, os quais ainda não estão completamente elucidados, especialmente em situações de estresse. A relação entre OAS, fotorrespiração e assimilação de enxofre também é pouco compreendida (Chan et al., 2019; Jobe et al., 2019; Li et al., 2020; Ros et al., 2013; Samuilov et al., 2018).

A regulação e sinalização da via de assimilação são complexas, e a fotossíntese do tipo C4 adiciona uma camada extra de complexidade (Jobe et al., 2019). Embora não seja possível desvendar todos os fatores da ação diferencial entre os tipos C3 e C4, e a inibição da OAS-TL pelo SBC cause danos ao crescimento e desenvolvimento distribuídos igualmente entre os representantes, é possível traçar semelhanças e diferenças entre as respostas de cada grupo de plantas. *D. insularis*, uma planta daninha de grande importância para a agricultura, foi a mais sensível ao composto. O SBC é um inibidor moderado da OAS-TL, sendo o primeiro de seu tipo a ser testado pelo grupo de pesquisa do BIOPLAN. Com a descoberta de inibidores mais eficazes, a busca por diferentes respostas entre espécies dos tipos C3 e C4 não é apenas um caminho para o desenvolvimento de um composto herbicida de sucesso, mas também pode ser uma ferramenta para avanços na compreensão das diferenças metabólicas no metabolismo do enxofre entre esses tipos de plantas.

5. Conclusões

A inibição da OAS-TL pelo SBC produziu efeitos seletivos práticos na germinação de *D. insularis*, uma planta daninha de importância agrícola. Embora os danos ao crescimento e desenvolvimento não tenham mostrado diferenças significativas entre as espécies C3 e C4, foram mais pronunciados nas espécies daninhas. No entanto, as diferenças entre os metabolismos dos tipos C3 e C4 refletiram-se nos resultados da inibição, não apenas no perfil das alterações na resposta fotossintética, mas também nos mecanismos adotados para mitigar os danos causados pelo SBC. Um exemplo é o acúmulo de proteínas nas raízes das espécies C4, como *Z. mays* e *D. insularis*. A seletividade diferencial da inibição da OAS-TL apresenta um potencial promissor para o desenvolvimento de herbicidas e pode servir como uma ferramenta para elucidar mecanismos da via de assimilação em plantas C4, que ainda não são totalmente compreendidos.

6. Referências

- Álvarez, C., García, I., Moreno, I., Pérez-Pérez, M. E., Crespo, J. L., Romero, L. C., & Gotor, C. (2012). Cysteine-Generated Sulfide in the Cytosol Negatively Regulates Autophagy and Modulates the Transcriptional Profile in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(11), 4621–4634. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105403>
- Anderson, Jennifer. A., Ellsworth, P. C., Faria, J. C., Head, G. P., Owen, M. D. K., Pilcher, C. D., Shelton, A. M., & Meissle, M. (2019). Genetically Engineered Crops: Importance of Diversified Integrated Pest Management for Agricultural Sustainability. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 24. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00024>
- Baker, N. R. (2004). Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, 55(403), 1607–1621. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh196>
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Batool, S., Uslu, V. V., Rajab, H., Ahmad, N., Waadt, R., Geiger, D., Malagoli, M., Xiang, C.-B., Hedrich, R., Rennenberg, H., Herschbach, C., Hell, R., & Wirtz, M. (2018). Sulfate is Incorporated into Cysteine to Trigger ABA Production and Stomatal Closure. *The Plant Cell*, 30(12), 2973–2987. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00612>
- Bellasio, C., Beerling, D. J., & Griffiths, H. (2016). An Excel tool for deriving key photosynthetic parameters from combined gas exchange and chlorophyll fluorescence: Theory and practice: Descriptive modelling of gas exchange data. *Plant, Cell & Environment*, 39(6), 1180–1197. <https://doi.org/10.1111/pce.12560>

