



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

ANI CARLA CONCATO

**EFEITO DE HERBICIDAS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MILHO E SOJA
GENETICAMENTE MODIFICADOS**

ERECHIM

2019

ANI CARLA CONCATO

**EFEITO DE HERBICIDAS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MILHO E SOJA
GENETICAMENTE MODIFICADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, sob a orientação da Prof^a Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin e Prof. D. Sc. Leandro Galon.

ERECHIM

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

ERS 135, Km 72, nº 200
Cep: 99.700-970
Erechim - RS
Brasil

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Concato, Ani Carla

Efeito de herbicidas na atividade enzimática de soja e milho geneticamente modificados / Ani Carla Concato. -- 2019. 74 f.:il.

Orientadora: Prof. Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin.

Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Galon.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental-PPGCTA, Erechim, RS, 2019.

1. Glycine max L. . 2. Zea mays L.. 3. Enzimas. 4. Estresse oxidativo. 5. Herbicidas. I. Perin, Rosilene Rodrigues Kaizer, orient. II. Galon, Leandro, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
COORDENAÇÃO ACADÊMICA
COORDENAÇÃO ADJUNTA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
SECRETARIA DE PÓS GRADUAÇÃO
ERS 135 – Km 72, nº 200, Caixa Postal 764, Erechim-RS, CEP 99700-970, 54 3321 7099
sec.posgrad.er@uffrs.edu.br, www.uffrs.edu.br

Ata de Defesa de Dissertação 007/PPGCTA-2019

Aos vinte e sete dias do mês de março de dois mil e dezenove, às quatorze horas, no Auditório - bloco dos professores – UFFS Campus Erechim, reuniu-se, para defesa da dissertação apresentada por **Ani Carla Concato**, do programa de Pós-Graduação, stricto Sensu, em Ciência e Tecnologia Ambiental, intitulada: **“EFEITO DE HERBICIDAS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SOJA E MILHO GENETICAMENTE MODIFICADOS”**, a Banca Examinadora, composta pelos professores: Prof. Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin (Orientador/presidente – UFFS/IFRS), Prof. Dr. Leandro Galon (Orientador – UFFS) e Prof. Dr. Siumar Tironi (Membro titular externo – UFFS Campus Chapecó). A Profª. Dra. Luciane Almeri Tabaldi (Membro titular externo – UFSM) participou via Skype. O(A) professor (a) Orientador/Presidente deu por aberta a sessão e logo a seguir passou a palavra ao (à) mestrando(a), para que em até trinta minutos expusesse seu trabalho. Terminada a exposição, passou-se à arguição da Banca Examinadora. A seguir, a sessão foi suspensa e os examinadores decidiram por (X) aprovar () reprovar o trabalho.

Observações: A versão final da dissertação deve ser sigilosa.

Banca orienta que no prazo de 45 dias seja entregue a versão final do trabalho de dissertação à Secretaria de Pós-Graduação. Nestes termos, esta ata segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora e pelo(a) mestrando(a).

Erechim/RS, 27 de março de 2019.

Ani Carla Concato

Prof. Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin

Prof. Dr. Leandro Galon

Profª. Dra. Luciane Almeri Tabaldi

Prof. Dr. Siumar Tironi

Ani Carla Concato
Rosilene R. Kaizer Perin
Leandro Galon
Profª. Dra. Luciane Almeri Tabaldi
Siumar Tironi

AGRADECIMENTOS

Essa parte é realmente a mais difícil de escrever de toda a dissertação, porque a vida não se coloca em uma análise estatística e não é através do valor p que descobrimos a significância das pessoas na nossa história. Vi essa frase em algumas dissertações que li e achei linda, afinal é a mais pura verdade.

Bom, então, antes de tudo, eu agradeço à Deus, por sempre me guiar, iluminar e me dar força em todos os momentos, especialmente nos mais difíceis, e por manter a minha mãe comigo.

Agradeço a minha família, principalmente aos meus pais Darcilda e Gelson por me darem apoio e não me deixarem desistir nos momentos de dificuldade, sendo minha base. E também ao meu irmão, Jonathan, com jeito sempre despreocupado me dando exemplo de que deixar a ansiedade tomar conta não melhora nada, pelo contrário, só piora.

Mas, além de nossa família, existem pessoas que encontramos em nosso caminho que se tornam muito especiais, pessoas que fazem os dias valerem a pena.

Gostaria de agradecer por isso, os meus orientadores Prof^a Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin e Prof. D. Sc. Leandro Galon, por possibilitarem a realização desse trabalho, pelos puxões de orelha, pelo apoio quando passei por momentos difíceis e quando tudo parecia dar errado, e além disso, por todas as orientações e conselhos. Obrigada por tudo!

Quero agradecer também à Prof^a. Dra. Luciane Tabaldi, por toda sua disponibilidade, conhecimento e a ajuda fornecida, e também ao Prof. Dr. Gismael Perin pelo seu auxílio.

Sou grata também ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA) e à Universidade Federal da Fronteira Sul- UFFS, Campus Erechim, pela oportunidade de fazer o mestrado e pela sua estrutura. E ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Campus Sertão.

Agradeço à todos os meus amigos que por muitas vezes entenderem a minha ausência; À todos os amigos e colegas que ainda estão ou passaram pelo “lab”, especialmente, Wagner, Maicon, Ana Paula, Renata, Nathália, Bianca, Virgínia, Bianca O., Ariel, Amanda, Giovanna e Jéssica S., e todos os demais que me auxiliaram, obrigada pelos momentos que passamos junto, de forma especial, os divertidos. Sem a amizade, força e ajuda de vocês eu não teria feito nada. Obrigada mesmo!

Também agradeço aos demais que me ajudaram com os experimentos, como a Carla, pela sua amizade e pela ajuda, principalmente com as análises, o César pelo auxílio com o

cultivo das plantas e por estar sempre disposto a me ajudar, e à Jéssica Gomes também, obrigada a vocês por tudo.

Aos amigos que fiz na turma do mestrado como a Débora, a qual passamos por várias coisas juntas, a Camila por sempre me ajudar, a Renata pela amizade e inúmeras caronas, entre outros, pois não vou conseguir citar todos, mas todos com certeza deixaram uma marquinha na minha vida.

Vou levar pra sempre todos comigo, obrigada!

“Continue a nadar, continue a nadar, nadar...”

(Procurando Nemo)

RESUMO

Novas cultivares de soja e milho são resistentes ao 2,4-D, glyphosate e amonio-glufosinate, e ainda ao haloxyfop-R no caso do milho. Sabendo que a aplicação de herbicidas pode induzir acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais podem gerar estresse oxidativo mesmo em plantas resistentes, objetivou-se avaliar se a aplicação de herbicidas sobre cultivares de soja e milho resistentes a esses produtos afeta negativamente a atividade de enzimas antioxidantes e da ALA-D. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, na Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim em 2018. O delineamento foi de blocos casualizados, com quatro repetições (duas plantas por repetição), utilizando-se as cultivares transgênicas de soja e milho Enlist™. A aplicação dos herbicidas foi efetuada em pós-emergência de forma isolada ou em misturas em tanque nas doses recomendadas para o controle de plantas daninhas. Os tratamentos para o experimento com a soja foram: testemunha (sem aplicação), glyphosate (1080 g ha⁻¹), 2,4-D (670 g ha⁻¹), amonio-glufosinate (400 g ha⁻¹), glyphosate + 2,4-D, glyphosate + amonio-glufosinate, amonio-glufosinate + 2,4-D e glyphosate + amonio-glufosinate+2,4-D. O experimento com o milho conteve os tratamentos: testemunha, glyphosate, 2,4-D, amonio-glufosinate, haloxyfop-R (60 g ha⁻¹), glyphosate+2,4-D, glyphosate+amônio-glufosinate, glyphosate+haloxyfop-R, 2,4-D+amônio-glufosinate, 2,4-D+haloxyfop-R, amônio-glufosinate+haloxyfop-R, glyphosate+2,4-D+amônio-glufosinate, glyphosate+2,4-D+haloxyfop-R, glyphosate+amônio-glufosinate+haloxyfop-R e, 2,4-D+amônio-glufosinate+haloxyfop-R, glyphosate+2,4-D+amônio-glufosinate+haloxyfop-R. As aplicações ocorreram com a soja e o milho no estágio fenológico V1 e V2, respectivamente. Aos 7 dias após a aplicação, a parte aérea das plantas foi coletada, acondicionada em papel alumínio, congelada e posteriormente macerada em nitrogênio líquido. Estas amostras foram utilizadas na determinação da atividade das enzimas antioxidantes como catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX), dos níveis de peroxidação lipídica e da atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (ALA-D) das plantas submetidas aos herbicidas. Os resultados para a soja mostraram que não houveram alterações significativas na peroxidação lipídica e na atividade da GPX em função de nenhum tratamento apesar das atividades da APX e da CAT terem sido aumentadas nos tratamentos de amonio glufosinate e glyphosate, 2,4-D e glyphosate+2,4-D, de modo respectivo. Houve ainda, a inibição da enzima ALA-D. Já para o milho, principalmente nas misturas houve peroxidação lipídica e a atividade da CAT e da APX foram ativadas. A enzima GPX foi inibida e todos os tratamentos inibiram a ALA-D. Em conclusão, as cultivares de soja e milho, especialmente as misturas, apresentaram ativação das enzimas antioxidantes importantes na defesa antioxidante como CAT e APX.

Mesmo assim, no caso do milho ocorreu danos aos lipídios. Além disso, em ambas as cultivares esses tratamentos afetaram negativamente a atividade da ALA-D.

Palavras-chave: *Glycine max* L., *Zea mays* L., enzimas, estresse oxidativo, herbicidas.

