

Atividades de CAT e TBARS em azevém diploide e tetraploide frente à aplicação de diferentes herbicidas

Nathália Tafarel Sutorillo¹, Wagner Antonio Tamagno¹, Ana Paula Vanin¹, Wallace Santini¹

Rosilene Kaizer Perin¹, Renata Baldessarini², Leandro Galon², Leandro Vargas³

RESUMO

A cultivar de azevém (*Lolium multiflorum*), apresenta ciclo produtivo precoce, o que permite a colheita de sementes ou ressemeadura natural e, ainda, posteriormente, a integração com culturas anuais de estação quente. O manejo inadequado de azevém pode resultar em prejuízos no rendimento de cereais de inverno e de milho. Esse estudo tem como objetivo avaliar a atividade enzimática da enzima Catalase, importante para a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio, e avaliar a Peroxidação Lipídica através dos níveis de TBARS que manifesta grande importância para o crescimento e desenvolvimento vegetal. As análises se deram em duas variedades de azevém, diploide e tetraploide tratados com quatro herbicidas utilizados no controle desta planta como daninha em outras culturas.

Palavras-chave: Catalase; peroxidação lipídica; estresse oxidativo.

INTRODUÇÃO

A espécie *Lolium multiflorum* Lam, também conhecida como azevém, é uma gramínea anual ou bianual. Caracterizada pela sua elevada produção, facilidade de ressemeadura natural e rápida instalação, sendo também uma cultura muito apetecível pelos animais, com grande potencial produtivo na Região Sul do Brasil, formando populações densas. Dentre as espécies de azevém, ocorrem cultivares com diferentes cargas genéticas, como cultivares diploides ($2n$) e tetraploides ($4n$). De forma natural, o azevém (anual ou perene), encontra-se na forma diploide ($2n=2x=14$ cromossomos). O desenvolvimento de plantas tetraploides ($2n=4x=28$ cromossomos) é possível através do melhoramento genético, por meio do emprego da técnica de duplicação cromossômica pelo uso de alcaloides (CONFORTIN, 2009).

As plantas daninhas mais importantes e mais competitivas em uma lavoura são aquelas que pertencem à mesma família botânica da cultura, devido ao fato delas terem as mesmas necessidades de recursos e também por explorarem o mesmo nicho que a cultura (AGOSTINETTO et al., 2008). As plantas daninhas são responsáveis por grandes problemas nas lavouras, pois competem com as culturas de interesse por nutrientes, espaço e luz, o que pode ocasionar uma grande redução da produtividade. Esta competição de plantas daninhas com culturas de interesse tem sido considerada a principal causa biótica que gera perdas de produtividade de grãos e da qualidade dos mesmos (DÉLYE et al., 2013). Para resolver esse problema torna-se necessária a adoção de algum método de manejo para o controle das plantas daninhas infestantes das culturas. Dentre os métodos de manejo, o químico é o mais utilizado nas lavouras brasileiras através do uso de herbicidas, em função da praticidade, eficiência e menor custo quando comparado a outros métodos de controle (MINGUELA; CUNHA, 2010). Para o controle químico do azevém são utilizados principalmente, herbicidas com os princípios ativos de Iodosulfuron, clethodim, Haloxifop e Glyphosate.

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – campus Sertão/RS.

² Universidade Federal da Fronteira Sul – campus Erechim/RS.

³ Embrapa Trigo – Passo Fundo/RS. Email: nathytafarel@hotmail.com

A catalase é uma enzima tetramérica contendo heme, é a única entre as enzimas antioxidantes que não precisa de um agente redutor (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014). Além disso, também pode ser encontrada em cloroplastos e mitocôndrias (MHAMDI et al., 2010). A CAT, é uma enzima importante para a redução de H₂O₂ tóxico, em água e oxigênio, sendo de primeira entrada no processo antioxidante enzimático em relação à Ascorbato Peroxidase, por exemplo, cuja função é semelhante (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014). A avaliação da atividade da catalase, associada à análise da peroxidação lipídica contribuem para determinar as respostas dos processos metabólicos da planta após o uso de diferentes herbicidas.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de azevém diploide e tetraploide foram semeadas em vasos de 5 litros com solo de lavoura, e foram cultivadas em casa de vegetação, na Embrapa Trigo de Passo Fundo. A correção e adubação do solo foi efetuada de acordo com a análise físico-química, seguindo-se as recomendações técnicas para a cultura do trigo (ROLAS, 2016). Foram realizadas três repetições totalmente casualizadas. As aplicações de herbicidas seguiram as doses de acordo com o receituário indicado e aplicado na cultura pós emergentes com aplicador costal.