- Bernacchi, C. (2024). A simple utility for analyzing Photosynthetic-CO₂ response curves. <https://www.life.illinois.edu/bernacchi/links.html>
- Brighenti, A. M., & Oliveira, M. F. de. (2011). Biologia de plantas daninhas. In: OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (Ed.). Biologia e manejo de plantas daninhas. Curitiba: Omnipax, 2011. p. 1-36. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/904874>
- Burke, J. J., Holloway, P., & Dalling, M. J. (1986). The Effect of Sulfur Deficiency on the Organisation and Photosynthetic Capability of Wheat Leaves. *Journal of Plant Physiology*, 125(3–4), 371–375. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(86\)80160-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(86)80160-2)
- Carvalho, S. J. P. D., Nicolai, M., Ferreira, R. R., Figueira, A. V. D. O., & Christoffoleti, P. J. (2009). Herbicide selectivity by differential metabolism: Considerations for reducing crop damages. *Scientia Agricola*, 66(1), 136–142. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162009000100020>
- Caverzan, A., Ebone, L. A., Chiomento, J. L. T., & Chavarria, G. (2022). Physiological role of hydrogen sulfide in seed germination and seedling development under stress conditions. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 68(11), 1530–1542. <https://doi.org/10.1080/03650340.2021.1912321>
- Chan, K. X., Phua, S. Y., & Van Breusegem, F. (2019). Secondary sulfur metabolism in cellular signalling and oxidative stress responses. *Journal of Experimental Botany*, 70(16), 4237–4250. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz119>
- Chen, J.-H., Wu, H., Xu, C., Liu, X.-C., Huang, Z., Chang, S., Wang, W., Han, G., Kuang, T., Shen, J.-R., & Zhang, X. (2020). Architecture of the photosynthetic complex from a green sulfur bacterium. *Science*, 370(6519), eabb6350. <https://doi.org/10.1126/science.abb6350>
- Corpas, F. J. (2019). Hydrogen Sulfide: A New Warrior against Abiotic Stress. *Trends in Plant Science*, 24(11), 983–988. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.08.003>
- De Lobo, F. A., De Barros, M. P., Dalmagro, H. J., Dalmolin, Â. C., Pereira, W. E., De Souza, É. C., Vourlitis, G. L., & Rodríguez Ortíz, C. E. (2013). Fitting net photosynthetic light-response curves with Microsoft Excel—A critical look at the models. *Photosynthetica*, 51(3), 445–456. <https://doi.org/10.1007/s11099-013-0045-y>
- Foletto-Felipe, M. D. P., Abrahão, J., Siqueira-Soares, R. D. C., Contesoto, I. D. C., Grizza, L. H. E., De Almeida, G. H. G., Constantin, R. P., Philippsen, G. S., Seixas, F. A. V., Bueno, P. S. A., De Oliveira, M. A. S., Constantin, R. P., Dos Santos, W. D., Ferrarese-Filho, O., & Marchiosi, R. (2023). Inhibition of O-acetylserine (thiol) lyase as a promising new mechanism of action for herbicides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 204, 108127. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108127>
- Gazola, T., Belapart, D., Castro, E. B. de, Cipola Filho, M. L., & Dias, M. F. (2016). Características biológicas de *Digitaria insularis* que conferem sua resistência à herbicidas e opções de manejo. *Científica*, 44(4), 557. <https://doi.org/10.15361/1984-5529.2016v44n4p557-567>

Gilbert, S. M., Clarkson, D. T., Cambridge, M., Lambers, H., & Hawkesford, M. J. (1997). SO₄²⁻ Deprivation Has an Early Effect on the Content of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase and Photosynthesis in Young Leaves of Wheat. *Plant Physiology*, 115(3), 1231–1239. <https://doi.org/10.1104/pp.115.3.1231>

Heap, I. (2024). The International Herbicide-Resistant Weed Database. WeedScience.org. www.weedscience.org

Hirai, M. Y., Fujiwara, T., Awazuwara, M., Kimura, T., Noji, M., & Saito, K. (2003). Global expression profiling of sulfur-starved Arabidopsis by DNA macroarray reveals the role of O⁶-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *The Plant Journal*, 33(4), 651–663. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01658.x>

Hirase, K., & Molin, W. T. (2003). Sulfur assimilation in plants and weed control: Potential targets for novel herbicides and action sites of certain safeners. *Weed Biology and Management*, 3(3), 147–157. <https://doi.org/10.1046/j.1445-6664.2003.00098.x>

Houhou, M., Joutei, K. A., & Louahlia, S. (2018). Biomass Production, Chlorophyll Content and Morphological Parameters Are Affected by Sulfur Deficiency in *Eruca sativa* L.

Jez, J. M. (2019). Structural biology of plant sulfur metabolism: From sulfate to glutathione. *Journal of Experimental Botany*, 70(16), 4089–4103. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz094>

Jobe, T. O., Zenzen, I., Rahimzadeh Karvansara, P., & Kopriva, S. (2019). Integration of sulfate assimilation with carbon and nitrogen metabolism in transition from C₃ to C₄ photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 70(16), 4211–4221. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz250>

Kastori, R., Plesnicar, M., Arsenijevic-Maksimovic, I., Petrovic, N., Pankovic, D., & Sakac, Z. (2000). Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and water relations in young sugar beet plants as affected by sulfur supply. *Journal of Plant Nutrition*, 23(8), 1037–1049. <https://doi.org/10.1080/01904160009382080>

Khanna, K., Sharma, N., Kour, S., Ali, Mohd., Ohri, P., & Bhardwaj, R. (2021). Hydrogen Sulfide: A Robust Combatant against Abiotic Stresses in Plants. *Hydrogen*, 2(3), 319–342. <https://doi.org/10.3390/hydrogen2030017>

Koprivova, A., & Kopriva, S. (2016). Sulfation pathways in plants. *Chemico-Biological Interactions*, 259, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.021>

Li, Q., Gao, Y., & Yang, A. (2020). Sulfur Homeostasis in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 8926. <https://doi.org/10.3390/ijms21238926>

Long, S. P., & Bernacchi, C. J. (2003). Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany*, 54(392), 2393–2401. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg262>

Lunde, C., Zygadlo, A., Simonsen, H. T., Nielsen, P. L., Blennow, A., & Haldrup, A. (2008). Sulfur starvation in rice: The effect on photosynthesis, carbohydrate metabolism,