ABSTRACT

New soybean and corn cultivars are resistant to 2,4-D, glyphosate and ammonium glufosinate, and to haloxyfop-R in the case of maize. Knowing that the application of herbicides can induce accumulation of reactive oxygen species (ROS), which can generate oxidative stress even in resistant plants, the objective was to evaluate if the application of herbicides on soy and maize resistant cultivars affects negatively the activity of antioxidant enzymes and ALA-D. The experiments were conducted in a greenhouse at the Federal University of Southern Border, Erechim Campus in 2018. The experiment was a randomized complete block design with four replicates (two plants per replicate) using the soybean and corn transgenic cultivars Enlist™. The application of the herbicides was carried out in an isolated post-emergence or in tank mixtures at the doses recommended for the control of weeds. The treatments for the soybean experiment were: glyphosate (1080 g ha⁻¹), 2,4-D (670 g ha⁻¹), ammonium glufosinate (400 g ha⁻¹), glyphosate + 2,4-D, glyphosate + ammonium glufosinate, ammonium glufosinate + 2,4-D and glyphosate + ammonium glufosinate + 2,4-D. The experiment with corn contained treatments: control, glyphosate, 2,4-D, ammonium glufosinate, haloxyfop-R (60 g ha⁻¹), glyphosate + 2,4-D, glyphosate + ammonium glufosinate, glyphosate + haloxyfop-R, 2,4-D + ammonium glufosinate, 2,4-D + haloxyfop-R, ammonium glufosinate + haloxyfop-R, glyphosate + 2,4-D + ammonium glufosinate, glyphosate + 2,4-D + haloxyfop-R, glyphosate + ammonium glufosinate + haloxyfop-R and 2,4-D + ammonium glufosinate + haloxyfop-R. The applications occurred with soybean and maize at the phenological stage V1 and V2, respectively. At 7 days after application, the aerial part of the plants was collected, wrapped in foil, frozen and later macerated in liquid nitrogen. These samples were used to determine the activity of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GPX), lipid peroxidation levels and the activity of the enzyme delta-aminolevulinate dehydratase (ALA-D) submitted to herbicides. The results for soybean showed that there were no significant changes in lipid peroxidation and GPX activity due to no treatment, although APX and CAT activities were increased in glufosinate and glyphosate, 2,4-D and glyphosate + 2,4-D, respectively. There was also inhibition of the enzyme ALA-D. However, for maize, mainly in the mixtures there was lipid peroxidation and the activity of CAT and APX were activated. The GPX enzyme was inhibited and all treatments inhibited ALA-D. In conclusion, soybean and corn cultivars, especially mixtures, showed activation of important antioxidant enzymes in the antioxidant defense, such as CAT and APX. Even so, in the case of corn, lipids have been damaged. In addition, in both cultivars these treatments negatively affected ALA-D activity.

Key words: *Glycine max* L., *Zea mays* L. enzymes, oxidative stress, herbicides.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL	12
RESULTADOS	19
SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E ENZIMA ALA-D EM SOJA ENLIST E3™ APÓS APLICAÇÃO DE HERBICIDAS	21
INTRODUÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS	24
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO.....	31
CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	37
EFEITO DE HERBICIDAS NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E ALA-D EM HÍBRIDO DE MILHO TRANSGÊNICO	43
INTRODUÇÃO	44
MATERIAL E MÉTODOS	46
RESULTADOS.....	50
DISCUSSÃO.....	55
CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO	73

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos maiores produtores de grãos do mundo, sendo a soja e o milho as principais culturas produzidas com produção estimada para a safra 2018/19, em cerca de 113,5 e 92,8 milhões de toneladas, respectivamente (CONAB, 2019).

A elevada produção brasileira é resultado principalmente, devido ao uso de cultivares com alto potencial de rendimento em combinação com a tolerância ou a resistência a herbicidas, a insetos (MAROCHI et al., 2018) e a doenças (CARRER et al., 2010). O Brasil cultivou aproximadamente 50,2 milhões de hectares com culturas transgênicas nas safras de verão e inverno de 2017, e desses, 33,7 milhões de hectares foram semeados com soja e 15,6 milhões de hectares com milho (ISAAA, 2019).

Essas cultivares transgênicas são obtidas por meio de uma técnica chamada transgenia que possibilita a transferência de características de interesse agrônomo entre espécies diferentes (EMBRAPA, 2017). Então, transgênicos ou organismos geneticamente modificados (OGMs) como são chamados, são organismos que receberam a inserção de um gene de outro organismo. Em plantas, esta modificação no DNA permite que esta expresse uma característica que não possuía antes (EMBRAPA, 2017), e pode conferir resistência a insetos, doenças bem como a resistência a herbicidas (CÉLERES, 2017). Um dos objetivos da transgenia é proporcionar uma agricultura menos vulnerável e ao mesmo tempo mais produtiva e econômica, já que as plantas transgênicas apresentam, conseqüentemente, mais resistência a herbicidas e a doenças, o que faz com que o uso de agrotóxicos seja menor, reduzindo custos nos cultivos (ORENSTEIN, 2017). Contudo, em relação à tecnologia com resistência a herbicidas, os transgênicos visam melhorar o controle de um dos maiores problemas que as culturas agrícolas enfrentam que é a competição com as plantas daninhas.

As plantas daninhas competem por água, luz e nutrientes com as culturas de interesse agrícola (REIMCHE, 2014), o que afeta a produtividade e a qualidade dos produtos colhidos (VASCONCELOS et al., 2012). Para resolver esse problema torna-se necessário 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). Entretanto o uso de um mesmo herbicida ou mecanismo de ação de forma contínua como ferramenta de manejo contribui para a seleção de biótipos de plantas daninhas resistentes nas lavouras (NORSWORTHY et al., 2012), como o que aconteceu com a introdução comercial das culturas transgênicas resistentes ao glyphosate,

a tecnologia Roundup Ready (RR[®]). Essa tecnologia proporcionou praticidade e controle eficaz com uso deste herbicida e reduziu ou eliminou a necessidade da aplicação de outros produtos com diferentes mecanismos de ação para o manejo de diversas espécies de plantas daninhas. Este fato gerou uma pressão de seleção muito alta, promovendo a seleção de espécies resistentes a esse herbicida (SHANER, 2000; BECKIE et al., 2006; RIZZARDI; SILVA, 2014).

As plantas daninhas resistentes ao glyphosate apresentam-se como uma grande limitação para as lavouras, principalmente para as culturas de soja e milho (VILA-AIUB, 2008). Atualmente, existem cerca de 43 casos de plantas daninhas resistentes ao glyphosate, e dentre essas, estão as espécies: *Lolium perenne* ssp. *multiflorum* (azevém), *Conyza bonariensis*, *C. canadenses* e *C. sumatrensis* (espécies de buva), *Digitaria insularis* (capim-amargoso), *Chloris elata* (capim-branco), *Amaranthus palmeri* (caruru-palmeri) e *Eleusine indica* (capim pé-de-galinha) (HEAP, 2019).

Algumas ferramentas essenciais para reduzir essa pressão de seleção de biótipos resistentes seriam rotações de herbicidas ou combinações com distintos mecanismos de ação, e o uso de culturas de coberturas (BECKIE, 2011; NORSWORTHY et al., 2012; FORTE et al., 2018). Nesse sentido, recentemente se tem a tecnologia chamada de Enlist[™] da *Corteva Agrosiences*, que surge como uma alternativa para gerenciar o problema com plantas daninhas infestantes das culturas da soja e do milho. A soja Enlist[™] contém a adição de três genes para resistência a herbicidas, sendo eles: o ariloxialcanoato dioxigenase-12 (*aad-12*), duplo mutante 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (*2mEPSPS*) e fosfinotricina acetiltransferase (*pat*), que conferem resistência aos herbicidas 2,4-D, glyphosate e amonio-glufosinate, respectivamente (WRIGHT et al., 2010; HEROUET et al., 2005; HEROUET-GUICHENEY, et al., 2009). A resistência ao herbicida 2,4-D, é fornecida através da inserção do gene *aad-12*, que codifica uma isoenzima bacteriana específica de *ariloxialcanoato dioxigenase* (AAD), e faz a clivagem do 2,4-D em 2,4-diclorofenol (DCP), que é uma molécula sem ação herbicida (WRIGHT et al., 2010). A resistência ao amonio-glufosinate ocorre pela inserção do gene *pat* que codifica a proteína PAT a qual elimina a sua atividade herbicida (fosfinotricina) por acetilação (HEROUET et al., 2005; ISAAA, 2019), e a resistência ao glyphosate ocorre também através da inserção de um gene, o *2mepsps*, que foi retirado do milho sendo uma versão modificada do gene *epsps* da planta. Ele diminui a afinidade de ligação ao glyphosate, aumentando assim a resistência à ele (HEROUET-GUICHENEY et al., 2009; ISAAA, 2019).

Já o milho Enlist[™], possui o gene *aad-1* que degrada o herbicida 2,4-D em 2,4-DCP, que não tem atividade herbicida (WRIGHT et al., 2010). Esse gene *aad-1* também é capaz de catalisar a degradação dos herbicidas como o haloxyfop-R e quizalofop-p-ethyl da classe dos

ariloxifenoxipropionatos (AOPPs), aos seus fenóis inativos, fazendo com que a planta seja resistente a esses produtos quando aplicados para o manejo de plantas daninhas. Além disso, esse híbrido de milho apresenta resistência ao glyphosate, por conter o gene *cp4 epsps* da *Agrobacterium tumefaciens*, que codifica a enzima CP4 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (CP4 EPSPS) (WRIGHT et al., 2010) e ao herbicida amonio-glufosinate pela introdução do gene *pat* que elimina a sua atividade herbicida. Desse modo, o milho Enlist™, apresenta resistência aos mesmos herbicidas que a soja, com adição de haloxyfop-R.

Em relação aos mecanismos de ação, o glyphosate em plantas suscetíveis inibe a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que catalisa a reação de chiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato para formar 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato (EPSP) (MAEDA; DUDAREVA, 2012). Essa inibição da enzima EPSPS resulta no acúmulo de chiquimato em plantas sensíveis (SINGH; SHANER, 1998) o que afeta a biossíntese de aminoácidos aromáticos, sendo letal para as plantas (SAMMONS; GAINES, 2014). O 2,4-D é um herbicida auxínico que, quando aplicado em plantas sensíveis em altas doses, induz mudanças metabólicas e bioquímicas, podendo levá-las à morte (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011). Esse herbicida atua no metabolismo da planta por meio do estímulo da síntese de ácidos nucleicos e proteínas, provocando um crescimento anormal e descontrolado, principalmente por afetarem a atividade enzimática, a respiração e a divisão celular (EPA, 2013). Esse crescimento desorganizado gera rapidamente epinastia das folhas e retorcimento do caule, engrossamento das gemas terminais e morte na planta (SILVA et al., 2007). Diferente dos demais, o amonio-glufosinate é um herbicida de contato, mas que tem a capacidade de se translocar na planta a uma curta distância. Esse herbicida atua inibindo a enzima glutamina sintetase via glutamato, paralisa a assimilação do íon amônio (NH_4^+), que é acumulado nas folhas das plantas, provocando diversos efeitos. Dentre os efeitos, estão o acúmulo de amônia, a inibição na síntese de aminoácidos precursores de proteínas, como a prolina e além disso, gera produção de radicais livres, o que promove destruição de membranas, além de bloqueio da fotossíntese, levando a planta à morte (CARVALHO, 2013). O haloxyfop-R é um herbicida com modo de ação sistêmico que faz parte do grupo químico ariloxifenoxipropiônicos (FOPs), e inibe a enzima acetilcoenzima-A carboxilase (ACCase), que realiza a catalise das reações de síntese de ácidos graxos, interrompendo assim, a formação de lipídios e membranas celulares (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011).

