

ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM *Euphorbia heterophylla* L. PELA APLICAÇÃO DO HERBICIDA SAFLUFENACIL

XAVIER, E. (UTFPR, Pato Branco/PR - elo231@hotmail.com), TREZZI, M. M. (UTFPR, Pato Branco/PR - trezzim@gmail.com), OLIVEIRA, M. C. (UTFPR, Pato Branco/PR - marisa_olive@yahoo.com.br), DIESEL, F. (UTFPR, Pato Branco/PR - francielli_diesel@hotmail.com), BRUSAMARELLO, A. P. (UTFPR, Pato Branco/PR - antoniopedro1991@hotmail.com), GALLON, M. (UTFPR, Pato Branco/PR - mtgallon90@yahoo.com.br), GALON, L. (UFFS, Campus Erechim-RS - galonleandro@ig.com.br)

RESUMO: As enzimas antioxidantes são importantes no processo de defesa das plantas, quando ocorre o estresse oxidativo. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), em biótipos de *E. heterophylla* suscetível (S) e com resistência múltipla aos inibidores da ALS/PROTOX (R), pela aplicação do herbicida saflufenacil, inibidor da PROTOX. Para tanto, efetuou-se análise da atividade da enzima SOD extraída de plantas dos biótipos Vitorino, Bom Sucesso do Sul, Medianeira e Vilhena (com resistência múltipla aos inibidores da ALS e da PROTOX) e de um biótipo S. Os tratamentos consistiram na aplicação do herbicida saflufenacil nas proporções de doses comerciais equivalentes a 0x, 0,16x, 0,41 e 1x para o biótipo S e 0x, 1x, 3,1x, 9,4x para os biótipos R. A enzima SOD dos biótipos Suscetível, Medianeira, Vitorino, Vilhena e Bom Sucesso do Sul apresentaram aumentos na atividade pela aplicação das doses do herbicida saflufenacil. Os biótipos resistentes Medianeira, Vitorino e Bom Sucesso do Sul apresentam atividade da SOD superior ao do biótipo Suscetível na dose 1x. E pode-se afirmar que a atividade da SOD pode ser um dos mecanismos envolvidos na resistência ao saflufenacil.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes, estresse oxidativo, herbicida.

INTRODUÇÃO

Os herbicidas inibidores da PROTOX são mecanismos indutores de estresse oxidativo. Estes, nas plantas, inibem a enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX), deste modo, a protoporfirina IX produzida neste processo, na presença de luz e oxigênio, é oxidada, formando radicais livres como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que causam a peroxidação de lipídios e conseqüente estresse oxidativo (DEVINE et al., 1993). Este estresse desencadeia várias respostas, desde alterações na expressão gênica e metabolismo celular até variações na taxa de crescimento e produção de biomassa (SOARES; MACHADO, 2007).

As plantas possuem sistemas de defesa contra os estresses ambientais que envolvem a formação de EROs, entre os quais destacam-se os antioxidantes lipossolúveis associados às membranas, os redutores hidrossolúveis, e as enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, glutatona redutase, catalases e peroxidases, entre outras (FERREIRA, 2007).

A superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) é considerada a primeira linha de defesa contra os danos causados pelas EROs. Ela atua dismutando o $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (ALSCHER et al., 2002), fazendo parte do mecanismo central de defesa dos organismos, evitando a formação do radical hidroxila (OH^{\cdot}) (LEÓN et al., 2002). O OH^{\cdot} tem um grande potencial oxidativo atacando rapidamente e sem discriminação qualquer macromolécula, levando a sérios danos celulares (SCANDALIOS et al., 2000).

Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar a atividade da enzima superóxido dismutase, em biótipos de *E. heterophylla* suscetível e com resistência múltipla aos inibidores da ALS/PROTOX, pela aplicação do herbicida saflufenacil, inibidor da PROTOX.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Vegetal da UTFPR Câmpus Pato Branco. Foram utilizados biótipos de *E. heterophylla* suscetível (S) e com resistência múltipla aos inibidores da ALS/PROTOX (R). Os tratamentos utilizados para as atividades das enzimas para o biótipo S foram constituídos por quatro proporções do herbicida saflufenacil, inibidor da PROTOX (0x, 0,16x, 0,41 e 1x), correspondentes às concentrações de 0, 6, 14 e 35 g i.a.ha⁻¹. Os tratamentos dos biótipos resistentes (R) foram arranjos em fatorial 4 x 4, sendo, respectivamente, o fator biótipos (Vitorino, Bom Sucesso do Sul, Medianeira e Vilhena), e as proporções de saflufenacil (0x, 1x, 3,1x e 9,4x) correspondentes às concentrações de 0, 35, 107 e 328 g i.a.ha⁻¹.