- and oxidative stress protective pathways. *Physiologia Plantarum*, 134(3), 508–521. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01159.x>
- Machado, A. F. L., Ferreira, L. R., Ferreira, F. A., Fialho, C. M. T., Tuffi Santos, L. D., & Machado, M. S. (2006). Análise de crescimento de *Digitaria insularis*. *Planta Daninha*, 24(4), 641–647. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582006000400004>
- Mall, T., Gupta, M., Dhadialla, T. S., & Rodrigo, S. (2019). Overview of Biotechnology-Derived Herbicide Tolerance and Insect Resistance Traits in Plant Agriculture. Em S. Kumar, P. Barone, & M. Smith (Orgs.), *Transgenic Plants* (Vol. 1864, p. 313–342). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8778-8_21
- Manohar, B., Seema, Sushmita, Sinha, A., & Pandit, S. K. (2018). Biotechnology Applications in Weed Management. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 31(2), 1–4. <https://doi.org/10.9734/CJAST/2018/45888>
- Martarello, D. C. I., Grizza, L., Foletto-Felipe, M. D. P., Mendonça, A. P. D. S., Constantin, R. P., Ferro, A. P., Dos Santos, W. D., Constantin, R. P., Marchiosi, R., & Ferrarese-Filho, O. (2024). Exploring S-Benzyl-L-Cysteine as an O-acetylserine(thiol) Ly-Ase Inhibitor: Effects on Growth, Photosynthesis, and Oxidative Balance of *Ipomoea grandifolia* Plants. <https://doi.org/10.20944/preprints202407.0608.v1>
- Maruyama-Nakashita, A. (2017). Metabolic changes sustain the plant life in low-sulfur environments. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.06.015>
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—A practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- Mendonça, G. S. D., Martins, C. C., Martins, D., & Costa, N. V. D. (2014). Ecophysiology of seed germination in *Digitaria insularis* ((L.) Fedde). *Revista Ciência Agronômica*, 45(4), 823–832. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902014000400021>
- Mondal, S., Pramanik, K., Panda, D., Dutta, D., Karmakar, S., & Bose, B. (2022). Sulfur in Seeds: An Overview. *Plants*, 11(3), 450. <https://doi.org/10.3390/plants11030450>
- Moualeu-Ngangue, D. P., Chen, T., & Stützel, H. (2017). A new method to estimate photosynthetic parameters through net assimilation rate–intercellular space CO₂ concentration (A – C_i) curve and chlorophyll fluorescence measurements. *New Phytologist*, 213(3), 1543–1554. <https://doi.org/10.1111/nph.14260>
- Murchie, E. H., & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, 64(13), 3983–3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>
- Randewig, D., Hamisch, D., Herschbach, C., Eiblmeier, M., Gehl, C., Jurgeleit, J., Skerra, J., Mendel, R. R., Rennenberg, H., & Hänsch, R. (2012). Sulfite oxidase controls sulfur metabolism under SO₂ exposure in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, 35(1), 100–115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02420.x>

- Resurreccion, A. P., Makino, A., Bennett, J., & Mae, T. (2001). Effects of sulfur nutrition on the growth and photosynthesis of rice. *Soil Science and Plant Nutrition*, 47(3), 611–620. <https://doi.org/10.1080/00380768.2001.10408424>
- Ros, R., Cascales-Miñana, B., Segura, J., Anoman, A. D., Toujani, W., Flores-Tornero, M., Rosa-Tellez, S., & Muñoz-Bertomeu, J. (2013). Serine biosynthesis by photorespiratory and non-photorespiratory pathways: An interesting interplay with unknown regulatory networks. *Plant Biology*, 15(4), 707–712. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00682.x>
- Samuilov, S., Brilhaus, D., Rademacher, N., Flachbart, S., Arab, L., Alfarraj, S., Kuhnert, F., Kopriva, S., Weber, A. P. M., Mettler-Altmann, T., & Rennenberg, H. (2018). The Photorespiratory BOU Gene Mutation Alters Sulfur Assimilation and Its Crosstalk With Carbon and Nitrogen Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1709. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01709>
- Shibagaki, N., & Grossman, A. R. (2010). Binding of Cysteine Synthase to the STAS Domain of Sulfate Transporter and Its Regulatory Consequences. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 25094–25102. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.126888>
- Silva, D. J., Alvarez Venegas, V. H., Ruiz, H. A., & Sant'Anna, R. (2003). Translocação e redistribuição de enxofre em plantas de milho e de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(6), 715–721. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000600007>
- Takahashi, H. (2019). Sulfate transport systems in plants: Functional diversity and molecular mechanisms underlying regulatory coordination. *Journal of Experimental Botany*, 70(16), 4075–4087. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz132>
- Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K., & Hell, R. (2011). Sulfur Assimilation in Photosynthetic Organisms: Molecular Functions and Regulations of Transporters and Assimilatory Enzymes. *Annual Review of Plant Biology*, 62(1), 157–184. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103921>
- Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Smith, F. W., Blake-Kalff, M., Hawkesford, M. J., & Saito, K. (2000). The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 23(2), 171–182. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00768.x>
- Vats, S. (2015). Herbicides: History, Classification and Genetic Manipulation of Plants for Herbicide Resistance. In E. Lichtfouse (Org.), *Sustainable Agriculture Reviews* (Vol. 15, p. 153–192). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09132-7_3
- Wasilewska-Dębowska, W., Zienkiewicz, M., & Drozak, A. (2022). How Light Reactions of Photosynthesis in C4 Plants Are Optimized and Protected under High Light Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3626. <https://doi.org/10.3390/ijms23073626>
- Ye, Z. P. (2007). A new model for relationship between irradiance and the rate of photosynthesis in *Oryza sativa*. *Photosynthetica*, 45(4), 637–640. <https://doi.org/10.1007/s11099-007-0110-5>