A seletividade dos herbicidas pode ser avaliada não só visualmente por meio dos sintomas de fitotoxicidade nas plantas, mas também pela alteração nos parâmetros de fotossíntese e estresse oxidativo (AGOSTINETTO et al., 2016). O uso de herbicidas e outros

fatores estressantes aos quais as plantas estão expostas, como salinidade, seca, metais, altas temperaturas, deficiência de nutrientes e poluição podem gerar uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas plantas (GILL; TUTEJA, 2010).

As EROs são produzidas naturalmente em diversas vias metabólicas encontradas em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos em condições normais (GILL; TUJETTA, 2010) sendo subprodutos do metabolismo aeróbico (BARBOSA et al., 2014), e desempenham um importante papel de sinalização nas plantas, controlando processos como crescimento, desenvolvimento e respostas a estresses ambientais bióticos e abióticos. Apesar disso, quando em excesso, as EROs acabam se tornando tóxicas, induzindo mudanças irreversíveis no metabolismo e promovendo aumento de respostas oxidativas (GOMES et al., 2014), além de reagir com moléculas biológicas e promover danos graves que podem levar à morte celular (BARBOSA et al., 2014). Entre as principais EROs estão o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxil ($^*\text{OH}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SHARMA et al., 2012).

O O_2 (oxigênio molecular) reage com os diferentes componentes para dar origem ao O_2^- , que geralmente é a primeira ERO a ser formada e causa danos menos danosos que o $^*\text{OH}$ (HALLIWELL, 2006). O H_2O_2 , também apresenta uma reatividade moderada, e é formado quando o O_2^- é dismutado a H_2O_2 sob condições de baixo pH, de forma não enzimática, ou principalmente por uma reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014).

Portanto o O_2^- e o H_2O_2 são moderadamente reativos, mas podem sofrer transformações e gerar outras EROs mais reativas e tóxicas como OH^* e $^1\text{O}_2$ que podem danificar diferentes componentes celulares por peroxidação lipídica e danos proteicos (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014). O $^*\text{OH}$ é o mais reativo e mais tóxico das EROs, pois não há sistema enzimático capaz de eliminá-lo, então seu acúmulo excessivo causa a morte celular (PINTO et al., 2003).

O sistema antioxidante enzimático, juntamente com o não enzimático, que é formado por antioxidantes de baixo peso molecular são uma estratégia que as plantas desenvolveram como mecanismo de proteção para tentar prevenir os danos provocados pelas EROs (MITTLER, 2002). O sistema antioxidante enzimático é formado por enzimas, dentre elas temos a: superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), e guaiacol peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7) (DEUNER et al., 2008; BARBOSA et al., 2014).

Sabe-se que a SOD é a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo causado pelos estresses abióticos. A SOD converte o O_2^- em H_2O_2 (SHARMA et al., 2012; KHAKDAN

et al., 2016) e pertence à família das metaloenzimas presentes em todos os organismos aeróbicos. Existem três isoenzimas da SOD, que se diferenciam pelo íon metálico ao qual se ligam, a Mn-SOD é localizada nas mitocôndrias, a Fe-SOD nos cloroplastos e a Cu/Zn-SO no citosol, peroxissomos e cloroplastos (MITTLER, 2002). A APX converte a produção excessiva de H₂O₂ em H₂O apresentando a mesma função que a CAT (HIPPLER et al., 2015; SILVA et al., 2016). Enquanto que a CAT predominantemente age nos peroxissomos onde há maior produção de H₂O₂ devido à β-oxidação de ácidos graxos, fotorrespiração e estresse oxidativo (MITTLER, 2002), a APX executa a mesma função no citosol e no cloroplasto, além de precisar usar ácido ascórbico como agente redutor. Já a CAT, que 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). Em relação à afinidade pelo H₂O₂ a APX se destaca, sendo mais eficiente na remoção de H₂O₂ em momentos de estresse do que a CAT (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014).

Além disso, a GPX também ajuda na remoção de H₂O₂ (MOLLER et al., 2007) e é uma enzima que também contém heme. Essa enzima tem um papel fundamental na biossíntese de lignina, e prefere compostos aromáticos como guaiacol e piragalol (ASADA, 1999) como doadores de elétrons. A GPX atua intracelularmente no citosol e no vacúolo, na parede celular e também extracelularmente, por isso é considerada importante como a enzima na remoção de H₂O₂ (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014).

Quando ocorre ausência de mecanismos de proteção, ou sobrecarga no sistema enzimático, as EROs podem reagir com ácidos graxos insaturados das membranas celulares, resultando em peroxidação lipídica (MADANI et al., 2010). Isso acontece devido às EROs serem muito reativas dentro das células (GILL; TUTEJA, 2010). Além da peroxidação dos lipídios, as EROs acabam causando também outros danos celulares como alterações no DNA e oxidação de proteínas (GILL; TUTEJA, 2010). Desta forma, a peroxidação lipídica pode ser utilizada como um marcador de estresse oxidativo, já que é um dos principais mecanismos de lesão quando o estresse se instala. Esta consequência gera alterações estruturais e funcionais da membrana, promovendo principalmente a perda de integridade, permeabilidade e fluidez, podendo levar à morte celular (SAMPAIO; MORAES, 2010).

Além disso, o aumento de EROs pode ser responsável pela inibição da enzima citoplasmática ALA-D (δ-aminolevulinato desidratase) (FOLMER et al., 2002). Essa enzima é muito importante, principalmente por estar envolvida na síntese de compostos tetrapirrólicos como bilinas, clorofilas e grupamentos heme. A biossíntese da clorofila e a de outros derivados

de tetrapirróis, como o grupamento heme, é um processo vital para as plantas e ocorre através de uma série de complexas reações catalisadas por muitas enzimas (BREINIG et al., 2003).

A síntese do ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA) é a primeira reação da biossíntese de clorofila sendo o ponto de controle na regulação da formação de clorofila. O δ -ALA é sintetizado a partir do glutamato e a enzima ALA-D catalisa a formação de porfobilinogênio (PBG) através de duas moléculas δ -ALA (BREINIG et al., 2003).

A via de biossíntese de clorofila pode ser subdividida portanto em quatro partes: a primeira acontece com a síntese do ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA), a partir do glutamato; a segunda, é onde entra em ação a enzima ALA-D fazendo a condensação de duas moléculas de δ -ALA e formando porfobilinogênio e a montagem de quatro moléculas de PBG conduzindo à síntese de uroporfirinogênio III após várias reações que se seguem; a terceira etapa envolve a síntese de protoporfirina IX através de várias reações de descarboxilação e oxigenação, e na última há a inserção de magnésio (Mg) na protoporfirina, levando à formação de clorofila. Nas plantas superiores, a síntese de tetrapirróis ocorre nos plastídios (TRIPATHY; PATTANAYAK, 2011). Então a inibição da ALA-D pode estar intimamente ligada a uma inibição da síntese de clorofila, já que ela é uma enzima chave nessa síntese (TANAKA; TANAKA, 2007).

Ainda, com a inibição da ALA-D ocorre o acúmulo do seu substrato δ -ALA, o que está associado também a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, e consequentemente, a geração de estresse oxidativo (BECHARA, 1996). Portanto, por ser uma enzima muito sensível da rota biossintética do heme, a ALA-D tem sido relatada como marcadora de estresse oxidativo (FOLMER et al., 2003).

Por isso, o estudo das enzimas é de fundamental importância em bioquímica e fisiologia vegetal, visto que praticamente, todas as respostas da planta envolvem processos metabólicos, que são regulados por vários complexos enzimáticos (NEGRÃO et al., 2014). Além do mais, existem poucos estudos relacionados aos mecanismos bioquímicos de resposta ao estresse provocado pela aplicação de herbicidas e principalmente na atividade de enzimas antioxidantes em plantas. A maioria dos estudos com enzimas se concentra em herbicidas como glyphosate (MOLDES et al., 2008; GOMES; JUNEAU, 2016), efeitos de outros herbicidas como bentazon, clodinafop, iodosulfuron, metribuzin, metsulfuron e 2,4-D em plantas de trigo (AGOSTINETTO et al. 2016), e fomesafen e sulfentrazone em diferentes espécies (ALVES et al., 2018), e ainda, amonio-glufosinate em arroz transgênico (AHN, 2008).

Portanto, os herbicidas estão entre os fatores de estresse aos quais as plantas estão submetidas. Dessa forma, considerando a importância, a ascensão do cultivo de soja, de milho,

e o surgimento de novas tecnologias, torna-se importante avaliar e estudar as injúrias provocadas, à nível celular, além da compreensão de outros processos envolvidos pela aplicação de herbicidas usados no manejo de plantas daninhas. Esses estudos podem possibilitar a escolha de se usar herbicidas que apresentem uma maior eficácia para o controle de plantas daninhas, e que ao mesmo tempo sejam menos danosos para as culturas de interesse e o ambiente, proporcionando dessa maneira, um aumento da produção agrícola. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar se a aplicação de herbicidas afeta negativamente a atividade de enzimas antioxidantes e da ALA-D de cultivares de soja e milho resistentes aos herbicidas glyphosate, 2,4-D e amonio-glufosinate, incluindo haloxyfop-R no caso do milho.

RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de dois artigos científicos que, após tradução para o inglês, serão submetidos para publicação em revistas científicas da área de bioquímica toxicológica, escolhidas posteriormente.

