

EXPRESSÃO DE GENES EM NABO APÓS A APLICAÇÃO DO HERBICIDA ISOXAFLUTOLE

LANGARO, A.C.¹; MANICA-BERTO, R.¹; PEGORARO, C.¹; TIECHER, A.¹; NOHATTO, M.A.¹; AGOSTINETTO¹, D.; ROMBALDI, C. V.¹

¹Universidade Federal de Pelotas; (53) 3275-7590; namelia.langaro@gmail.com

Resumo

Diversos problemas de fitointoxicação em culturas e em plantas daninhas têm sido descritos após o uso do isoxaflutole. Até o momento, não se chegou a fatos conclusivos que explicassem os motivos pelos quais isso esteja ocorrendo. Nesse contexto, objetivou-se avaliar o efeito do herbicida isoxaflutole ao longo do tempo, na expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas na via de biossíntese de fenilpropanóides, carotenóides e do sistema antioxidante enzimático de nabo. O experimento foi conduzido no período de fevereiro de 2010 na UFPel/RS. Previamente, as sementes de nabo (*Raphanus* spp.) foram semeadas em bandejas preenchidas com substrato comercial. Seis dias após a semeadura foi efetuado o transplante para os saquinhos plásticos. Quando as plantas se encontravam no estágio de quatro a seis folhas, aplicou-se o herbicida isoxaflutole e posteriormente, foram realizadas coletadas as 4, 8, 12, 24 e 48 horas após a aplicação do herbicida da parte aérea das plantas. Além da coleta do tratamento comparativo (testemunha), sem aplicação de herbicida (0 horas). Foram estudados os genes que codificam para proteínas envolvidas na via de biossíntese de fenilpropanóides (Phenylalanine ammonia-lyase – PAL), carotenóides (Farnesyl pyrophosphate synthase - FPP; Phytoene desaturase - PDS) e do sistema antioxidante (Catalase - CAT). O RNA total foi extraído das folhas de nabo com a utilização do reagente PureLink™, obedecendo as recomendações do fabricante. A obtenção dos cDNAs foi realizada com uso do Kit comercial *SuperScript First-Strand System* para RT-PCR, segundo recomendações do fabricante. A análise quantitativa de expressão gênica em tempo real dos genes foi realizada em um equipamento 7500 Real-Time PCR System usando o SYBR® Green. Ocorreu um aumento da expressão do gene que codifica para a enzima PAL, a partir das 8 horas após a aplicação do herbicida. Entretanto, os genes codificadores para proteínas relacionadas à via de biossíntese dos carotenóides como FPP e PDS e o gene codificador para a enzima CAT, apresentaram uma queda na expressão após a aplicação do herbicida. Dentre os genes estudados, a PAL representa uma resposta ao estresse ocasionado pelo herbicida isoxaflutole.

Palavras-Chave: carotenóides, compostos fenólicos, catalase, antioxidant system.

Abstract

Several problems of phytotoxicity in crops and weeds have been described after the use of isoxaflutole. So far, there has been no conclusive facts to explain the reasons why it is happening. This experiment aimed to evaluate the effect of the herbicide isoxaflutole over time, the expression of genes coding for proteins involved in the biosynthesis of phenylpropanoids, carotenoids and antioxidant enzyme system of the radish. The experiment was conducted from February 2010 in UFPel/RS. Previously, the seeds of radish (*Raphanus* spp.) were sown in trays filled with commercial substrate. Six days after sowing, transplanting was done for the plastic bags. When the plants were at the stage of four to six leaves, we applied the herbicide isoxaflutole, and subsequently, were collected from the 4, 8, 12, 24 and 48 hours after herbicide application of the shoots. Besides the collection of comparative treatment (control) without herbicide application (0 h). We studied the genes coding for proteins involved in the biosynthesis of phenylpropanoids (Phenylalanine ammonia-lyase - PAL), carotenoids (Farnesyl pyrophosphate synthase - FPP; Phytoene desaturase - PDS) and the antioxidant system (Catalase - CAT). Total RNA was extracted from leaves of turnip using the reagent PureLink™, following the manufacturer's recommendations. The attainment of the cDNAs was performed using the commercial kit SuperScript First-Strand System for RT-PCR, according the manufacturer's recommendations. Quantitative analysis of gene expression in real-time gene was performed in an equipment 7500 Real-Time PCR System using SYBR® Green. There was an increased expression of the gene coding for the enzyme PAL, from 8 hours after herbicide application. However, genes coding for proteins related to the biosynthesis of carotenoids such as FPP and PDS and the gene coding for catalase activity, showed a decrease in expression after

herbicide application. Among the genes studied, the PAL is a response to stress caused by the herbicide isoxaflutole.