Zhang, H., Dou, W., Jiang, C.-X., Wei, Z.-J., Liu, J., & Jones, R. L. (2010). Hydrogen sulfide stimulates β -amylase activity during early stages of wheat grain germination. *Plant Signaling & Behavior*, 5(8), 1031–1033. <https://doi.org/10.4161/psb.5.8.12297>

Zhou, H., Akçay, E., & Helliker, B. R. (2019). Estimating C4 photosynthesis parameters by fitting intensive A/Ci curves. *Photosynthesis Research*, 141(2), 181–194. <https://doi.org/10.1007/s11120-019-00619-8>

Zhou, Y. H., & Yu, J. Q. (2006). Allelochemicals and photosynthesis. In M. J. Reigosa, N. Pedrol, & L. González (Eds.), *Allelopathy* (p. 127–139). Kluwer Academic Publishers. https://doi.org/10.1007/1-4020-4280-9_6

Fig. 1. Percentual de germinação (**A**) e GSI (**B**) de *G. max*, *Z. mays*, *E. heterophylla* e *D. insularis* após 7 dias de aplicação de 0 a 5 mM de SBC. Médias ($n = 5 \pm \text{SEM}$) marcadas com um asterisco (*) são estatisticamente diferentes do controle segundo o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Fig. 2. Efeitos no crescimento: Altura da planta (**A**), comprimento da raiz (**B**), peso fresco da parte aérea (**C**), peso fresco da raiz (**D**), peso seco da parte aérea (**E**), peso seco da raiz (**F**) de *G. max*, *Z. mays*, *E. heterophylla* e *D. insularis* cultivadas por 21 dias na presença de 0 a 5 mM de SBC. Médias ($n = 8-12 \pm \text{SEM}$) marcadas com um asterisco (*) são estatisticamente diferentes do controle segundo o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Fig. 3. Fotos de vasos e de *Z. mays* (**A**), *G. max* (**B**), *E. heterophylla* (**C**) e *D. insularis* (**D**) cultivadas por 21 dias na presença de 0 a 5 mM de SBC. A barra de escala preta representa 5 cm.

Fig. 4. Eficiência quântica máxima da fotoquímica do PSII (F_v/F_m) (**A**) e conteúdo de clorofila (índice SPAD) (**B**) de *G. max*, *Z. mays*, *E. heterophylla* e *D. insularis* cultivadas por 21 dias na presença de 0 a 5 mM de SBC. Médias ($n = 8-12 \pm \text{SEM}$) marcadas com um asterisco (*) são estatisticamente diferentes do controle segundo o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Fig. 5. Curvas ajustadas da assimilação líquida pela concentração intercelular de CO_2 (A/C_i) de *G. max* (**A**), *Z. mays* (**B**), *E. heterophylla* (**C**) e *D. insularis* (**D**) cultivadas por 21 dias na presença de 0 a 5 mM de SBC. ($n = 4-5$).

Fig. 6. Taxa máxima de carboxilação da RuBisCo ($V_{C_{\max}}$) (**A**) e taxa máxima de transporte de elétrons ($J_{\max}$) (**B**) das espécies *G. max*, *Z. mays*, *E. heterophylla* e *D. insularis* cultivadas por 21 dias na presença de 0 a 5 mM de SBC. Médias ($n = 4-5 \pm \text{SEM}$) marcadas com um asterisco (*) são estatisticamente diferentes do controle segundo o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Fig. 7. Parâmetros fotossintéticos registrados a uma concentração de CO₂ ambiente (C_a) de 400 µmol mol⁻¹ e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 1400 µmol m⁻²s⁻¹: **A**) condutância estomática (g_s); **B**) assimilação líquida (A); **C**) transpiração (E); **D**) concentração intercelular de CO₂ (C_i); **E**) eficiência máxima da fotoquímica do PSII na luz (F_v'/F_M'); **F**) eficiência operacional do PSII (ΦPSII); **G**) taxa de transporte de elétrons (ETR); **H**) quenching fotoquímico (qP) e **I**) quenching não fotoquímico (qN) de *G. max*, *Z. mays*, *E. heterophylla* e *D. insularis* cultivadas por 21 dias na presença de 0 a 5 mM de SBC. Médias (n = 4-5 ± SEM) marcadas com um asterisco (*) são estatisticamente diferentes do controle segundo o teste de Dunnett (p ≤ 0,1).

Fig. 8. Curvas ajustadas da assimilação líquida (A) pela radiação fotossinteticamente ativa (A/PAR) de *G. max* (**A**), *Z. mays* (**B**), *E. heterophylla* (**C**) e *D. insularis* (**D**) cultivadas por 21 dias na presença de 0 a 5 mM de SBC. (n = 4-5).

Fig. 9. Eficiência quântica aparente (Φ) (**A**) e respiração no escuro (R_D) (**B**) de *G. max*, *Z. mays*, *E. heterophylla* e *D. insularis* cultivadas por 21 dias na presença de 0 a 5 mM de SBC. Médias (n = 4-5 ± SEM) marcadas com um asterisco (*) são estatisticamente diferentes do controle segundo o teste de Dunnett (p ≤ 0,05).