Artigo 1: SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E ENZIMA ALA-D EM SOJA ENLIST E3™ APÓS APLICAÇÃO DE HERBICIDAS

Artigo 2: EFEITO DE HERBICIDAS NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E ALA-D EM HÍBRIDO DE MILHO TRANSGÊNICO

Artigo 1:

**SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E ENZIMA ALA-D EM
SOJA ENLIST E3™ APÓS APLICAÇÃO DE HERBICIDAS**

SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E ENZIMA ALA-D EM SOJA ENLIST E3™ APÓS APLICAÇÃO DE HERBICIDAS

RESUMO –A tecnologia Enlist™ confere resistência aos herbicidas 2,4-D, glyphosate e amonio-glufosinate para a cultura da soja. No entanto, a aplicação de herbicidas em plantas pode gerar estresse mesmo em culturas resistentes. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar se a aplicação de herbicidas em cultivares transgênicas de soja resistente aos herbicidas glyphosate, 2,4-D e amonio-glufosinate afeta negativamente a atividade de enzimas antioxidantes e ALA-D. O experimento foi realizado em casa de vegetação na Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim no ano de 2018. O delineamento foi de blocos inteiramente casualizados, com quatro repetições com duas plantas por repetição, utilizando-se as cultivares transgênicas de soja e milho Enlist™. A aplicação dos herbicidas foi efetuada em pós-emergência de forma isolada ou em misturas em tanque nas doses recomendadas para o controle de plantas daninhas. Aos 7 dias após a aplicação dos herbicidas, a parte aérea das plantas foi coletada e posteriormente macerada em nitrogênio líquido e utilizada na determinação da atividade das enzimas antioxidantes como catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX), assim como os níveis de peroxidação lipídica e a atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (ALA-D) das plantas. Os resultados demonstraram que houve aumento na atividade da APX após aplicação de glyphosate e 2,4-D, e aumento da CAT com o uso do amonio-glufosinate. Não houveram alterações significativas na peroxidação lipídica e na atividade da GPX em nenhum tratamento tanto de forma isolada, bem como em mistura e a enzima ALA-D foi inibida nos tratamentos com glyphosate e 2,4-D. Em suma, a cultivar de soja com a tecnologia Enlist™ apresentou uma ativação na atividade de enzimas antioxidantes importantes no mecanismo na eliminação de EROs de forma a não causar danos severos aos lipídios das plantas, mas ainda assim, houve inibição da enzima ALA-D.

Palavras-chave: *Glycine max* L, estresse oxidativo, novas tecnologias.

ABSTRACT- Enlist™ technology confers resistance to 2,4-D herbicides, glyphosate and ammonium glufosinate for soybeans. However, the application of herbicides to plants can generate stress even in resistant crops. Thus, the present study aims to evaluate whether the application of herbicides in transgenic soybean cultivars resistant to the herbicides glyphosate, 2,4-D and ammonium glufosinate negatively affects the activity of antioxidant enzymes and ALA-D. The experiment was carried out in a greenhouse at the Federal University of the South Frontier, Campus Erechim in the year 2018. The design was completely randomized blocks, with four replications with two plants per replicate, using the transgenic cultivars of soybean and corn Enlist™. The application of the herbicides was carried out in an isolated post-emergence or in tank mixtures at the doses recommended for the control of weeds. At 7 days after herbicide application, the aerial part of the plants was collected and later macerated in liquid nitrogen and used to determine the activity of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GPX) such as lipid peroxidation levels and the activity of the enzyme delta-aminolevulinatase dehydratase (ALA-D) in plants. The results showed that there was an increase in APX activity after application of glyphosate and 2,4-D, and increase of CAT with the use of ammonium glufosinate. There were no significant changes in lipid peroxidation and GPX activity in any treatment either alone or in admixture, and the ALA-D enzyme was inhibited in glyphosate and 2,4-D treatments. In summary, the soybean cultivar with the Enlist™ technology showed an activation in the

activity of important antioxidant enzymes in the mechanism in the elimination of ROS so as not to cause severe damages to the plant lipids, but still, there was inhibition of the enzyme ALA-D.

Key words: *Glycine max* L, oxidative stress, new technologies.

INTRODUÇÃO

Novas cultivares geneticamente modificadas estão surgindo, como a tecnologia Enlist™, da empresa Corteva Agrosciences™ que confere resistência ao herbicida 2,4-D, em diversas culturas, dentre elas, soja, milho e algodão. Essa resistência ao herbicida 2,4-D é proveniente da inserção de um transgene que codifica uma isoenzima bacteriana específica de ariloxialcanoato dioxigenase (AAD), que cliva o 2,4-D em um metabólito que não contém ação herbicida, o 2,4-Diclorofenol (WRIGHT et al., 2010). A soja Enlist™ possui três genes, sendo eles: ariloxialcanoato dioxigenase-12 (*aad-12*), originalmente isolado da bactéria *Delftia acidovorans*, responsável pela resistência ao 2,4-D, a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (duplo mutante) (*2mEPSPS*) e a enzima fosfinotricina acetiltransferase (*pat*), que lhe confere resistência a mais dois herbicidas, glyphosate e amonio-glufosinate, respectivamente (WRIGHT et al., 2010).

Em plantas suscetíveis, o glyphosate age na via do ácido chiquímico (MONQUEIRO et al. 2004) e inibe especificamente a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que catalisa a reação: fosfoenolpiruvato + 3-fosfosfâmiato → fosfato + 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato (EPSPs), impossibilitando assim, a biossíntese de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, triptofano e tirosina (TZIN; GALILI, 2010).

O 2,4-D é um herbicida auxínico e herbicidas com esse mecanismo de ação atuam como agonistas de auxina, imitando o hormônio de crescimento das plantas indole-3-acético (AIA). No entanto em altas doses, acaba ocasionando a alteração do crescimento normal e desenvolvimento das plantas e até a morte (SENSEMAN, 2007).

O amonio-glufosinate, por sua vez, possui o mecanismo de inibir a enzima glutamina sintetase em plantas não resistentes, por se ligar irreversivelmente à enzima no sítio de ação do glutamato, o que gera um acúmulo de amônio em níveis tóxicos e a inibição da fotorrespiração causada pela diminuição dos níveis de aminoácidos (DUKE; DAYAN, 2011).

Sabe-se que os herbicidas podem gerar condições de estresse nas plantas até mesmo em culturas consideradas resistentes e com isso comprometer além de seu crescimento e

desenvolvimento a produtividade (AGOSTINETTO et al., 2016; GILL; TUTEJA, 2010). Os herbicidas portanto são capazes de originar uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são subprodutos de diversas vias metabólicas em compartimentos celulares das plantas, tais como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Quando em excesso, as EROs acabam sendo muito reativas e tóxicas, tendo potencial de promover danos a proteínas, lipídios, carboidratos e DNA, o que acaba resultando em estresse oxidativo (GILL; TUTEJA, 2010).

Dentre as principais EROs estão o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2) (GILL; TUTEJA, 2010). Para mitigar esses efeitos do estresse oxidativo, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos que desempenham um importante papel no controle do acúmulo de EROs. O sistema enzimático é formado pela superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) que dismuta o O_2^- a H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), que também é tóxico para as células. Este peróxido de hidrogênio, é reduzido pelas enzimas ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), catalase (CAT, 1.11.1.6) (SHARMA et al., 2012), além de outras, as quais têm o papel de converter a produção de H_2O_2 em H_2O e O_2 (SHEHAB et al., 2010; HIPPLER et al., 2015; SILVA et al., 2016). Ainda, há outra peroxidase que também auxilia na remoção de H_2O_2 que é a guaiacol peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7) (BARBOSA et al., 2014).

Geralmente, essa resposta antioxidante costuma variar de acordo com o modo de ação do herbicida utilizado e de acordo com a espécie (SHARMA et al., 2012). Ao ocorrer um desequilíbrio entre a produção e eliminação de EROs, acaba havendo danos às proteínas e aos ácidos nucleicos, além da peroxidação de lipídios de membrana, podendo levar as células da planta à morte, o que resultaria em danos à planta em diferentes proporções (MILLER et al., 2010).

Além disso, há relatos de que a exposição a herbicidas pode afetar também a atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase (ALA-D, E.C.4.2.1.24) que é uma enzima chave nas plantas (NEMAT ALLA; HASSAN, 2014; TANAKA; TANAKA, 2007). Essa enzima é responsável por catalisar a condensação de duas moléculas de ácido delta-aminolevulínico (δ -ALA), com a formação do composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG) (BREINIG et al., 2003). Essa reação é importante por ser necessária para a síntese de compostos tetrapirrólicos (bilinas, clorofilas e heme) que são essenciais em vários processos biológicos nas plantas, como a fotossíntese e respiração (TANAKA; TANAKA, 2007).

Ao considerar a importância da capacidade da planta em reverter situações de estresse através da defesa antioxidante e sabendo que os herbicidas podem gerar condições de estresse nas plantas até mesmo em culturas consideradas resistentes é imprescindível o estudo da

resistência de plantas ao estresse causado por herbicidas e as consequências desse estresse à nível celular. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar se a aplicação de herbicidas afeta negativamente a atividade de enzimas antioxidantes e da ALA-D em cultivar transgênica de soja resistente aos herbicidas glyphosate, 2,4-D e amonio-glufosinate.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Erechim, RS, Brasil, no período de junho a julho de 2018. Foi utilizada uma cultivar de soja transgênica com resistência aos herbicidas glyphosate, amonio-glufosinate e 2,4-D (Enlist™ - DAS 44406-6). O cultivo das plantas foi em solo e substrato na proporção de 1:1 para cada material, em copos de plástico de 0,5 L.

O delineamento utilizado foi completamente casualizado, com quatro repetições, com duas plantas por repetição. Os tratamentos foram compostos por uma testemunha (sem aplicação) e pelo uso dos herbicidas e suas respectivas doses, as quais foram utilizadas por serem as recomendadas para o controle de plantas daninhas sendo descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Tratamentos e doses dos herbicidas aplicados na soja Enlist™ (DAS 44406-6). UFFS, Erechim/RS, 2018.

Tratamentos	Dose (g ha⁻¹) de (i.a ou e.a)*	Nome Comercial	Dose comercial L ha⁻¹
Testemunha sem herbicidas	---	---	---
Glyphosate	1080	Roundup Original®	3,0
2,4-D	670	DMA 806 BR®	1,0
Amonio-glufosinate	400	Finale®	2,0
Glyphosate + 2,4-D	1080+670	Roundup Original®+2,4-D	3,0+1,0
Glyphosate + amonio-glufosinate	1080+400	Roundup Original®+Finale®	3,0+2,0
Amonio-glufosinate + 2,4-D	400+670	Finale®+DMA 806 BR®	2,0+1,0
Glyphosate + amonio-glufosinate + 2,4-D	1080+400+ 670	Roundup Original®+Finale® +2,4-D	3,0+2,0+ 1,0

* Doses recomendadas pelo fabricante para o controle de plantas daninhas.

A aplicação dos tratamentos foi realizada aos 22 dias após a emergência da soja, que estava no estágio V1 (com o primeiro nó visível), com um pulverizador costal pressurizado a CO₂, acoplado a essa uma barra de pulverização com quatro pontas do tipo DG 110.02, o qual aspergiu uma vazão 150 L ha⁻¹.