Key Words: carotenoids, phenolic compounds, catalase, sistema antioxidante.

Introdução

A tolerância das plantas aos herbicidas depende de vários processos fisiológicos, incluindo a translocação e a metabolização. O isoxaflutole é um herbicida utilizado no controle em pré e pós-emergência de poucas espécies magnoliopsidas, mas com maior eficiência em espécies poaceas, nas culturas do milho, cana-de-açúcar, batata e mandioca (Agrofit, 2010).

O sintoma do herbicida é caracterizado pelo albinismo (branqueamento) dos tecidos fotossintéticos em espécies suscetíveis. Esse sintoma é típico de uma gama de herbicidas que inibem a síntese de carotenóides e, a maioria destes inibidores atuam na enzima fitoeno desaturase (PDS), enzima que catalisa as reações iniciais na conversão do fitoeno (precursor incolor dos carotenóides) em carotenóides coloridos, como o licopeno (Sandmann e Böger, 1989). Em contrapartida, foi demonstrado que o isoxaflutole é rapidamente convertido em metabólito diquetonitrila, que é a molécula biologicamente ativa no controle de plantas daninhas, por meio da clivagem do anel isoxazole e, que nem o isoxaflutole nem o diquetonitrila inibem a atividade da enzima fitoeno desaturase. O diquetonitrila inibe a 4-hidroxifenil-piruvato dioxigenase (HPPD) a partir da degradação do aminoácido tirosina, com inibição indireta da fitoeno desaturase resultante da depleção de um co-fator essencial, a plastoquinona (Pallet et al., 1998; Viviani et al., 1998).

Embora a conversão de isoxaflutole em diquetonitrila possa ocorrer antes ou após a absorção pelas plantas, é o metabólito diquetonitrila que atua como um potente inibidor da HPPD. O isoxaflutole bloqueia também o transporte de elétrons da fotossíntese, no fotossistema II, pela menor produção de plastoquinona necessária ao transporte de elétrons, gerando o estado de clorofila tripleno e os demais radicais livres (Devine et al., 1993; Pallet et al., 1998; Viviani et al., 1998). Esse efeito ou estresse do herbicida tanto na cultura como na planta daninha, proporciona uma fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS), que provocam danos nas membranas celulares, conduzindo à morte celular (Yin et al., 2008).

No entanto, as plantas evoluíram várias estratégias de proteção para minimizar a toxicidade do herbicida. Um dos mecanismos protetor é o sistema antioxidante enzimático, que opera de forma sequencial e simultânea através das ações de uma variedade das enzimas, incluindo-se a superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD), glutathione S-transferase (GST), ascorbato peroxidase (APX) e a catalase (CAT) (Jiang e Yang, 2009). A CAT é eficiente na remoção de peróxido de hidrogênio, por estar localizada nos peroxissomos, glicossomas e na mitocôndria (Foyer e Nector, 2000). Outra forma de defesa é o sistema antioxidante não enzimático, incluindo principalmente o grupo dos compostos fenólicos que são sintetizados pelas plantas em resposta a uma injúria física, infecção por bactéria, fungo, nematóides ou vírus ou qualquer outro tipo de estresse (Nicholson e Hammerschmidt, 1992).

Diversos problemas de fitointoxicação em culturas e em plantas daninhas têm sido descritos após o uso do isoxaflutole (Cavaliere et al., 2008). Até o momento, não se chegou a fatos conclusivos que explicassem os motivos pelos quais isso esteja ocorrendo. Nesse contexto, objetivou-se avaliar o efeito do herbicida isoxaflutole ao longo do tempo, na expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas na via de biossíntese de fenilpropanóides, carotenóides e do sistema antioxidante enzimático de nabo.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no período de fevereiro de 2010, em casa de vegetação e laboratório, na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPel), no Município de Capão do Leão/RS.