A atividade da CAT foi determinada através do método de Havir e McHale (1987) com modificações. O meio de reação continha tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), H₂O₂ 12,5 mM, Água Milli-Q e extrato enzimático. A temperatura foi mantida constante à 27°C por imersão das amostras em banho-maria. O decréscimo na absorbância pelo consumo de H₂O₂ foi medido à 240 nm (ANDERSON et al., 1995), de 10 em 10 segundos por 2 minutos. A atividade enzimática foi expressa em Unidades/mg de proteína/min.

Os teores de MDA foram estimados segundo metodologia proposta por Hodges et al. (1999) por meio da quantificação de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foram homogeneizadas 0,3 g de tecido foliar em 1,5 mL de etanol 80%, seguidos de centrifugação a 3.000 g por 10 minutos à temperatura ambiente. Uma parte do sobrenadante (0,5 mL) foi misturado com 0,5 mL de solução de TBA+ (ácido tricloacético a 100%, hidroxitolueno butilado 0,1 e 1% de ácido tiobarbitúrico e água Milli-Q) e outra alíquota do sobrenadante (0,5 mL) foi misturado em 0,5 mL de solução de TBA- (ácido tricloacético a 100%, hidroxitolueno butilado 0,1% e água Milli-Q) em tubos de ensaios. As amostras então foram agitadas e incubadas em banho-maria durante 25 min à 95°C. Após o resfriamento, foram feitas as leituras espectrofotométricas utilizando leitor de placas de ELISA nos comprimentos de ondas de: 440 nm, 532 nm e 600 nm. Os equivalentes de MDA (TBARS) foram calculados com a seguinte fórmula: $27 [(Abs\ 532 + TBA) - (Abs\ 600 + TBA) - (Abs\ 532 - TBA - Abs\ 600 - TBA)] = A [(Abs\ 440 + TBA - Abs\ 600 + TBA) \times 0,0571] = BTBARS\ (nmol/ml) = (A - B/157.000) \times 106$. A razão entre o conteúdo de TBARS e o peso seco da amostra foi calculada. Os dados foram expressos em nmol/mL.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software GraphPad Prism 7.0, em havendo significância aplicou-se o teste de Dunnet $p < p\ 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Evidenciou-se uma redução da peroxidação lipídica nos grupos tratados com glyphosate, tanto na variedade diploide, (gráfico 1A) de 35,64%, quanto na tetraploide (gráfico 1B) de 43,13%. Isto pode estar relacionado com a possível resistência destas variedades a este herbicida. Porém, na variedade diploide tratada com Halaxifop (gráfico 1A), evidenciou-se um aumento na peroxidação lipídica de 41,88% em relação ao controle. Pode-se perceber que no azevém diploide aconteceu uma diminuição na atividade enzimática no tratamento com glifosato e houve um aumento da peroxidação lipídica no tratamento com Halaxifop. No azevém tetraploide a peroxidação lipídica também foi diminuída no tratamento com o glifosato. A peroxidação lipídica nas plantas tratadas indica que a produção de ROS colocou a planta sob estresse oxidativo.

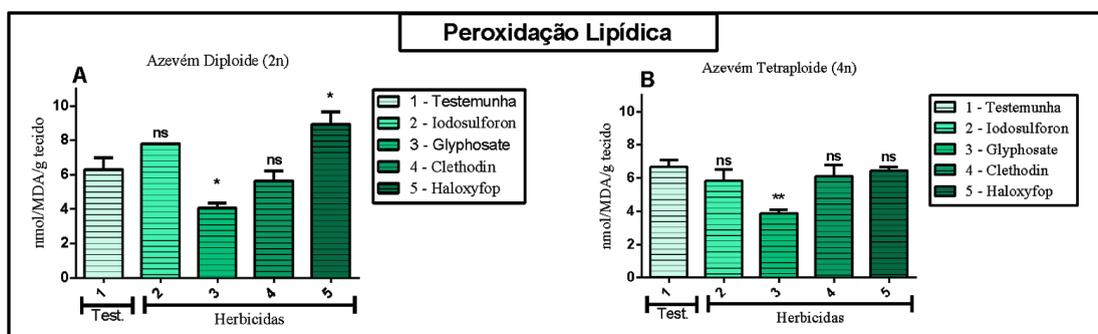


Gráfico 1 – Efeitos dos diferentes herbicidas sobre a atividade de Peroxidação Lipídica em azevém diplóide (A) e tetraploide (B). Valores expressos por médias +- erro padrão de três independentes experimentos. As comparações estatísticas foram submetidas a teste estatístico ANOVA – one way com teste *post hoc* de Dunnet com valor de $p < 0,05$, onde * significa diferença estatística em relação ao grupo testemunha (1).