Aos 7 dias após a aplicação dos tratamentos, todas as plantas foram coletadas a uma distância de 1 cm do solo com o auxílio de tesouras, utilizando-se nitrogênio líquido, para não ocorrer degradação do material vegetal, e posteriormente foram maceradas também em nitrogênio líquido e mantidas em ultrafreezer à -80°C até a realização das análises bioquímicas.

Determinação das enzimas do sistema antioxidante

Preparação do extrato

O extrato enzimático para a determinação das atividades das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX) foi obtido através da homogeneização de 0,3 g de tecido vegetal em polivinilpolipirrolidona (PVPP 10%) e 1,5 mL de tampão de extração contendo fosfato de potássio 200 mM (pH 7,8), EDTA 10 mM, ácido ascórbico 200 mM e água *Milli-Q*. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 12000 g por 20 min à 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para mensurar a atividade enzimática e a quantificação das proteínas que foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina sérica bovina como padrão.

Catalase

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 a 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.

Ascorbato peroxidase

A atividade da ascorbato peroxidase seguiu o método de Nakano e Asada (1981), onde o meio de reação continha tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 10 mM, H₂O₂ 2 mM água *Milli-Q*, e extrato enzimático. A temperatura foi mantida constante à 27°C por imersão das amostras em banho-maria. A diminuição da absorbância a 290 nm durante 2 minutos foi registrada com intervalos de 10 em 10 segundos. A atividade enzimática foi expressa em Umol min/mg/proteína.

Guaiacol Peroxidase

A atividade da enzima guaiacol peroxidase foi determinada segundo Zeraik et al. (2008), utilizando guaiacol como substrato. A mistura de reação conteve 99 μL de tampão de fosfato de potássio (100 mM, pH 6,5), 99 μL de guaiacol (15 mM) e 99 μL de H_2O_2 (3 mM). Após a homogeneização, 5 μL do extrato de plantas foi adicionado a esta solução. A atividade da enzima foi medida através de espectrofotometria por oxidação de guaiacol em tetraguaiacol aumentando a absorbância a 470 nm. Os resultados estão expressos em U/mg de proteína.

δ -aminolevulinato desidratase (δ ALA-D)

O tecido vegetal foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, numa proporção de 1: 1 (p / v). O homogeneizado foi centrifugado a 6000 rpm a 4°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) aferindo-se a taxa de formação de porfobilinogênio (PBG). O meio de incubação dos ensaios continha tampão Tris-HCl 100 mM, PH 9,0 e o substrato ALA 3,6 mM. A incubação foi iniciada pela adição de 50 μL da preparação de tecido a um volume final de 300 μL e interrompida pela adição de 175 μL da mistura contendo 10% de ácido tricloroacético (TCA) e 10 mM de HgCl_2 . O produto da reação foi determinado com o reagente de Erlich a 555 nm, usando um coeficiente de absorção molar de $6,1 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (SASSA, 1982) para o sal de Erlich-porfobilinogênio. Os resultados foram expressos em nmol de PBG/h/mL.

Peroxidação Lipídica (TBARS)

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 a temperatura ambiente. Uma parte do sobrenadante (0,5 mL) foi misturado com 0,5 mL de solução de TBA+ (ácido tricloroacético 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 tricloroacético a 100%, hidroxitolueno butilado 0,1% e água MiliQ) 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: 440nm, 532nm e 600nm. Os equivalentes de MDA (TBARS) foram calculados com a seguinte fórmula:

$$[(\text{Abs } 532 + \text{TBA}) - (\text{Abs } 600 + \text{TBA}) - (\text{Abs } 532 - \text{TBA} - \text{Abs } 600 - \text{TBA})] = A$$

$$[(\text{Abs } 440 + \text{TBA} - \text{Abs } 600 + \text{TBA}) \times 0,0571] = B$$

$$\text{TBARS (nmol/ml)} = (A - B/157.000) \times 10^6$$

A razão entre o conteúdo de TBARS e o peso seco da amostra foi calculada. Os dados foram expressos em nmol/mL.

Análise estatística

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 a $p < 0,05$.

RESULTADOS

Peroxidação Lipídica

Os valores de peroxidação lipídica, não foram significativos em nenhum tratamento, quando comparado ao controle (Figura 1).

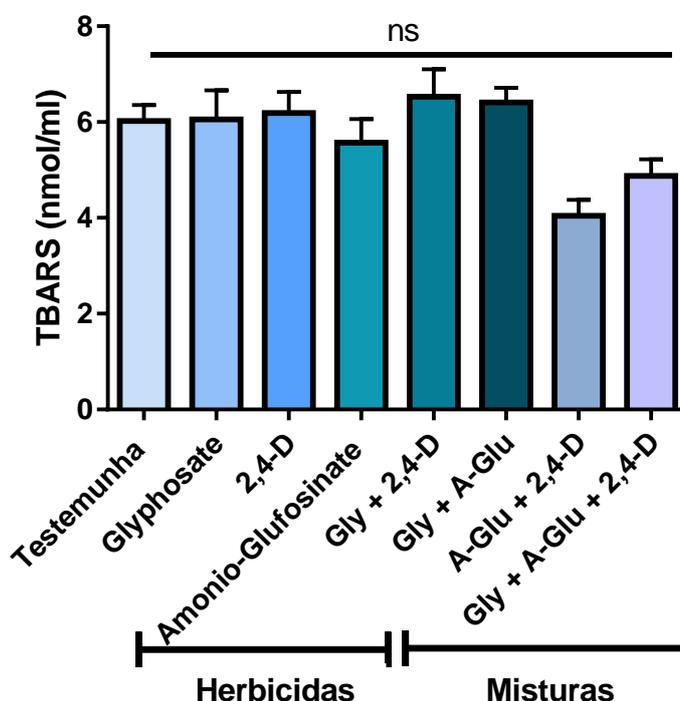


Figura 1- Efeito de herbicidas aos 7 dias após a aplicação em soja Enlist sobre a peroxidação lipídica. Gly: glyphosate; A- Glu: amonio-glufosinate. Os dados estão expressos em nmol/mL. Os tratamentos diferem pelo teste de Dunnet em comparação com a testemunha sem herbicida: $p < 0,05$ (*); $p < 0,005$ (**); $p < 0,001$ (***) ; ns= não significante ($p < 0,05$). As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

Catalase

A maior atividade da CAT (106%) foi observada após exposição das plantas ao herbicida amonio-glufosinate. Os demais tratamentos não demonstraram efeitos significativos na atividade dessa enzima em relação ao controle (Figura 2).

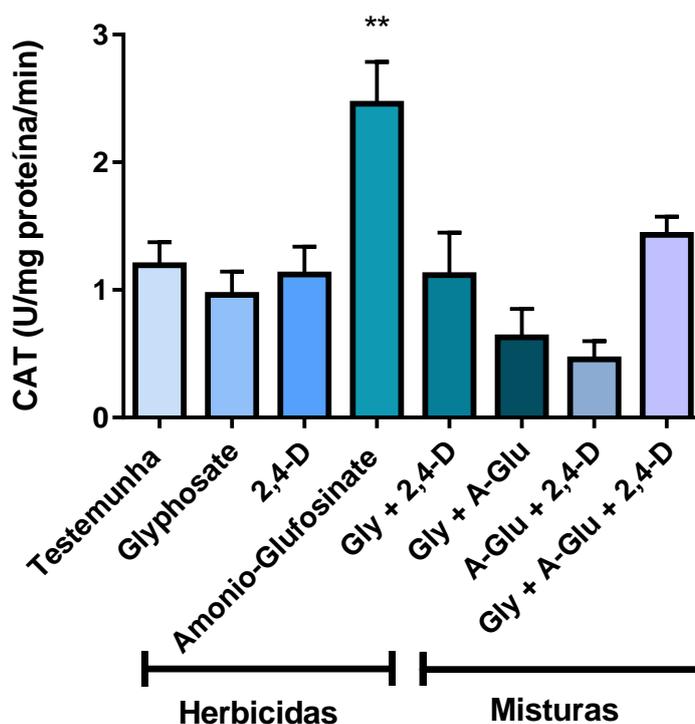


Figura 2- Efeito de herbicidas aos 7 dias após a aplicação em soja Enlist sobre a catalase. Gly: glyphosate; A-Glu: amonio-glufosinate. Os dados estão expressos em Unidades/mg de proteína/min. Os asteriscos indicam a significância estatística quando os tratamentos diferem pelo teste de Dunnet em comparação com a testemunha sem herbicida: $p < 0,05$ (*); $p < 0,005$ (**); $p < 0,001$ (***). As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

Ascorbato peroxidase

A atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) aumentou após as plantas serem expostas a glyphosate (445%) e 2,4-D (251%), e na mistura dos dois herbicidas (263%). Para os demais tratamentos, não houve diferença significativa em relação ao controle (Figura 3).

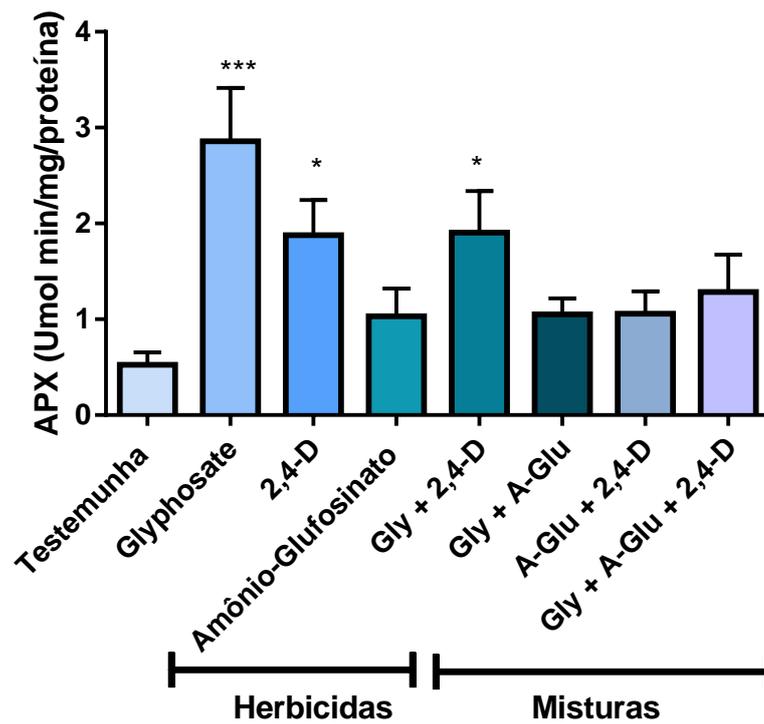


Figura 3- Efeito de herbicidas após 7 dias de aplicação na soja Enlist sobre a ascorbato peroxidase. Gly: glyphosate; A-Glu: amonio-glufosinate. Os dados estão expressos em Umol min/mg/proteína Os asteriscos indicam a significância estatística quando os tratamentos diferem pelo teste de Dunnet em comparação com a testemunha sem herbicida: $p < 0,05$ (*); $p < 0,005$ (**); $p < 0,001$ (***). As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

Guaiacol peroxidase

A enzima GPX não teve atividade alterada significativamente em nenhum dos tratamentos em comparação ao controle, testemunha sem aplicação (Figura 4).