Fig. 10. Parâmetros fotossintéticos registrados a uma concentração de CO₂ ambiente (C_a) de 400 µmol mol⁻¹ e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 2000 µmol m⁻²s⁻¹: **A**) condutância estomática (g_s); **B**) assimilação líquida (A); **C**) transpiração (E); **D**) concentração intercelular de CO₂ (C_i); **E**) eficiência máxima da fotoquímica do PSII na luz (F_v'/F_M'); **F**) eficiência operacional do PSII (ΦPSII); **G**) taxa de transporte de elétrons (ETR); **H**) quenching fotoquímico (qP) e **I**) quenching não fotoquímico (qN) de *G. max*, *Z. mays*, *E. heterophylla* e *D. insularis* cultivadas por 21 dias na presença de 0 a 5 mM de SBC. Médias (n = 4-5 ± SEM) marcadas com um asterisco (*) são estatisticamente diferentes do controle segundo o teste de Dunnett (p ≤ 0,1).

Fig. 11. Atividade da O-acetilserina (tiol) liase (OAS-TL) em folhas (**A**) e raízes (**B**), quantificação de proteínas utilizando o método de Bradford em folhas (**C**) e raízes (**D**) e atividade específica da OAS-TL em folhas (**E**) e raízes (**F**) de *G. max*, *Z. mays*, *E. heterophylla* e *D. insularis* cultivadas por 21 dias na presença de 0 a 5 mM de SBC. Médias ($n = 3-5 \pm \text{SEM}$) marcadas com um asterisco (*) são estatisticamente diferentes do controle segundo o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Figura 1

