

## DANO OXIDATIVO EM BIÓTIPOS DE LEITEIRA RESISTENTES E SUSCETÍVEIS AO HERBICIDA TEMBOTRIONE

LEANDRO DE SOUZA BARBOSA<sup>1</sup>; MAICON FERNANDO SCHMITZ<sup>2</sup>; ADRIANA ALMEIDA DO AMARANTE<sup>3</sup>; CASSIANO SALIN PIGATTO<sup>4</sup>; LEANDRO VARGAS<sup>5</sup>; DIRCEU AGOSTINETTO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – leandro.sbarbosa@live.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – maicon\_schmitz@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – 19dricaa@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – cassianosalinp@gmail.com

<sup>5</sup>Embrapa Trigo – leandro.vargas@embrapa.br

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – agostinnetto.d@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A leiteira (*Euphorbia heterophylla* L.) é considerada uma planta de difícil controle, devido as características da espécie e pela baixa disponibilidade de herbicidas para o manejo em pós-emergência das culturas (ULGUIM et al., 2017). Recentemente foi observado controle insatisfatório de biótipos após aplicação de herbicidas inibidores da hidroxifenil piruvato dioxigenase (HPPD), sugerindo a ocorrência de biótipos resistentes (SILVA et al., 2016).

Entender o estresse oxidativo e avaliar os aspectos fisiológicos de defesa da planta submetida a aplicação de herbicidas é de extrema importância para compreender as estratégias adotadas pelas plantas resistentes, bem como para preconização de estratégias de manejo.

O objetivo do presente estudo foi elucidar a resposta oxidativa de biótipos suscetíveis e resistentes de *E. heterophylla* ao herbicida inibidor da HPPD, tembotrione.

### 2. METODOLOGIA

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no Centro de Herbologia (CEHERB) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/UFPEl. Para a realização dos experimentos, plantas de leiteira foram semeadas em bandejas e transferidas, na fase de plântula, para copos preenchidos com solo. Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial, com quatro repetições. O fator A foi composto pelos biótipos de leiteira 10.1 (susceptível ao herbicida tembotrione), 32.1 e 32.2 (resistentes ao herbicida tembotrione). Já o fator B, consistiu dos tempos de coleta das folhas de leiteira após a aplicação do herbicida (0, 24, 48, 96 e 192 horas).

A aplicação de tembotrione (100,8 g ha<sup>-1</sup> + óleo metilado de soja 0,5% v/v) foi realizada quando as plantas atingiram o estágio de quatro folhas, com auxílio de pulverizador pressurizado a CO<sub>2</sub>. Nos tempos de coletas correspondentes, foram coletadas a 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> folha dos biótipos de leiteira e as amostras foram congeladas a -80°C até a realização das análises no laboratório de metabolismo vegetal do CEHERB.

Os teores de clorofilas e carotenoides foram determinados com amostras de 0,1 g de folhas inseridas em tubos com 5 mL de DMSO (dimetilsulfoxido). O material foi incubado em banho-maria a 70° C, por duas horas, para solubilização dos pigmentos. Posteriormente, os tubos foram homogenizados e quantificado os teores de clorofila total (a+b) e de carotenoides totais a partir da absorbância por

espectrofotometria. Os valores obtidos foram calculados pelo uso das fórmulas de Lichenthaler (1987), sendo os resultados expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  de massa fresca.

Os danos celulares nos tecidos foram determinados através do teor de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), via acúmulo de aldeído malônico (MDA); e, extravassamento de eletrólitos. Para proceder-se essas análises, 0,2 g de folhas foram maceradas com nitrogênio líquido, homogeneizados em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugadas a 14000 rpm por 20 minutos. Para a quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , adicionaram-se alíquotas de 0,2 mL do sobrenadante em 0,8 mL de tampão fosfato 10 mM (pH 7,0) e 1 mL de iodeto de potássio 1M. A solução repousou por 10 minutos em temperatura ambiente e quantificou-se a absorbância. A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi determinada através de curva padrão e expressa em  $\mu\text{M g}^{-1}$ .