Para a etapa em casa de vegetação, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições. Previamente, as sementes de nabo (*Raphanus* spp.) foram semeadas em bandejas preenchidas com substrato comercial PlantiMax[®]. Seis dias após a semeadura, quando as plantas apresentavam duas folhas, foi efetuado o transplante para os saquinhos plásticos, mantendo-se uma planta por saquinho.

Quando as plantas se encontravam no estágio de quatro a seis folhas, aplicou-se o herbicida isoxaflutole, na dose de 40 g i.a. ha⁻¹. Para aplicar o herbicida foi utilizado pulverizador costal, pressurizado com CO₂, munido com bicos tipo leque e pontas 110.015, e volume de calda equivalente a 150 L ha⁻¹.

Posteriormente, foram realizadas coletadas as 4, 8, 12, 24 e 48 horas após a aplicação do herbicida da parte aérea das plantas. Além da coleta do tratamento comparativo (testemunha), sem aplicação de herbicida (0 horas). Depois das coletas, as folhas foram armazenadas a -80°C até o momento da extração de RNA, que foi realizada no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da FAEM/UFPEL.

Os *primers* correspondentes aos genes estudados (Tabela 1), que codificam para proteínas envolvidas na via de biossíntese de fenilpropanóides, carotenóides e do sistema antioxidante foram obtidos a partir das sequências depositadas no Sol Genomics Network (*Sol Tomato* - <http://solgenomics.net/>) e National Center for Biotechnology Information (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com a utilização do programa Vector™ (*Invitrogen™*). Para isso, alguns parâmetros foram especificados, como tamanho entre 100 e 150 pb, Tm (temperatura de anelamento) entre 60-65°C, quantidade de CG entre 40 e 60%. O RNA total foi extraído das folhas de nabo com a utilização do reagente PureLink™ (*Plant RNA Reagent – Invitrogen™*), obedecendo as recomendações do fabricante. O RNA total passou pela digestão com DNase I - *Invitrogen™* para a degradação do DNA contaminante. A obtenção dos cDNAs foi realizada com uso do Kit comercial *SuperScript First-Strand System* para RT-PCR (*Invitrogen™*), segundo recomendações do fabricante. A quantidade e qualidade dos RNAs foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 2% (p/v).

Tabela 1. *Primers* utilizados para análise em Real-time PCR.

Genes	Número de Acesso	Forward	Reverse
Rota dos fenilpropanóides			
Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)	SGN-U30687012	CCGGTCGTCCTCCCAATTCCAA A	ATCCAACCGCCGTGCCATT
Rota dos carotenóides			
Farnesyl pyrophosphate synthase (FPP)	GI 2935458	TTCATCGCCGGATTGTCCA G	TGCACATGCCACTGGGAGG T
Phytoene desaturase (PDS)	SGN-U565585	GCTTCTCCGCGCCCAACTA	AACCACCCAAACCTGCACC A
Sistema antioxidante			
Catalase (CAT)	SGN-U578839	GCCACGCGACCAAGGATCT T	CCTCGGGGTCCATTGTTTG G
Controle endógeno			
18S rRNA	GI 18448	TGTGAAACTGCGAATGGCT CATTAA	AAGTCGGGATTGTTGCAC GTATT

A análise quantitativa de expressão gênica em tempo real (q-PCR) dos genes que são objeto desse estudo foi realizada em um equipamento 7500 Real-Time PCR System (*Applied Biosystems®*) usando o SYBR® *Green*. Inicialmente foi realizada a validação dos *primers*, onde *primers* com eficiência próximo de 2 foram selecionados para estudo. Para a reação de amplificação foi utilizado um volume total de 25 µL, contendo 12,5 µL de PCR Master Mix SYBR® *Green*, 2 µM de cada primer (10mM), 5 µL de cDNA (0,2µg) e água em quantidade suficiente para completar o volume final. As amostras foram depositadas em placas ópticas com 96 poços (*Applied Biosystems®*) e cobertas com adesivos ópticos (*Applied Biosystems®*). As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação em 50°C durante 2 min e 95°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de três etapas (95°C durante 0,5 min, 57°C durante 1 min e 72°C durante 1 min) e extensão final em 72°C durante 5 min, seguida de curva de dissociação padrão.