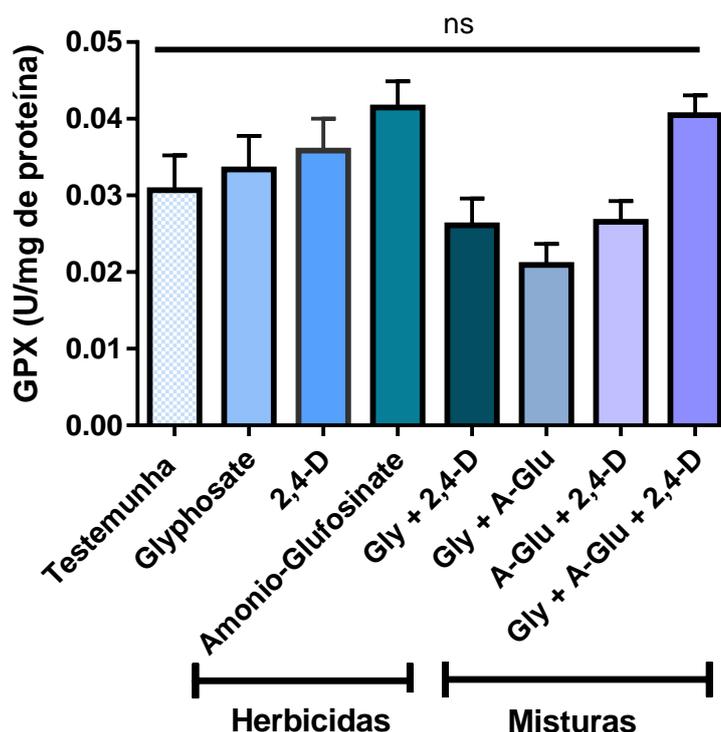


Figura 4 - Efeito de herbicidas após 7 dias de aplicação na soja Enlist sobre a guaiacol peroxidase. Gly: glyphosate; A-Glu: amonio-glufosinate. Os dados estão expressos em U/mg de proteína. Os tratamentos diferem pelo teste de Dunnet em comparação com a testemunha sem herbicida: $p < 0,05$ (*); $p < 0,005$ (**); $p < 0,001$ (***) ; ns= não significante ($p < 0,05$). As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

δ ALA-D

A exposição aos herbicidas resultou em uma diminuição da atividade da enzima δ ácido aminolevulinato desidratase (ALA-D) (Figura 5) em comparação à testemunha sem herbicida nos tratamentos com glyphosate (34%), 2,4-D (35%), glyphosate + 2,4-D (47%) e amonio-glufosinate + 2,4-D (37%). Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao controle.

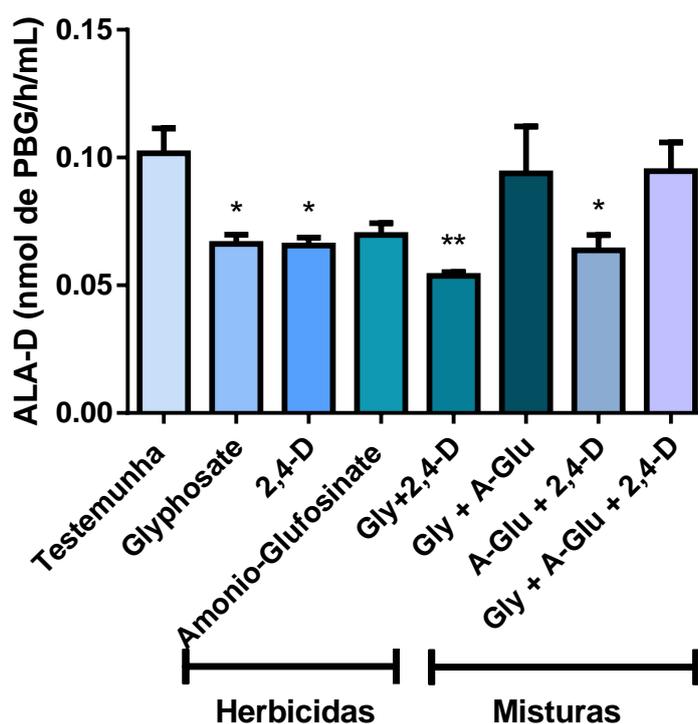


Figura 5- Efeito de herbicidas após 7 dias de aplicação na soja Enlist sobre a δ ácido aminolevulinato desidratase. * Gly: glyphosate; A-Glu: amonio-glufosinate. Os dados estão expressos em nmol de PBG/h/mL. Os asteriscos indicam a significância estatística quando os tratamentos diferem pelo teste de Dunnet em comparação com a testemunha sem herbicida: $p < 0,05$ (*); $p < 0,005$ (**); $p < 0,001$ (***)). As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

DISCUSSÃO

Como as membranas celulares são os primeiros alvos de muitos estresses de plantas, a manutenção de sua integridade e estabilidade sob condições de estresse é um componente importante da resistência aos herbicidas em plantas. Neste trabalho, de acordo com a avaliação da peroxidação lipídica, a soja transgênica não apresentou alterações significativas em nenhum tratamento quando comparado ao controle aos 7 dias após a aplicação dos herbicidas (Figura 1). O resultado encontrado pode estar relacionado ao aumento da defesa antioxidante. Porém essa ação não pode ser atribuída somente às enzimas antioxidantes estudadas como a CAT e a APX que decompõem diretamente o H_2O_2 . Já que o H_2O_2 geralmente não causa danos aos lipídios, portanto esse resultado deve ser conferido possivelmente também, às outras enzimas antioxidantes (SOD, glutathione redutase (GR), entre outras), e ao sistema antioxidante não enzimático (ácido ascórbico (AsA), glutathione (GSH), carotenoides) (MITTLER, 2002), como um mecanismo de resposta para superar a superprodução de EROs, possivelmente causada pela

aplicação dos herbicidas. Esta resposta enzimática apresenta potencial para atuar na prevenção da peroxidação oxidativa das membranas biológicas, que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção e eliminação dessas espécies reativas.

Para evitar os danos oxidativos, mesmo em pequenos níveis de H_2O_2 há aumento da atividade das enzimas antioxidantes nas plantas (OLIVEIRA, 2013). A indução das enzimas CAT e APX, pode estar associada ao fato destas enzimas agirem frente à geração de peróxidos como H_2O_2 (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILLIOU, 1999), controlando assim, a condição de estresse oxidativo.

Dentre as enzimas que atuam na defesa antioxidante, a SOD tem função de catalisar a dismutação do superóxido (O_2^-) para H_2O_2 e O_2 (GILL; TUTEJA, 2010), mas essa enzima não foi avaliada neste estudo. Nosso objetivo foi avaliar somente a catalase e as peroxidases relacionadas à decomposição dos teores de H_2O_2 , como a APX e GPX.

Depois da SOD, uma das principais e mais eficazes é a CAT (AKCAY et al. 2010), que atua nos glioxissomos, peroxissomos, e mitocôndrias das células vegetais (BARBOSA et al., 2014), e como já mencionado, decompõe o peróxido de hidrogênio que foi produzido pela SOD, em H_2O e O_2 (SHEHAB et al., 2010).

Aos 7 dias após a aplicação do amonio-glufosinate, houve um aumento na atividade da CAT na soja (Figura 2). Provavelmente, essa mudança na atividade da CAT está ligada à ação do amonio-glufosinate, mesmo após a sua atividade herbicida ter sido eliminada através do gene *Pat*, ou seja, uma ativação de CAT indica uma maior geração de EROs, especialmente de H_2O_2 , que é o seu substrato. Já, quando este herbicida esteve associado aos outros nas misturas, não provocou nenhum aumento dessa enzima em relação ao controle. Mas em contrapartida ao aumento da CAT, o amonio-glufosinate não provocou aumento na atividade da enzima APX (Figura 3), que também foi avaliada neste estudo.

A APX é uma das enzimas mais importantes e fundamentais do metabolismo antioxidante, pois ela catalisa a decomposição do H_2O_2 em água, utilizando o ascorbato como doador de elétrons (SHIGEOKA et al., 2002). Nesse trabalho, foi constatado um aumento de sua atividade na soja transgênica quando aplicado o herbicida glyphosate (Figura 3).

Embora o mecanismo de ação do glyphosate não seja exercer estresse oxidativo, o aumento das atividades de enzimas como CAT, GPX e APX indicam geração de EROs e respostas antioxidantes após o tratamento com o herbicida (MOLDES et al., 2008). Já existem indícios em estudos de que o glyphosate pode afetar outros processos fisiológicos das plantas além do seu sítio de ação (GOMES et al., 2014; GOMES; JUNEAU, 2016). De acordo com o resultado observado no presente estudo, é evidente que o glyphosate pode interferir em outros

processos na planta, além de seu mecanismo de ação que age na via do ácido chiquímico e inibe a enzima EPSPs. Uma hipótese seria que o glyphosate possa ter afetado o fluxo de elétrons, durante a respiração celular das plantas e com isso ter causado geração de EROs na soja Enlist™.

De fato, um estudo que abordou sobre o sítio específico de indução de EROs por este herbicida foi realizado por Gomes e Juneau (2016) em lentilha (*Lemna minor* L), os quais observa que o glyphosate, pode interferir na atividade mitocondrial por prejudicar o fluxo normal de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, durante a respiração celular das plantas, pois ele age inibindo a atividade do Complexo III e isso pode acabar prejudicando o metabolismo energético gerando EROs e, conseqüente, promovendo redução de produtividade e crescimento das plantas.