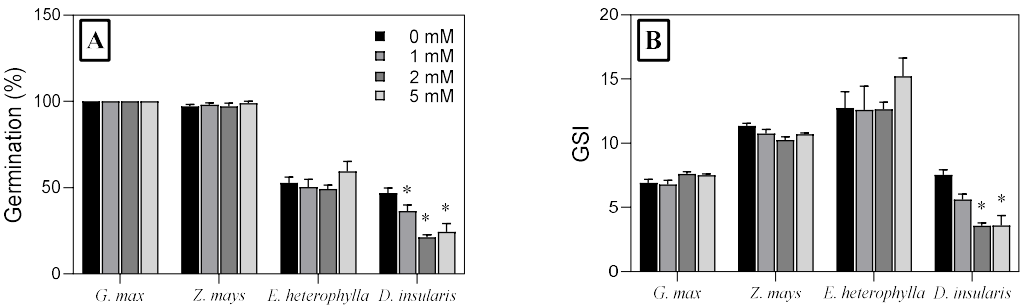


Figure 2

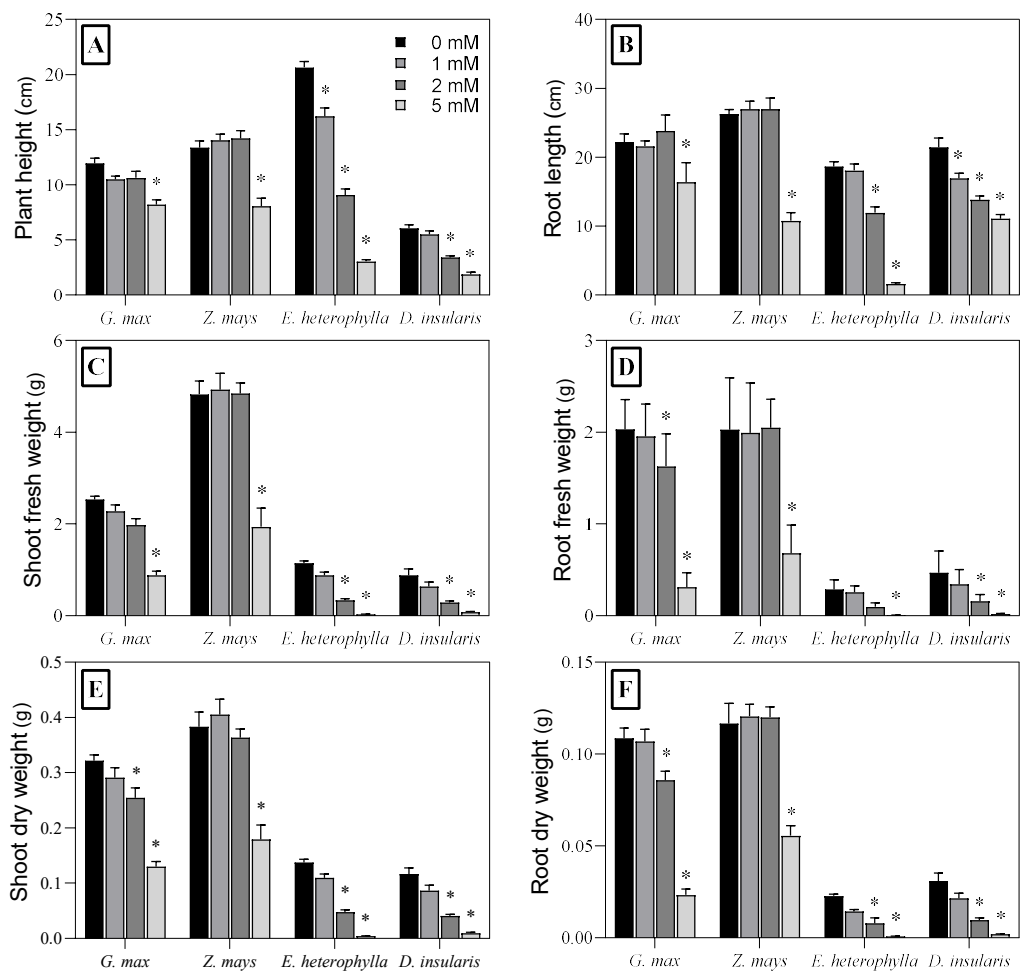


Figura 3

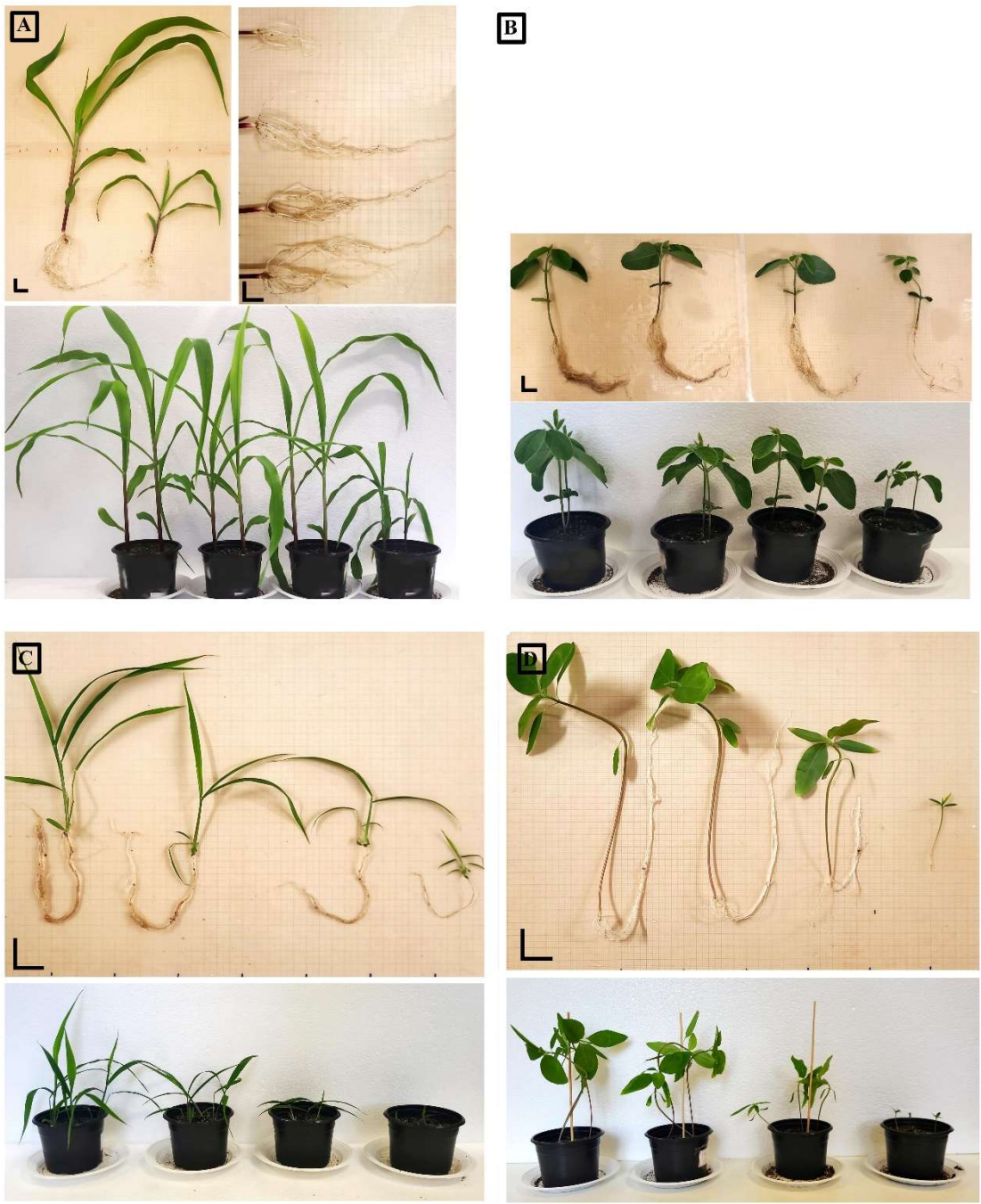


Figura 4