No final dos ensaios de reação foi obtido o CT (Threshold Cycle) do aumento da fluorescência ocorrido durante os ciclos da reação. Os dados ópticos foram posteriormente analisados com auxílio do programa 7500 System Software. O cálculo $\Delta\Delta CT$ (Livak e Schmittgen, 2001) baseado na reação exponencial da PCR, foi obtido a partir da expressão $QR=2^{-\Delta\Delta CT}$, no qual QR representa o nível de expressão gênica, CT o ciclo de amplificação na qual cada amostra apresenta amplificação exponencial, ΔCT se refere à diferença entre o CT da amostra amplificada para o gene alvo e o CT da mesma amostra

amplificada para o gene controle (18S), e o $\Delta\Delta CT$ representa a diferença entre o ΔCT da amostra de interesse e o ΔCT da amostra de referência-calibrador (testemunha).

Os dados foram analisados através de ferramentas do programa Mult Experiment Viewer (MeV), EASE Expression Analysis Systematic Explorer versão 4.6 de acordo com Hosack et al. (2003) e apresentados em forma de diagrama de cor.

Resultados e Discussão

O aumento da expressão do gene que codifica para a enzima PAL, a partir das 8 horas após a aplicação do herbicida (Figura 2), apresenta-se como uma forma de defesa frente ao estresse provocado pelo herbicida. A PAL é considerada a enzima chave na biossíntese de compostos fenilpropanóides, em que o aumento de sua síntese também pode ser relacionado a outras formas de estresse, como por exemplo, por metais pesados (Díaz e Merino, 1997), aplicações de irradiação gama em pêssegos (Hussain et al., 2010). Recentemente, Marchiosi et al. (2009) observaram um aumento de 26,2% da atividade da PAL nas raízes de plântulas de soja suscetíveis a aplicação de glyphosate em relação as raízes das plântulas resistentes ao glyphosate, demonstrando ser uma resposta ao estresse provocado pelo herbicida.

Entretanto, os genes codificadores para proteínas relacionadas à via de biossíntese dos carotenóides como a FPP e PDS apresentaram uma queda na expressão 4 horas após a aplicação do herbicida (Figura 2), tendo sua expressão restaurada 12 horas após o tratamento com o herbicida. Aubert e Pallett (2000) observaram que o uso de isoxaflutole em folhas de ervilha inibiu a enzima HPPD, indicando que possa ter havido inibição da PDS de forma indireta (Pallet et al., 1998).

O gene codificador para a enzima CAT, representante do sistema antioxidante enzimático, também apresentou expressão inferior ao controle, com exceção de 12 horas após aplicação do herbicida (Figura 2). Jiang e Yang (2009) relataram através de PCR semi-quantitativo que elevadas concentrações de prometrine em trigo, bloquearam a expressão do gene que codifica para a enzima CAT, indicando que há inibição desse gene frente à ação de diferentes herbicidas.