O 2,4-D ocasionou o aumento da atividade da APX (Figura 3), o que mostra que o herbicida também provocou geração de EROs. É provável que com a introdução do gene que possibilita a resistência a 2,4-D na soja, há a clivagem desse herbicida em um metabólito isento da ação, o 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), desse modo pode-se sugerir que a metabolização desse composto poderia gerar a formação de EROs, sendo essa hipótese disposta em relação ao aumento da atividade da enzima APX na planta. Em um estudo com *Skeletonema costatum* foi evidenciado um aumento da atividade das enzimas APX e SOD após uma exposição de 96 horas ao 2,4-DCP (YANG et al., 2012). Além disso, a mistura dos dois herbicidas (glyphosate+2,4-D) também promoveu uma ativação na APX, mas que foi menor do que quando aplicados de forma isolada.

Esse comportamento visto entre as duas enzimas (CAT e APX) pode ser explicado com base às suas afinidades distintas ao substrato. A APX possui alta afinidade com o H₂O₂, e atua quando este está presente em baixas concentrações e a CAT, por outro lado, tem comportamento contrário (GILL; TUJETA, 2010). Então os resultados podem estar relacionados com a quantidade de H₂O₂ formada devido a exposição a cada herbicida. Portanto, uma hipótese seria que quando a cultura transgênica foi submetida aos herbicidas glyphosate e 2,4-D tanto de forma isolada como em mistura, a quantidade de H₂O₂ produzida foi suficiente somente para ativar a APX (RICE-EVANS et al., 1991). Tal fato explicaria o aumento da atividade da APX em relação aos tratamentos com glyphosate, 2,4-D e à mistura glyphosate + 2,4-D, enquanto que a CAT não foi ativada nesses tratamentos. A CAT teve sua atividade aumentada somente após a exposição ao amonio-glufosinate. Supostamente isso ocorreu pois geralmente quando o H₂O₂ é produzido nos cloroplastos, este é eliminado pelas enzimas APX, enquanto quando é produzido nos peroxissomos/ glioxissomos é removido pelas CAT (MITTLER et al., 2004;

KOTCHONI; GACHOMO, 2006). Então talvez o herbicida amonio-glufosinate tenha gerado maior quantidade de H₂O₂ nos peroxissomos/glioxissomos, por isso a única enzima ativada foi a catalase, podendo esclarecer o porquê da enzima APX não ser ativada nesse tratamento já que tem alta afinidade pelo H₂O₂. Em suma, isso corrobora para o fato das duas agirem em conjunto na remoção de EROs (GILL; TUTEJA, 2010).

Como a CAT e a APX, a guaiacol peroxidase (GPX) também é especializada na remoção de H₂O₂ (MOLLER et al., 2007). Porém, nesse estudo, a atividade da GPX não foi influenciada pelos tratamentos realizados em comparação com a testemunha (Figura 4).

No geral, as misturas que continham amonio-glufosinate associado a outros herbicidas, como glyphosate + amonio-glufosinate, amonio-glufosinate + 2,4-D e glyphosate + amonio-glufosinate + 2,4-D, não provocaram um aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes na cultivar de soja Enlist (Figuras 2, 3 e 4). Esse fato pode ser explicado por um possível efeito antagônico, o que é comum em misturas de herbicidas que não são comerciais (GAZZIERO, 2015), e acontece quando a interação representa um efeito menor à soma dos efeitos dos produtos aplicados de forma isolada (GRESSEL, 1990). Esse efeito pode ter sido provocado pela mistura de amonio-glufosinate, herbicida de contato com o glyphosate e/ou com 2,4-D, que são sistêmicos, o que pode ter resultado em uma menor atividade herbicida. Mas esse pequeno efeito antagônico acabou sendo benéfico, não causando estresse e conseguindo manter um equilíbrio na produção de EROs.

Casos de antagonismo das misturas descritas acima são relatados em poucos estudos na literatura. Um deles mostra um antagonismo na mistura de glyphosate + amonio-glufosinate em capim pé-de-galinha (*Eleusine indica* L.) (CHUAH et al., 2008). Esse antagonismo foi hipoteticamente explicado pelo fato do amonio-glufosinate apresentar uma ação rápida, que impediria que o glyphosate que é sistêmico e possui ação mais lenta agisse, impossibilitando assim a sua absorção e translocação (CHUAH et al., 2008). Então, essa seria uma hipótese para o que ocorreu aqui neste trabalho, ou seja, o amonio-glufosinate teria agido mais rápido frente aos herbicidas sistêmicos prejudicando as suas ações na cultivar de soja, mesmo ela sendo resistente. Antagonismo como esse também foi relatado quando o glyphosate foi misturado à outro herbicida de contato como Diquat (WEHTJE et al., 2008). E ainda, outros estudos também revelaram uma interação antagônica entre glyphosate e amonio-glufosinate (BETHKE et al., 2013; BESANÇON et al., 2018).

Além disso, algumas pesquisas descobriram antagonismo ao misturar herbicidas com mecanismo de ação auxínico com glyphosate ou amonio-glufosinate (CRAIGMYLE et al., 2013), corroborando com o resultado encontrado aqui.

A ALA-D, uma outra enzima considerada biomarcadora de estresse oxidativo, mas que não tem papel antioxidante e que tem sido pouco estudada em plantas (CHAI et al., 2017), também foi avaliada neste trabalho. Em relação a sua atividade, foi observada uma inibição aos 7 dias após a aplicação de glyphosate na soja transgênica (Figura 5). Sabe-se que uma molécula que bloqueia a síntese de ALA-D teria efeitos de longo alcance em processos bioquímicos e fisiológicos nas plantas (NEMAT ALLA et al., 2001) pois essa enzima é uma das mais importantes envolvidas na biossíntese de clorofila (NEMAT ALLA; HASSAN, 2014), já que catalisa uma reação que faz parte da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofilas e hemes), que desempenham papéis muito importantes na fotossíntese e respiração das plantas (TANAKA; TANAKA, 2007). A sua inibição então afeta a síntese de clorofila através da inibição da via de formação do porfobilinogênio. Uma inibição da síntese de clorofila acaba reduzindo a quantidade de luz absorvida e a energia gerada (ATP e NADPH) e como consequência, a fixação de carbono é reduzida e resulta na diminuição de fotossintatos nas folhas (KILLINY et al., 2018). Neste caso, a alteração no teor de clorofila vai repercutir no processo fotossintético, que é determinante na produtividade agrícola (BASTOS et al., 2012). Essa sensibilidade da clorofila ao glyphosate é abordada em vários estudos, que mostram que há uma diminuição do seu conteúdo nas plantas quando expostas ao herbicida (FEDTKE; DUKE, 2005; GOMES et al., 2016; GOMES et al., 2017), inclusive em cultivares transgênicas (ZOBIOLE et al., 2010), como o que foi observado neste trabalho.

Esse efeito do glyphosate na fotossíntese também foi observado por outros trabalhos que mostram que o glyphosate pode afetar a fotossíntese, tanto pela inibição da sua biossíntese (FEDTKE; DUKE, 2005) como observado aqui ou também provocando a degradação da mesma (GOMES et al., 2016). E essa associação da inibição da enzima ALA-D com a inibição da clorofila também foi observada por Nemat Alla et al. (2001) em estudo com *Triticum Aestivum* L., submetido ao tratamento com butaclor e isoproturon.

Aliás, outra hipótese para o resultado encontrado aqui sobre a inibição da ALA-D seria a de que houve uma possível inibição do ácido delta-aminolevulínico (δ ALA), substrato da ALA-D, causada pelo glyphosate. Além disso, a inibição da formação do ácido delta-aminolevulínico (δ ALA) pelo glyphosate já foi encontrada em alguns estudos (KITCHEN et al., 1981; ZOBIOLE et al., 2010).

Ainda, nesse trabalho, a ALA-D também foi inibida na soja transgênica quando exposta ao 2,4-D (auxina sintética) (Figura 5), mostrando o potencial das auxinas em afetar a formação de clorofila na planta e interferir na fotossíntese. Em estudo realizado por Wu et al. (2010), o

herbicida fluoxipir do mesmo mecanismo de ação do 2,4-D diminuiu a formação de clorofila de plantas de *Oryza sativa* L.

Uma inibição da ALA-D também foi vista após a exposição à mistura dos herbicidas glyphosate e 2,4-D (Figura 5), que foi inclusive um pouco mais acentuada da que ocorreu em comparação à exposição aos dois separados, portanto a sua associação pode provocar uma soma nos seus efeitos e aumentar os danos na planta. A mistura de amonio-glufosinate + 2,4-D também promoveu a inibição da enzima ALA-D que apresenta como efeito secundário, o potencial de afetar a síntese de clorofila, já que a planta apresenta o gene para metabolizá-lo, o que também pode ser observado quando o herbicida foi aplicado de forma isolada, onde promoveu uma inibição na ALA-D, mas que não foi significativa.

Além disso, a inibição dessa enzima após aplicação desses herbicidas pode estar relacionada também com a geração de EROs observada pela ativação das enzimas antioxidantes neste trabalho, pois a baixa atividade da enzima ALA-D pode se relacionar com um aumento no nível de EROs, especialmente H_2O_2 , o que mostra que a inibição da enzima ALA-D induz estresse nas plantas como o observado por Chai et al. (2017) na planta mutante de *Gossypium hirsutum*.

Os resultados demonstram que após as plantas serem submetidas aos herbicidas no geral, houve a prevenção da geração de peroxidação lipídica nas plantas. Essa ação não pode ser atribuída somente às enzimas antioxidantes estudadas, já que o H_2O_2 geralmente não causa danos aos lipídios, portanto também deve ser conferida, às outras enzimas antioxidantes, e ao sistema antioxidante não enzimático (MITTLER, 2002). O que nos mostra que o sistema antioxidante da soja Enlist™ apresenta um bom papel na prevenção de danos às membranas dos lipídios das plantas, provocadas pelos herbicidas.

Os tratamentos com amonio-glufosinate associado aos outros herbicidas, como glyphosate + amonio-glufosinate, amonio-glufosinate + 2,4-D e glyphosate + amonio-glufosinate + 2,4-D, foram os menos tóxicos para a soja, pois as atividades das enzimas que removem H_2O_2 ficaram próximas ao controle, bem como não houve peroxidação lipídica o que poderia evidenciar que mantiveram os níveis de danos aos lipídios próximos ao controle por um possível efeito antagônico nas misturas, que foi positivo neste caso. Além disso, essas misturas não inibiram a atividade da ALA-D, com exceção de amonio-glufosinate + 2,4-D. Isso as torna uma opção favorável para o uso dos agricultores.