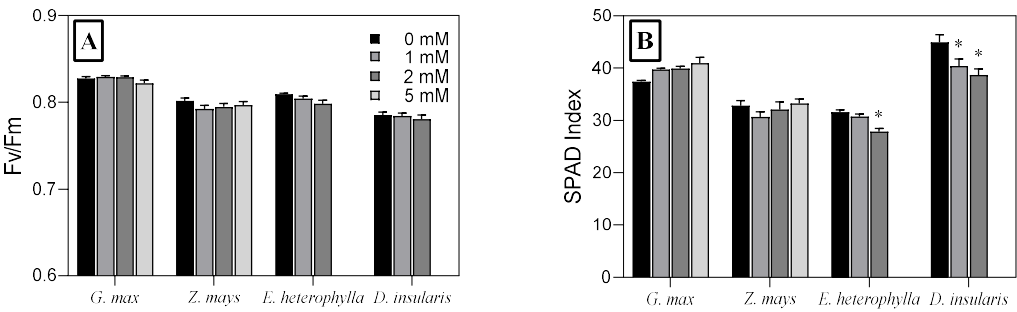


Figura 5

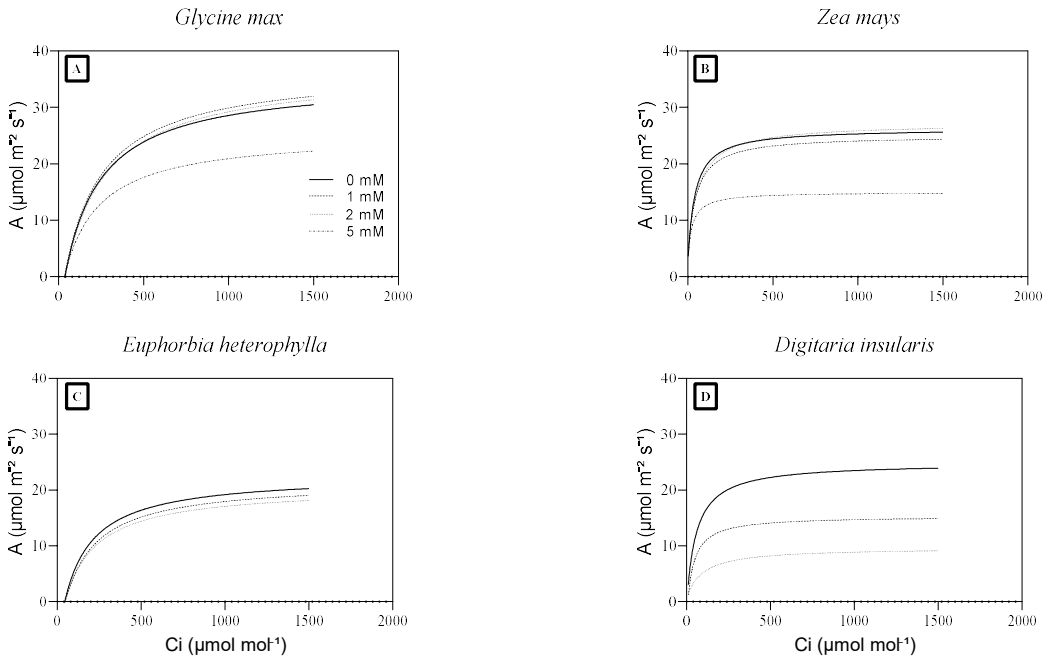


Figura 6

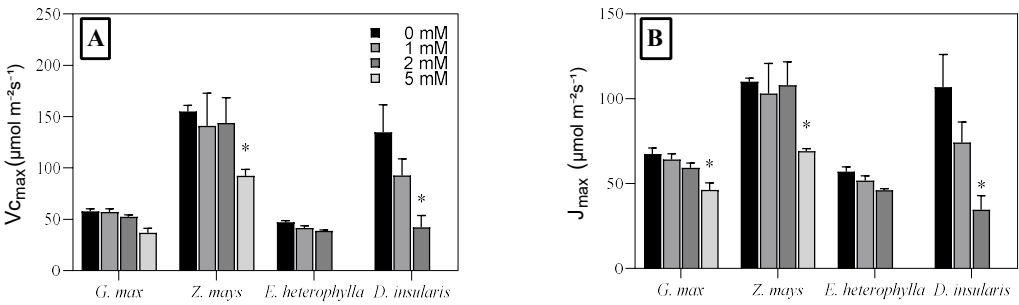


Figura 7

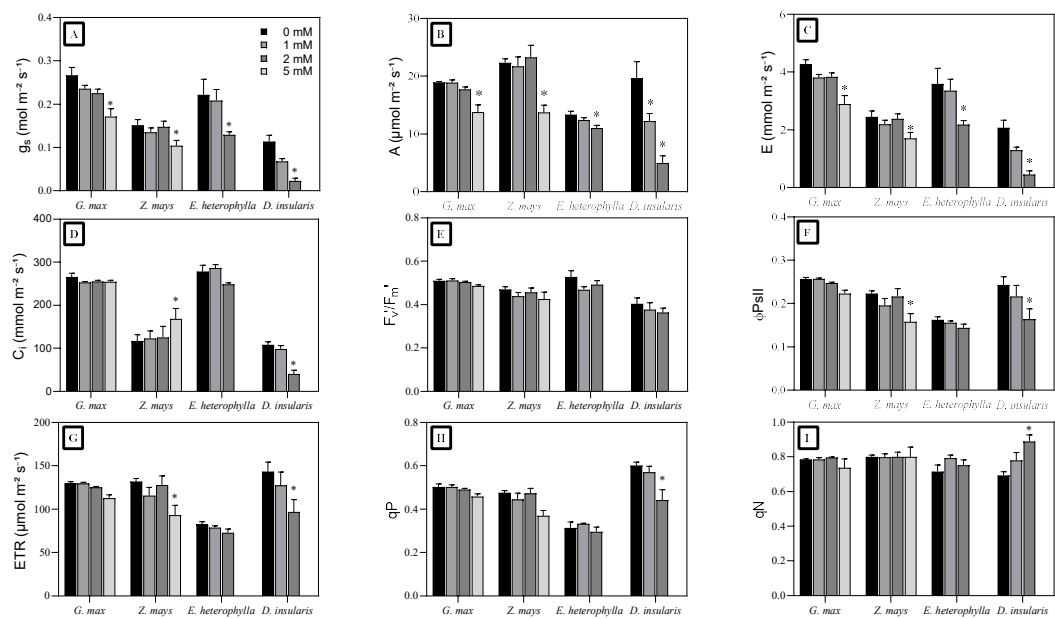