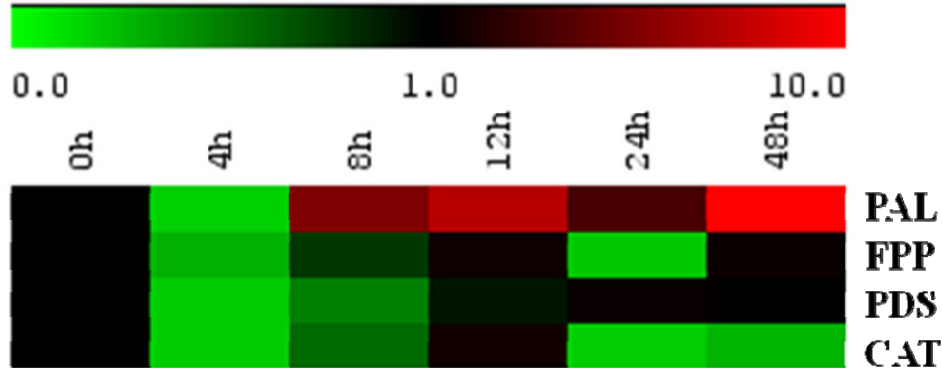


Figura 2. Acúmulo relativo de mRNAs em plantas de nabo sem aplicação de herbicida (0h), e 8, 12, 24 e 48 horas após a aplicação com isoxaflutole. O acúmulo de mRNAs é representado em uma escala de 0-10, o verde claro indica baixos níveis de mRNAs, o preto representa um acúmulo de mRNAs 1 vez maior que o verde claro, e o vermelho representa os maiores níveis de mRNAs, 10 vezes maior que o verde claro. O acúmulo de mRNAs do tratamento 0h foi utilizado como referência para determinar os níveis de mRNAs dos demais tratamentos.

Dentre os genes estudados, a PAL representa uma resposta ao estresse ocasionado pelo herbicida isoxaflutole. Entretanto, seu nível de expressão não foi suficiente para prevenir a planta do dano oxidativo, uma vez que a CAT, enzima do sistema antioxidante, não apresenta expressão suficiente para evitar o dano.

Literatura Citada

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário.** Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit>> Acesso em: 01 abr. 2010.

AUBERT S.; PALLETT, K.E. Combined use of ^{13}C - and ^{19}F -NMR to analyse the mode of action and the metabolism of the herbicide isoxaflutole. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, p.517–523, 2000.

CAVALIERI, S.D.; OLIVEIRA, JR.R.S.; CONSTANTIN, J.; BIFFE, D.F.; DVORANEN, E.C.; BLAINSKI, E. Tolerância de híbridos de milho ao herbicida isoxaflutole. **Planta Daninha**, v.26, p.901-909, 2008.

DEVINE, M.; DUKE, S.O.; FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action.** Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1993. 441 p.

DÍAZ, J.; MERINO, F. Shikimate dehydrogenase from pepper (*Capsicum annuum*) seedlings. Purification and properties. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.147–152, 1997.

FOYER, C.F.; NECTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis regulation and signaling. **New Phytologist**, 146, 359–388. 2000.

HOSACK, D.A.; DENNIS, G.JR.; SHERMAN, B.T.; LANE, H.C.; LEMPICKI, R.A. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. **Genome Biology**, v.4, R70, 2003.

HUSSAIN, P.R.; WANI, A.M.; MEENA, R.S.; DAR, M.A. Gamma irradiation induced enhancement of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and antioxidant activity in peach (*Prunus persica* Bausch, Cv. Elberta). **Radiation Physics and Chemistry**, 2010. doi:10.1016/j.radphyschem.2010.03.018.

JIANG, L.; YANG, H. Prometryne-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in wheat. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.1687–1693, 2009.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method. **Methods**, v.25, p.402–408, 2001.

MARCHIOSI, R.; FERRARESE, M. DE L.L.; BONINI, E.A.; FERNANDES, N.G.; FERRO, A.P.; FERRARESE-FILHO, O. Glyphosate-induced metabolic changes in susceptible and glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.) roots. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.93, p.28–33, 2009.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.369-89, 1992.

VIVIANI, F.; LITTLE, J.P.; PALLET, K.E. The mode of action of isoxaflutole. II. Characterization of the inhibition of carrot 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by the diketone nitrile derivative of isoxaflutole. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.62, p.125-134, 1998.

PALLET, K.E.; LITTLE, J.P.; SHEEKEY, M.; VEERASEKARAN, P. THE mode of action of isoxaflutole. I. Physiological effects, metabolism, and selectivity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.62, p.113-124, 1998.

SANDMANN, G.; BÖGER, P. **Inhibition of carotenoid biosynthesis by herbicides**, in: Böger P., Sandmann G. (Eds.), Target Sites of Herbicide Action, CRC Press, Boca Raton, FL, 1989, pp. 25–38.

YIN, X.L.; JIANG, L.; SONG, N.H.; YANG, H. Toxic reactivity of wheat (*Triticum aestivum*) plants to herbicide isoproturon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.4825–4831, 2008.