

## Atividade de enzimas em *Lolium multiflorum* diploide e tetraploide após a aplicação de herbicidas

Wagner Antonio Tamagno<sup>1</sup>, Renata Baldessarini<sup>2</sup>, Nathália Tafarel Sutorillo<sup>1</sup>, Ana Paula Vanin<sup>1</sup>, Rosilene Rodrigues Kaizer Perin<sup>1</sup>, Leandro Galon<sup>2</sup>, Leandro Vargas<sup>3</sup>.

### RESUMO

O azevém é cultivado como forrageira no inverno, principalmente em regiões onde ocorrem baixas temperaturas e conseqüentemente há escassez de pastagens. Essa espécie se torna uma planta daninha de difícil controle para implantação das lavouras de verão por ser resistente aos herbicidas inibidores de EPSPs, ALS e ACCase que são os mais usados para o manejo do azevém. Diante disso objetivou-se com o trabalho avaliar se há respostas diferenciadas das enzimas ascorbato peroxidase (APX) e a  $\delta$ -aminolevulinato desidrogenase (ALA-D) em azevém diploide (2n) e tetraploide (4n) após a aplicação de herbicidas inibidores de ALS, EPSPs e ACCase. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com três repetições. Os tratamentos testados sobre os biótipos de azevém diploide e tetraploide foram: T1-Testemunha sem herbicida, T2-Iodosulfuron (100 g ha<sup>-1</sup>), T3-glyphosate (3 L ha<sup>-1</sup>), T4-clethodim (0,45 L ha<sup>-1</sup>), T5-Haloxyfop-methyl (0,5 L ha<sup>-1</sup>). Os resultados demonstram que a enzima APX é importante para evitar altas taxas de EROs que inibem fortemente a enzima ALA-D, gerando assim, déficits metabólicos a nível fotossintético, evidenciado principalmente no biótipo de azevém tetraploide.

**Palavras-chave:** Enzimas oxidativas; azevém; resistentes; ascorbato peroxidase;  $\delta$ -aminolevulinato desidrogenase.

### INTRODUÇÃO

O azevém (*Lolium multiflorum*) é uma espécie de fecundação cruzada, apresenta ciclo anual, sendo uma *Poaceae* de inverno, utilizada na região Sul do Brasil como forrageira e para fornecimento de palha ao sistema plantio direto (VARGAS et al., 2007). É uma espécie de difícil controle, em lavouras de inverno, em pomares, em vinhedos e para implantação das lavouras de verão (soja, milho e feijão) por ser resistente aos herbicidas inibidores de EPSPs, ALS e ACCase que são os mais usados para o manejo do azevém.

O controle do azevém se dá basicamente pela aplicação de herbicidas seja em dessecações das lavouras ou mesmo na pós-emergência das culturas. Os herbicidas pertencentes aos mecanismos de ação da EPSPs, ALS e ACCase, como o glyphosate, iodosulfuron, clethodim e haloxyfop têm efeito sobre o sistema antioxidante das plantas e, conseqüentemente, podem interferir na atividade de enzimas protetoras, como por exemplo, a ascorbato peroxidase (APX) (SHARMA et al., 2012).

A APX utiliza elétrons do ascorbato para neutralizar cargas e converter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>, atuando concomitantemente com outras enzimas do sistema de defesa antioxidante das células, como a catalase, guaiacol peroxidase e superóxido dismutase (SILVA et al., 2016). Estas enzimas garantem homeostase ao organismo, para que outras possam ter seu funcionamento adequado, como é o caso da  $\delta$ -aminolevulinato desidrogenase ( $\delta$  ALA-D). A ALA-D, é uma enzima importante em plantas e animais, já que está envolvida na síntese de compostos tetrapirrólicos como bilinas, clorofilas e grupamentos heme. Nas plantas a ALA-D atua sobre a biossíntese da clorofila e atua por meio de complexas reações catalisadas também por muitas outras enzimas. A síntese do ácido  $\delta$ -aminolevulínico aminolevulínico ( $\delta$ -ALA) é a primeira reação da biossíntese de clorofila, sendo

<sup>1</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – Campus Sertão/RS.  
Email: [tamagnowagner.99@gmail.com](mailto:tamagnowagner.99@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Erechim/RS.