Figura 8

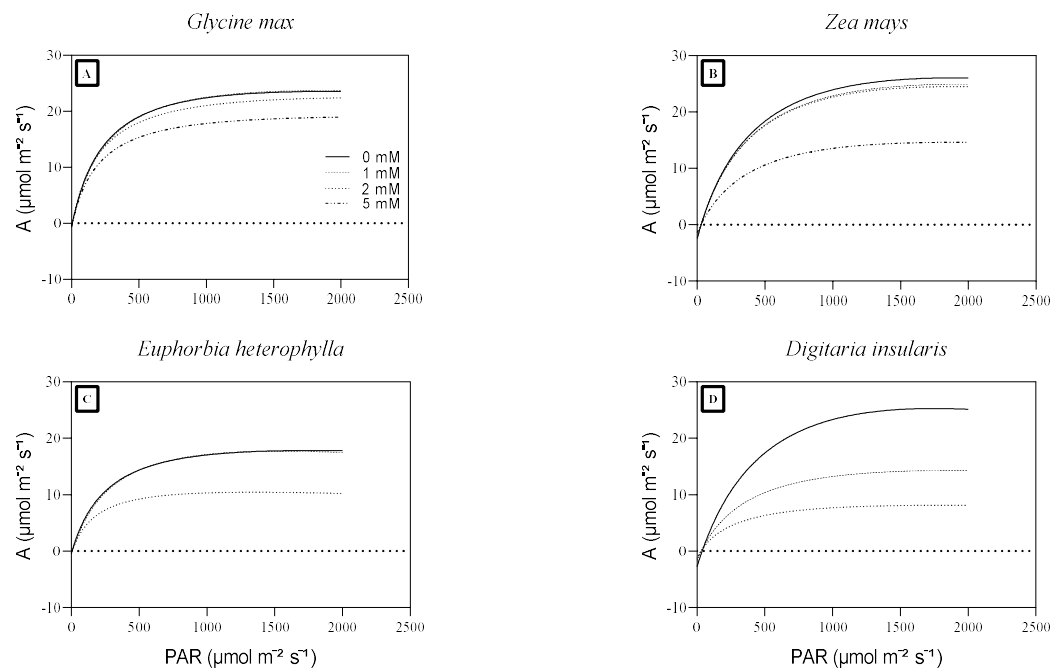


Figura 9

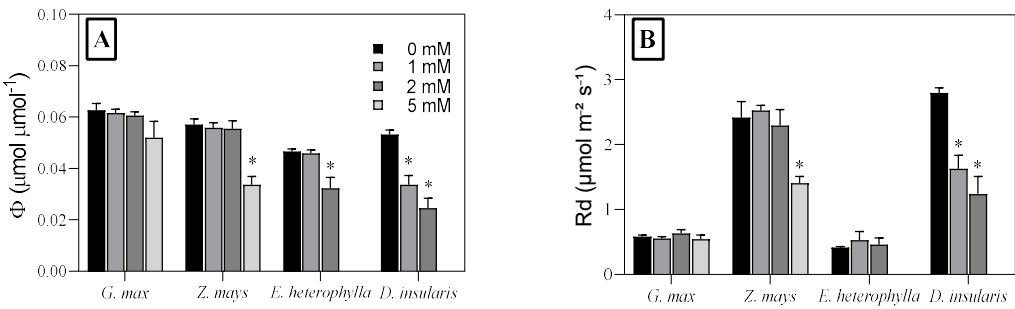


Figura 10

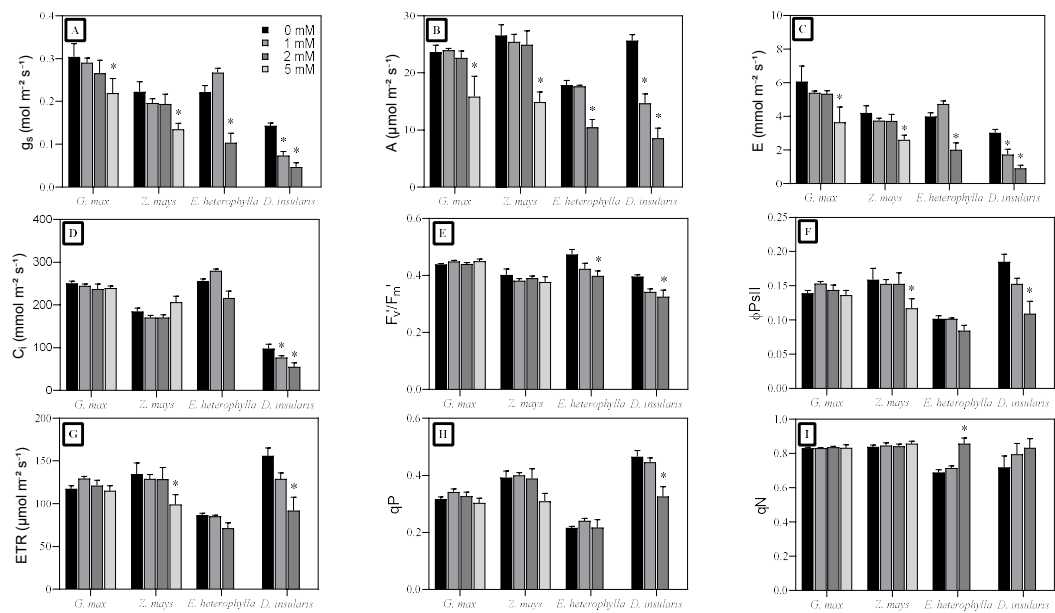


Figura 11