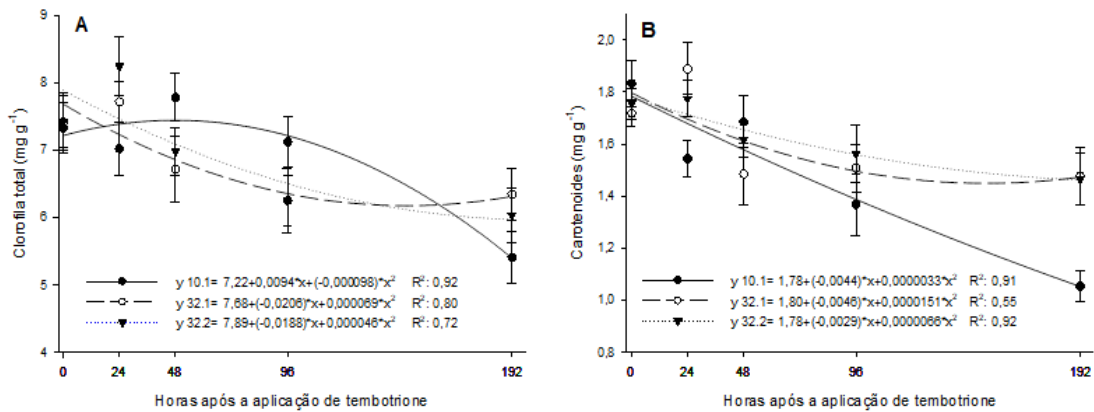
Para determinar TBARS, alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante, foram adicionadas a 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (m/v) e ácido tricloroacético 10% (m/v) e incubadas a  $90^\circ\text{C}$  por 20 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo por 10 minutos e lida a absorbância. Calculou-se a concentração de MDA utilizando-se o coeficiente de absorvidade de  $155 \text{ mM cm}^{-1}$ , expressando-se resultados em  $\text{nM MDA g}^{-1}$ .

Para avaliação do extravassamento de eletrólitos, 0,2g de amostra de folhas, foram seccionadas com tesoura e lavadas três vezes com água ultrapura para a retirada de resíduos. Posteriormente, as mesmas foram colocadas em 50 mL de água ultrapura e incubadas por 4 horas em banho-maria ( $25^\circ\text{C}$ ). Decorrido esse período, obteve-se a condutância inicial ( $C_i$ ) utilizando-se condutivímetro (Lutron, CD-4301). Posteriormente a essa leitura, as mesmas amostras foram colocadas em banho maria a  $90^\circ\text{C}$  por 2 horas e realizada a segunda leitura ( $C_f$ ). A permeabilidade relativa foi calculada pela relação  $C_i/(C_i+C_f) \times 100$  e o resultado expresso em porcentagem.

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade e homocedasticidade, posteriormente submetidos à análise de variância ( $p \leq 0,05$ ). No caso de ser constatada interação entre os fatores tempo após a aplicação de tembotrione e biótipos, realizou-se a análise de regressão com auxílio do programa SigmaPlot 12.3.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

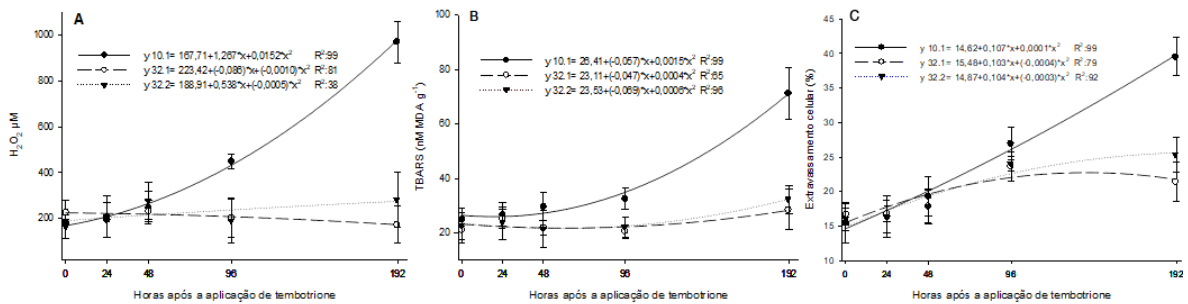
Os níveis de clorofila e carotenoides reduziram ao longo do tempo de estudo no biótipo suscetível (Figura 1, A e B). Já, nos biótipos resistentes, o nível dos compostos supracitados decaiu inicialmente, mas com o passar do tempo de estudo seu teor foi mantido, indicando danos reduzidos pela ação do herbicida tembotrione. Isso ocorre, pois, os carotenoides são substâncias que preservam a clorofila, evitando sua fotodegradação. Sua ausência inviabiliza totalmente a ação da clorofila no processo da fotossíntese, provocando a morte dos tecidos das plantas (VAN ALMSICK, 2009). O herbicida tembotrione, pertencente ao grupo das tricetonas, tem como mecanismo de ação a inibição da biossíntese de carotenoides, processo no qual ocorre a inibição da enzima HPPD, desenvolvendo o branqueamento das folhas (CALVAYRAC *et al.* 2013), devido à degradação oxidativa da clorofila e das membranas fotossintéticas (GROSSMANN; EHRHARDT, 2007).