<sup>3</sup> Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS.

então, o ponto de controle na regulação da formação de clorofila (TANAKA e TANAKA, 2007).

Com este estudo, pretende-se avaliar se há respostas diferenciadas das enzimas ascorbato peroxidase (APX) e a  $\delta$ -aminolevulinato desidrogenase (ALA-D) em azevém diploide (2n) e tetraploide (4n) após a aplicação de herbicidas inibidores de ALS, EPSPs e ACCase.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

A semeadura do azevém diploide resistente a herbicidas e do tetraploide não resistente se deu em vasos plásticos com capacidade para 3 L, preenchidos com solo de lavoura livre de contaminantes. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação da Embrapa Trigo, Passo Fundo, em delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos testados sobre os biótipos de azevém diploide e tetraploide que foram colhidos 36h após a aplicação dos seguintes herbicidas: T1- Testemunha sem herbicida, T2-Iodosulfuron ( $100 \text{ g ha}^{-1}$ ), T3-glyphosate ( $3 \text{ L ha}^{-1}$ ), T4-clethodim ( $0,45 \text{ L ha}^{-1}$ ), T5-Haloxifop ( $0,5 \text{ L ha}^{-1}$ ), aplicados aos 3 meses pós emergência. A aplicação dos herbicidas ocorreu com pulverizador costal de precisão, pressurizado a  $\text{CO}_2$ , equipado com uma ponta de pulverização tipo leque DG 110.02, o que proporcionou a vazão de  $150 \text{ L ha}^{-1}$  de calda herbicida.

O extrato enzimático para a determinação das atividades da enzima APX, foi obtido através da homogeneização de 0,3 g de tecido vegetal verde colhido 5 dias após a aplicação do herbicida em polivinilpirrolidona (PVPP 10%) e 1,5 mL de tampão de extração (TFK 200 mM - pH 7,8), EDTA 10 mM, ácido ascórbico 200 mM e água Milli-Q. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a  $12000 \times g$  por 20 min à  $4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante foi utilizado para mensurar a atividade enzimática e a quantificação das proteínas determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina sérica bovina como padrão. O extrato para a determinação da atividade da ALA-D, foi obtido através da homogeneização do tecido vegetal em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, numa proporção de 1:1 (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 6000 rpm à  $4^\circ\text{C}$  durante 10 min. O sobrenadante foi pré-tratado com 1% de triton X-100 e 0,5 mM de ditioneitol (DTT).

A atividade de ALA-D foi determinada como descrito por MORSCH et al. (2002). O meio de incubação dos ensaios continha tampão Tris-HCl 100 mM, PH 9,0 e o substrato ALA 3,6 mM. O produto da reação foi determinado com o reagente de Erlich a 555 nm, usando um coeficiente de absorção molar de  $6,1 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (SASSA, 1982) para o sal de Erlich-porfobilinogênio. A atividade da APX, seguiu o método de NAKANO e ASADA (1981). A temperatura foi mantida constante à  $27^\circ\text{C}$  por imersão das amostras em banho-maria. A diminuição da absorbância à 290 nm foi acompanhada durante 2 min, com registros em intervalos de 10 em 10 s.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA-one way), com teste *post hoc* de Dunnet, comparando-se os tratamentos herbicidas a testemunha sem herbicida. Todos os testes foram efetuados a  $p < 0,05$ .