As análises bioquímicas iniciaram com a coleta de amostras da parte aérea das plântulas de *E. heterophylla* cultivadas em casa de vegetação. As coletas ocorreram nos momentos 0, 24, 48 e 72 horas após a aplicação (HAA) dos tratamentos, através do corte das plantas rente ao solo, com imediata identificação, envolvimento em papel alumínio e congelamento em nitrogênio líquido (-196°C). Após, foram levadas ao laboratório, onde foram armazenadas em freezer a -40 °C.

Para a obtenção do extrato protéico/enzimático, foi utilizado de 0,2 a 1,0 g de material vegetal de cada tratamento, macerado em almofariz (previamente resfriado em geladeira), com nitrogênio líquido. A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi determinada pela inibição da foto-redução do cloreto de nitrotetrazólio azul (NBT). A atividade específica da SOD foi expressa em U µg⁻¹ de proteína. Esta metodologia foi adaptada de Giannopolitis & Ries (1977); Beauchamp & Fridovich (1971) e Del Longo et al. (1993) e a quantificação de

proteínas foi pelo método de Bradford (1976). Os dados foram submetidos à análise da variância, pelo teste F ($p < 0,05$). As médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi verificada interação significativa para o biótipo S entre épocas e doses. E para os biótipos R ocorreu interação significativa entre biótipos, épocas e doses. Para o herbicida saflufenacil, em geral, observaram-se que as maiores atividades da SOD, para as doses testadas, foram obtidas 48 e 72 HAA (Figura 1). Os biótipos Vitorino e Bom Sucesso do Sul apresentaram atividades máximas, para as condições do ensaio, com a dose 0x na avaliação efetuada 24 HAA. Isto, provavelmente, pode ser decorrente da característica genética destes biótipos de apresentar alta atividade da SOD constitutivamente (Figura 1 D e E).

Já os biótipos Medianeira e Vilhena (Figura 1 B e C) apresentaram atividade da SOD crescente e/ou constante pelas doses utilizadas no decorrer do tempo após a aplicação, com máximas atividades em 72 HAA. A maior atividade da enzima no sistema foi observada com o Bom Sucesso do Sul ($948 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína), na dose 0x em 24 HAA (Figura 1 E).

O biótipo S apresentou, quando submetido às menores doses, atividade semelhante à testemunha (sem herbicida), porém, quando as doses foram elevadas para 0,41x e 1x, ocorreram aumentos, com picos detectados em 48 HAA (Figura 1 A), com a maior atividade observada com a dose 1x, ($765 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína), o mesmo ocorrendo com o biótipo Bom Sucesso do Sul ($828 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína). A similaridade do comportamento do S e Bom Sucesso do Sul possivelmente se deve à maior produção de $\text{O}_2^{\cdot -}$ por estes biótipos, e a maiores concentrações iniciais da enzima. Já os biótipos Medianeira, Vilhena e Vitorino apresentaram máximas atividades, nesta mesma dose, mas em 72 HAA, de $919 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína, $756 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína e $818 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína, respectivamente.

De maneira simplificada, para o herbicida saflufenacil, os biótipos S e R podem ser classificados, levando-se em consideração os valores médios da SOD, em ordem decrescente como: Bom Sucesso do Sul > Medianeira > Vitorino > S > Vilhena .

Existem trabalhos que mostram correlações entre resistência de plantas ao estresse oxidativo, gerado por herbicidas e a atividade da SOD (CASANO et al., 1999). Estudos demonstram que a SOD tem ação contra o estresse oxidativo induzido pelo herbicida oxyfluorfen (inibidor da PROTOX) em plantas de soja (CATANEO et al., 2005).