**Figura 1:** Teores de clorofila total (a+b) (A) e carotenoides (mg g<sup>-1</sup>) (B) em biótipos de leiteira após diferentes períodos de exposição ao herbicida Tembotrione. FAEM/UFPel, 2020.

Os carotenoides dissipam o excesso de luz, protegendo a clorofila contra a foto-oxidação (KRINSKY, 1994). Na ausência dos carotenoides, quando as plantas são expostas à luz, o excesso de energia não é adequadamente dissipado, produzindo assim, espécies reativas de oxigênio e clorofila tripleto, desenvolvendo danos às plantas devido a peroxidação de lipídios das membranas celulares (VAN ALMSICK, 2009).

O nível de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) no biótipo suscetível (10.1) aumentou significativamente quando comparado aos biótipos resistentes (32.1 e 32.2) (Figura 2.A). De igual modo, para peroxidação lipídica, medida através do TBARS, no biótipo suscetível observou-se incremento significativo na última avaliação, apontando dano das membranas celulares, diferente do verificado nos biótipos resistentes, que permaneceu relativamente estável durante os períodos de avaliação (Figura 2.B).



**Figura 2:** Conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (µM g<sup>-1</sup>) (A) e peroxidação lipídica em termos das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (nM MDA g<sup>-1</sup>) (B) e extravasamento de eletrólitos (%) (C) em biótipos de leiteira após diferentes períodos de exposição ao herbicida tembotrione. FAEM/UFPel, 2020.

Na análise dos danos celulares, determinada por meio do extravasamento de eletrólitos, constatou-se maior nível de extravasamento celular ao longo do tempo de estudo no biótipo suscetível, quando comparado aos biótipos resistentes ao herbicida (Figura 2.C), indicando que ocorreram danos celulares irreversíveis pela ação do herbicida no biótipo suscetível em comparação aos biótipos resistentes.

Em síntese, a resistência de leiteira aos inibidores da HPPD, resulta em menor depleção dos pigmentos fotoprotetores; menor produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; bem como reduzido extravassamento de eletrólitos, no entanto o mecanismo pelo qual isso ocorre remanesce a ser elucidado.

#### 4. CONCLUSÕES

Maiores quantidades de peróxido de hidrogênio, de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e extravassamento de eletrólitos ocorrem no biótipo suscetível de *Euphorbia heterophylla*; enquanto, menor depleção de pigmentos fotoprotetores e fotossintetizantes são detectados nos biótipos resistentes ao herbicida tembotrione.

O presente estudo irá auxiliar no processo de identificação dos mecanismos de resistência da planta, que permanecem a serem elucidados.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALVAYRAC, C.; BONTEMPS, N.; NOUGA-BISSOUE, A.; ROMDHANE, S.; COSTE, C. M.; COOPER, J.F. Photolysis of tembotrione and its main by-products under extreme artificial conditions: Comparison with another  $\beta$ -triketone herbicide. **Science of the total environment**, v.452, p.227-232, 2013
- GROSSMANN, K.; EHRHARDT, T. On the mechanism of action and selectivity of the corn herbicide topramezone: a new inhibitor of 4- hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **Pest Management Science**, v.63, n.5, p.429-439, 2007.
- SILVA, W.T. DA; OLIVEIRA, G.C.; DARIO, H.L.; SCHIO, L. A.; KARAM, D.; SILVA, A. F. DA. Tolerância do sorgo biomassa ao herbicida tembotrione. In: **EMBRAPA MILHO E SORGO-ARTIGO EM ANAIS DE CONGRESSO (ALICE)**: Bento Gonçalves, 2016. Milho e sorgo: inovações, mercados e segurança alimentar: anais. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2016.
- SIGMAPLOT - Scientific Graphing Software. Version 12.0, 2012.
- ULGUIM, A. DA R.; AGOSTINETTO, D.; VARGAS, L.; SILVA, J.D.G. DA; SILVA, B. M. DA; WESTENDORFF, N. DA R. Agronomic factors involved in low-level wild poinsettia resistance to glyphosate. **Agrária**, v.12, n.1, p.51-59, 2017.
- VAN ALMSICK, A. A new hppd-inhibitors - A proven mode of action as a new hope to solve current weed problems. **Outlooks on Pest Management**, v.20, n.1, p.27-30, 2009
- KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. Pure & Applied Chemistry (IUPAC), **Great Britain**, v.66, n.5, p.1003-1010, 1994.