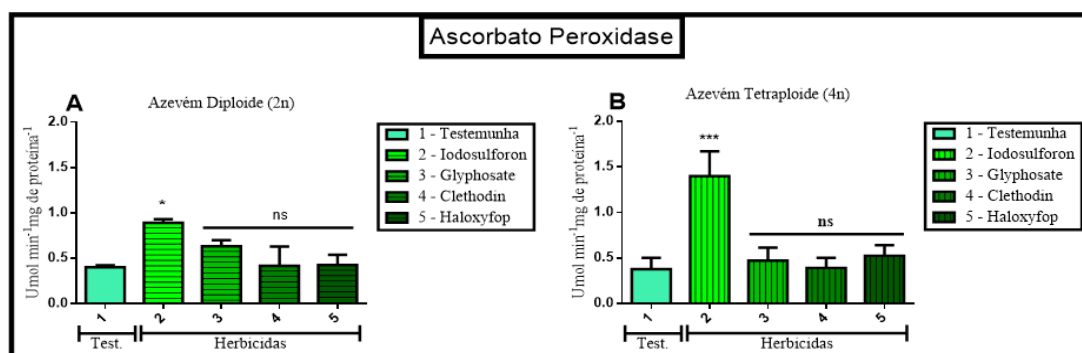
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Aqui, o azevém tetraploide apresentou maior sensibilidade ao uso dos herbicidas, quando comparado ao azevém diploide, considerando os resultados das atividades das enzimas APX e ALA-D (Figuras 1B e 2B). Isto possivelmente se deve ao azevém tetraploide não ser resistente aos herbicidas testados. A enzima APX no azevém diploide (Figura 1A) ao ser tratada com o iodosulfuron apresentou diferenças significativas em relação ao controle (testemunha sem herbicida).

No azevém diploide a atividade da enzima ALA-D não demonstrou diferenças estatísticas significativas ao se comparar o uso de herbicidas (iodosulfuron, glyphosate, clethodim e haloxifop) com o controle (Figura 2A), pois este biótipo é resistente aos herbicidas testados (OLIVEIRA, et,

al. 2014). Isso também pode ter ocorrido devido a sua menor necessidade de nutrientes e, consequentemente, reduzidas atividades metabólicas. Por sua vez, o azevém tetraploide tem maior necessidade de água, devido principalmente ao aumento do tamanho nuclear e celular (BALOCCHI e LÓPEZ, 2009).

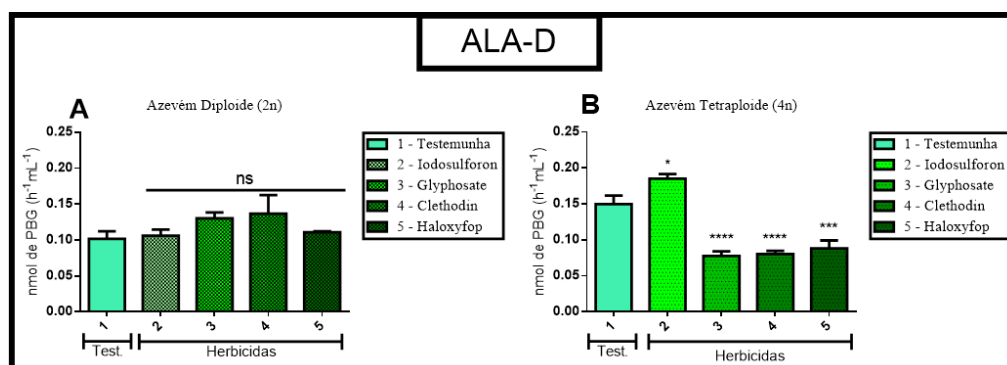
A atividade da APX só foi ativada no grupo tratado com iodosulfuron no azevém tetraploide e no diploide (Figuras 1A e B). Esta ativação da APX evidencia seu efeito como redutor de EROs, o que impediu o decréscimo da atividade da ALA-D, quando tratado com o mesmo herbicida. Este comportamento não foi observado nos demais tratamentos, que, em contrapartida, tiveram a redução da atividade da ALA-D. O aumento da atividade da APX em plantas é dado devido a várias condições de estresse (GILL e TUTEJA, 2010), para combater o acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tecidos, cuja função também é evidenciada em outras enzimas como a catalase.



**Figura 1** - Efeitos dos diferentes herbicidas sobre a atividade da enzima Ascorbato peroxidase em azevém diploide – 2n (A) e tetraploide – 4n (B). Valores expressos por médias ± erro padrão.