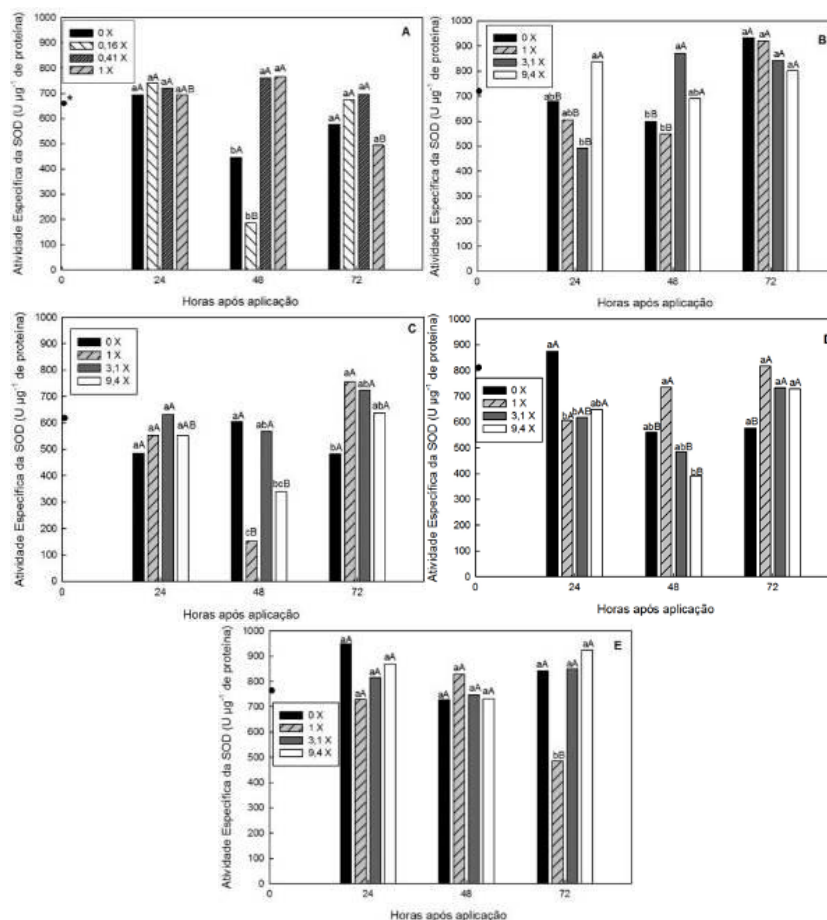


Figura 1 - Atividade da enzima SOD ($\text{U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína), 24, 48 e 72 HAA de saflufenacil. (A) Suscetível, (B) Medianeira, (C) Vilhena, (D) Vitorino e (E) Bom Sucesso do Sul, Médias seguidas de mesma letra minúscula (dose dentro de período) e maiúscula (período dentro de dose) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * A atividade média dos biótipos, antes da aplicação dos herbicidas.

A diminuição da atividade da SOD, com o decorrer do tempo após aplicação, como observado para o biótipo S e para o Bom Sucesso do Sul, na dose 1x do saflufenacil (Figura 1 A e E), pode ser atribuída a inativação da enzima por H_2O_2 que é produzido em diferentes compartimentos celulares onde a SOD catalisa a dismutação dos radicais $\text{O}_2^{\cdot-}$ (HASSAN & ALLA 2005). A SOD no sistema de defesa antioxidante pode depender, pelo menos em parte, do efeito de remoção de H_2O_2 do sistema. Enquanto o aumento da atividade da SOD, pode ser atribuída a uma maior produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (JANICKA et al., 2008), devido ao estresse oxidativo gerado pela ação herbicida.

CONCLUSÕES

A enzima SOD dos biótipos Suscetível, Medianeira, Vitorino, Vilhena e Bom Sucesso do Sul apresentaram aumentos na atividade pela aplicação das doses do herbicida saflufenacil.

Com a dose 1x, comum a todos os biótipos, a atividade da SOD dos biótipos R Bom Sucesso do Sul, Vitorino e Medianeira, foram superiores ao biótipo S. E pode-se afirmar que a atividade da SOD pode ser um dos mecanismos envolvidos na resistência ao saflufenacil.

AGRADECIMENTO

Ao CNPq, a CAPES e a UTFPR, pela concessão de bolsas e auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSCHER, R. G. et al. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1331–1341, 2002.

BRADFORD, M. 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, p. 248-254, 1976.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.

CASANO, L.M. et al. Leaf age and paraquat concentration dependent effects on the levels of enzymes protecting against photooxidative stress. **Plant Science**, v. 149, p.13-22. 1999.

CATANEO, A. C. et al. Atividade de superóxido dismutase em plantas de soja (*Glycine max* L.) cultivadas sob estresse oxidativo causado por herbicida. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 4, p. 23 -31, 2005.

DEVINE, M. et al. Other herbicidal interaction with photosynthesis. **Physiology of herbicide action**. New Jersey: Prentice-Hall, 1993.

DEL LONGO, O. et al. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, v. 34, p.1023-1028, 1993.

FERREIRA, L. C. **Ação protetora do óxido nítrico em plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill) submetidas ao lactofen**. 2007. 155P. Tese (doutorado) -Instituto de Biociências, UNESP -Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309- 314, 1977.

HASSAN, N. M.; ALLA, M. M. N. Oxidative stress in herbicide-treated broad bean and maize plants. **Acta physiologiae plantarum**, v. 27, p. 429-438, 2005.

JANICKA, U. et al., The effect of haloxyfop-ethoxyethyl on antioxidant enzyme activities and growth of wheat leaves (*Triticum vulgare* L.). **Polish Journal of Environmental Studies**. v. 17, p. 485-490, 2008.

LEÓN, A. M. et al. Antioxidative enzymes in cultivars of peppers plants with different sensitivity to cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p.813-820, 2002.

SCANDALIOS, J. G. et al. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. **Plant Science**, v. 156, p.103-110, 2000.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, p. 9, 2007.