O peróxido de hidrogênio e outras EROs atuam como moléculas sinalizadoras sendo benéficas em baixas concentrações e prejudiciais quando em excesso. A APX e a CAT são as duas enzimas mais importantes dentre os componentes de desintoxicação do H_2O_2 , a APX utiliza o ascorbato como seu doador de elétrons para produzir H_2O_2 à água, fazendo parte do ciclo-ascorbato-glutationa (SHIGEOKA et al, 2002). Segundo Polle (2001), esse ciclo é uma via eficiente para plantas que apresentam disponível o H_2O_2 em alguns compartimentos celulares onde não existe catalase presente como nos cloroplastos. Pode-se evidenciar que houve aumento da atividade da enzima catalase nos grupos tratados com Iodosulfurone clethodim (figura 2, A). Enquanto evidenciou-se redução na variedade tetraploide (gráfico 2, B) nos grupos tratados com Iodosulfurone e Glyphosate.

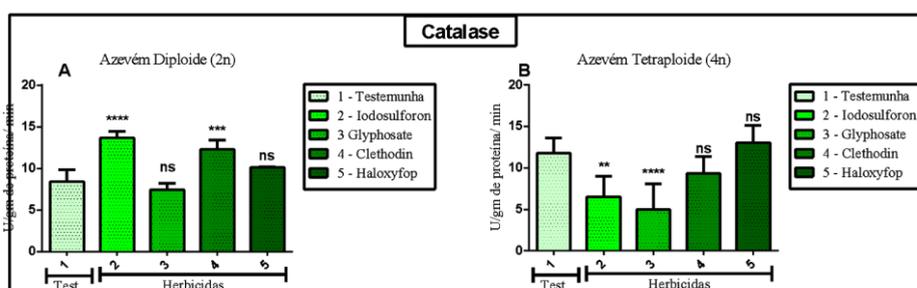


Gráfico 2 – Efeitos dos diferentes herbicidas sobre a atividade da enzima Catalase em azevém diplóide (A) e tetraploide (B). Valores expressos por médias +- erro padrão de três independentes experimentos. As comparações estatísticas foram submetidas a teste estatístico ANOVA – one way com teste *post hoc* de Dunnet com valor de $p < 0,05$, onde * significa diferença estatística em relação ao grupo testemunha (1).

A Catalase é uma enzima que possui diferentes isoformas em vegetais, tem a função de neutralizar o H_2O_2 em água e oxigênio molecular e está presente nos peroxissomos e glioxisomos.

CONCLUSÃO

As análises realizadas no azevém concluem, um aumento significativo na atividade das enzimas nos tratamentos Iodosulfuron e clethodim isso ocorreu pois geralmente quando o H_2O_2 é produzido nos cloroplastos, este é eliminado pelas enzimas APX. Já no azevém tetraplóide aconteceu o contrário a CAT teve sua atividade diminuída em relação ao controle nos tratamentos Iodosulfuron e Glyphosate, sua atividade reduzida pode prejudicar a síntese de compostos tetrapirrólicos e, acabar reduzindo a síntese de enzimas como a CAT e peroxidases que tem tais compostos (heme) na sua estrutura. Destaca-se também que azevém diplóide é resistente EPSPs, ALS e ACCase por isso que a enzima tetraploide tem maior sensibilidade.

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

VASCONCELOS, M. C. C.; SILVA, A. F. A. S.; LIMA, R. L. Interferência de Plantas Daninhas sobre Plantas Cultivadas. ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido, v. 8, n. 1, p. 01-06, 2012

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. Guia de herbicidas. 6. ed. Londrina: Edição dos autores, 2011.

BALOCCHI, O. A.; LÓPEZ, I. L. Herbage production, nutritive value and grazing preference of diploid and tetraploid perennial ryegrass cultivars (*Lolium perenne* L.).

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2017.

FARINA, M. et al. Selenoxides inhibit d-aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicology Letters**, v. 119, n. 1, p.27-37, 2001.