A enzima  $\delta$  aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D), é um importante biomarcador do sistema antioxidante, pois é afetada diretamente pelos altos níveis de estresse oxidativo (FOLMER et al., 2003). O estresse oxidativo modula negativamente a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D, sendo que a principal causa da sua sensibilidade é relativa à sua composição química, que contém grupos sulfidrílicos que são facilmente oxidados pelas EROs (FARINA et al., 2001). Isso, possivelmente explica a maior inibição desta enzima nos grupos tratados com os herbicidas glyphosate, clethodim e haloxyfop no azevém tetraploide, possivelmente por ele ser suscetível a estes herbicidas.

A atividade da enzima ALA-D foi inibida em três dos quatro herbicidas em que o azevém tetraploide foi tratado (Figura 2B). Os herbicidas que promoveram redução da atividade da ALA-D em relação ao controle foram glyphosate (48%), clethodim (46%) e haloxyfop (41%). Esta inibição pode ocasionar problemas na formação do grupo heme da planta, acarretando déficits fotossintéticos, uma vez que esta enzima está ligada à formação de clorofila. Já o tratamento com o iodosulfuron ocasionou aumento na atividade da enzima de 24%, quando comparado com o controle.



**Figura 2** - Efeitos dos herbicidas sobre a atividade da enzima ALA-D em azevém diploide – 2n (A) e tetraploide – 4n (B). Valores expressos por médias ± erro padrão.

## CONCLUSÃO

Percebeu-se com este trabalho, que a ativação da APX, principalmente no grupo tratado com Iodosulfuron, teve papel essencial na remoção de EROs após a aplicação do herbicida, tanto no grupo tetraploide quanto no diploide de azevém. Ainda neste grupo evidenciou-se a modulação positiva da ALA-D, resultado este que não é observado nos outros grupos, quando a APX teve sua atividade reduzida e também assim modulando negativamente a ALA-D. Os dados elucidam a importância das enzimas antioxidantes, com função de manter a homeostase do organismo e garantir condições bioquímicas mínimas para suas atividades metabólicas basais.

## AGRADECIMENTOS:

Ao IFRS, a Embrapa Trigo, a UFFS, o CNPq e a FAPERGS pela concessão de bolsas e de apoio financeiro para execução da pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALOCCHI, O. A.; LÓPEZ, I. L. Herbage production, nutritive value and grazing preference of diploid and tetraploid perennial ryegrass cultivars (*Lolium perenne* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research*, Chillán, v. 69, n.3, p. 331-339, 2009.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- FARINA, M.; FOLMER, V.; BOLZAN, R.C.; ANDRADE, L.H.; BRAGA, A.L.; ROCHA, J.B. al. Selenoxides inhibit d-aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicology Letters*, Cidade do México, v.119, n.1, p.27-37, 2001.
- FOLMER, V.; SOARES, J.C.; GABRIEL, D.; ROCHA, J. A high fat diet inhibits delta-aminolevulinic acid dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). *The Journal of Nutrition*, Rockville, v.133, n.7, p.2165-2170, 2003.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, Amesterdã, v.48, n.12, p.909-930, 2010.
- MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C.; MARTINS, A.F. Effects of cadmium, lead, mercury and zinc on  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity from radish leaves. *Biologia Plantarum*, Praga, v.45, n.1, p.85-89, 2002.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, Oxford, v.22, n.5, p.867-880, 1981.
- SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme*, v. 28, p. 133-145, 1982. SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 20, n. 12, p. 1-26, 2012.
- SILVA, P. A. et al. Leaf gas exchange and multiple enzymatic and non-enzymatic antioxidant strategies related to drought tolerance in two oil palm hybrids. **Trees**, v. 30, n. 1, p. 203-214, 2016.
- TANAKA, R.; TANAKA, A. The biosynthesis of tetrapyrroles in superior plants. *Annual Review of Plant Biology*, California, v.58, p.321-346, 2007.
- VARGAS, L.; MORAES, R.M.A.; BERTO, C.M. Herança da resistência de azevém (*Lolium multiflorum*) ao glyphosate. *Planta Daninha*, Viçosa, v.25, n. 3, p. 567-571, 2007.
- OLIVEIRA L. V. et al. Características produtivas e morfofisiológicas de cultivares de azevém. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 2014, 44.2: 191-197.