Apesar disso, a inibição da enzima ALA-D, ocorreu nos tratamentos com glyphosate e 2,4-D isolados e associados e na mistura de amonio-glufosinate com 2,4-D. Essa inibição poderia provocar algum prejuízo na via de síntese de clorofila devido a importância dessa

enzima nessa via, podendo repercutir em uma menor taxa fotossintética, e menor crescimento da planta. Assim, em conjunto, os resultados sugerem que os herbicidas afetaram a homeostase na planta, promovendo o aumento das enzimas antioxidantes APX e CAT, mas apesar disso a planta através de seus mecanismos de defesa conseguiu prevenir uma situação de peroxidação lipídica, mostrando-se como uma cultivar promissora para inserção nos cultivos agrícolas.

CONCLUSÃO

Em suma, a cultivar de soja com a tecnologia *Enlist* apresentou uma ativação das enzimas antioxidantes importantes no mecanismo na eliminação de EROs, como a CAT e APX de forma a não causar danos severos aos lipídios das plantas, como indicado pelos teores de MDA (TBARS), mas ainda assim, houve a inibição da enzima ALA-D que é importante na via de formação dos compostos como clorofila. Assim, os efeitos dos herbicidas sobre essas enzimas na planta mostram as primeiras evidências de que eles podem afetar à nível celular as plantas resistentes a eles.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINETTO, D. et al. Changes in photosynthesis and oxidative stress in wheat plants submitted to herbicides application. **Planta Daninha**, v. 34, n. 1, p. 1-9, 2016.
- AKCAY, U. C. et al. Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hygaeae* L.) seedling. **Plant Growth Regulation**, v. 61, n. 1, p. 21-28, 2010.
- ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, T. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyl of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, n. 4, p.1247- 1257, 1995.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v.44, n.3, p.453-460, 2014.
- BASTOS, E. A., et al. Parâmetros fisiológicos e produtividade de grãos verdes do feijão-caupi sob déficit hídrico. **Water Resources and Irrigation Management**, v.1, n.1, p.31-37, 2012.
- BESANÇON, T. E.; PENNER, D.; EVERMAN, W. J. Reduced Translocation Is Associated with Antagonism of Glyphosate by Glufosinate in Giant Foxtail (*Setaria faberi*) and Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). **Weed Science**, v. 66, n. 2, p.159–167. 2018.
- BETHKE, R. K. et al. Evaluation of the interaction between glyphosate and glufosinate. **Weed Science**, v. 61, n. 1, p.41–47, 2013.

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, n. 1-2, p. 248- 254, 1976.

BREINIG, S. et al. Control of tetrapyrrole biosynthesis by alternate quaternary forms of porphobilinogen synthase. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 10, n. 9, p. 757–763, 2003.

CHAI, Q. et al. The dosage of the 5-aminolevulinic acid dehydratase gene affects programmed cell death and immunity. **Plant Physiology**, v. 175, n.1, p. 511-528, 2017.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILLIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 37, n. 9, p. 949-962, 1999.

CHUAH, T. S. et al. Antagonism of glufosinate ammonium activity caused by glyphosate in the tank mixtures used for control of goosegrass (*Eleusine indica* Gaertn.). **Plant Protection Quarterly**, v.23, n.3, p.116-119, 2008.

CRAIGMYLE, B. D., ELLIS, J. M., BRADLEY, K. W. Influence of Weed Height and Glufosinate plus 2,4-D Combinations on Weed Control in Soybean with Resistance to 2,4-D. **Weed Technology**, v. 27, n. 2, p. 271–280, 2013.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. Modes of action of microbially-produced phytotoxins. **Toxins**, v. 3, n. 8, p. 1038-1064, 2011.

FEDTKE, K.; DUKE, S. Herbicides. In: HOCK, B.; ELSTNER, E. (Eds.). **Plant toxicology**. New York: Marcel Dekker, 2005. p. 247-330.

GAZZIERO, D. L. P. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. **Planta Daninha**, v. 33, n. 1, p. 83-92, 2015.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010.

GOMES, M. P. et al. Glyphosate-Dependent Inhibition of Photosynthesis in Willow. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 207, 2017.

GOMES, M. P. et al. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid (AMPA), an overview. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n.17, p. 4691–4703, 2014.

GOMES, M. P. et al. Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 65–70, 2016.

GOMES, M. P.; JUNEAU, P. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) induced by glyphosate: Is the mitochondrial electron transport chain a target of this herbicide? **Environmental Pollution**, v. 218, p. 402–409, 2016.

GRESSEL, J. Synergizing herbicides. **Reviews of Weed Science, Champaign**, v. 5, p. 49-82, 1990.

- HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. **Plant Physiology**. v.84, p.450-455. 1987.
- HIPPLER, F. W. R., et al. Towards soil management with Zn and Mn: estimates of fertilization efficacy of Citrus trees. **Annals of Applied Biology**, v. 166, n. 3, p. 484-495, 2015.
- HODGES, D. M., et al. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, n. 4, p.604-611, 1999.
- KILLINY, N., et al. Effects of δ -aminolevulinic acid dehydratase silencing on the primary and secondary metabolisms of citrus. **Plant Direct**. v. 2, n.1, p. 1–19, 2018.
- KITCHEN, L. M. WITT, W. W.; RIECK, C. E. Inhibition of chlorophyll accumulation by glyphosate. **Weed Science**, Champaign, v. 29, n. 4, p. 513-516, 1981.
- KOTCHONI, S. O.; GACHOMO, E. W. The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. **Journal of Bioscience**, v.31, p.389-404, 2006.
- MILLER, G. et al. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell & Environment**, v. 33, n. 4, p. 453-467, 2010.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 1, p. 405-410, 2002.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v.9, p.490-498, 2004.
- MOLDES, C. A. et al. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 4, p. 469–479, 2008.
- MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-481, 2007.
- MONQUERO, P. A. et al. Absorção, translocação e metabolismo do glifosato por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, v. 22, n. 3, p. 445-451, 2004.
- MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C.; MARTINS, A. F. Effects of cadmium, lead, mercury and zinc on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity from radish leaves. **Biologia Plantarum**, 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**. v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- NEMAT ALLA M. M.; HASSAN N. M. Alleviation of isoproturon toxicity to wheat by exogenous application of glutathione. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 112, p. 56-62, 2014.
- NEMAT ALLA, M. M.; ABASS, M. A.; ELHAKEM, A. H. Physiological response of herbicides treated wheat to selected nitrogen sources. **Egyptian Journal of Botany**, v. 44, p. 99-119, 2001.

OLIVEIRA, C. **Mudanças morfofisiológicas e metabólicas em biótipos de azevém, I**(Mestrado em Fitossanidade) – Faculdade Elizeu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

RICE-EVANS, C. A.; DIPLOCK, A. T.; SYMONS, M. C. R. Techniques in free radical research. In: BURDON, R. H., VAN KNIPPENBERG, P. H. (Ed.). **Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology**. London: Elsevier, 1991, v. 22, p. 1-278. 1991.

SASSA, S. Delta-Aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**, v. 28, n. 2-3, p. 133–145, 1982.

SENSEMAN, S. A. **Herbicide Handbook**. 9 ed. Lawrence: Weed Science Society of America, 2007.

SHARMA, P. et al. ; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. 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.

SHEHAB, G. G.; AHMED, O. K.; EL-BELTAGI, H. S. Effects of Various Chemical Agents for Alleviation of Drought stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). Notulae **Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 38, n. 1, p. 139-148, 2010.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1305-1319, 2002.

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. Tetrapyrrole Biosynthesis in Higher Plants.. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 321-346, 2007.

TRIPATHY, B. C.; PATTANAYAK, G. K. Chlorophyll Biosynthesis in Higher Plants. In: EATON-RYE J., TRIPATHY B., SHARKEY T. (Ed.) **Photosynthesis**. Advances in Photosynthesis and Respiration. Dordrecht: Springer, 2011. p. 63-94.

TZIN, V.; GALILI, G. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. **Molecular Plant**, v. 3, n. 6, p. 956–972, 2010.

WEHTJE, G., ALTLAND, J. E., GILLIAM, C. H. Interaction of glyphosate and diquat in ready-to-use weed control products. **Weed Technology**, v. 22, n. 3, p. 472–476, 2008.

WRIGHT, T. R. et al. Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by *aryloxyalkanoate dioxygenase* transgenes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 47, p. 20240–20245, 2010.

WU, G. L. et al. Fluroxypyr triggers oxidative damage by producing superoxide and hydrogen peroxide in rice (*Oryza sativa*). **Ecotoxicology**, v. 19, n. 2, p. 124-132, 2010.

YANG, S. WU, R. S. S. KONG, R. Y. C. Biodegradation and enzymatic response in the marine diatom *Skeletonema costatum* upon exposure to 2,4- dichlorophenol. **Aquatic Toxicology**. v. 59, n. 191-200, 2012.

ZERAIK, A. E. et al. Development of a spot test for peroxidase activity monitoring during a purification procedure. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p.731-734, 2008.

ZOBIOLE, L. H. S. et al. Water use efficiency and photosynthesis of glyphosate-resistant soybean as affected by glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.97, n.3, p.182–193, 2010.

Artigo 2:

**EFEITO DE HERBICIDAS NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E
ALA-D EM HÍBRIDO DE MILHO TRANSGÊNICO**

EFEITO DE HERBICIDAS NA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E ALA-D EM HÍBRIDO DE MILHO TRANSGÊNICO

RESUMO - Foi desenvolvida uma cultivar de milho com resistência ao 2,4-D, glyphosate, amonio-glufosinate e ao haloxyfop-R, e sabe-se que a aplicação de herbicidas geralmente induz ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem causar danos oxidativos às plantas. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar se a aplicação de herbicidas afeta negativamente a atividade de enzimas antioxidantes e da ALA-D em híbrido de milho transgênico resistente aos herbicidas glyphosate, 2,4-D e amonio-glufosinate e haloxyfop-R. O experimento foi realizado em casa de vegetação na Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim em 2018. O delineamento foi de blocos inteiramente casualizados, com quatro repetições (duas plantas por repetição), utilizando-se o híbrido transgênico de milho Enlist™. A aplicação dos herbicidas foi efetuada em pós-emergência de forma isolada ou em misturas em tanque nas doses recomendadas para o controle de plantas daninhas. Aos 7 dias após a aplicação dos herbicidas, a parte aérea das plantas foi coletada, posteriormente macerada em nitrogênio líquido e utilizada na determinação da atividade das enzimas antioxidantes como catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX), bem como os níveis de peroxidação lipídica e a atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (ALA-D) das plantas. Os resultados mostraram que o herbicida glyphosate e as misturas promoveram peroxidação lipídica no milho transgênico. Houve ainda aumento na atividade da CAT após aplicação de haloxyfop-R e haloxyfop-R+amonio-glufosinate, e a APX foi ativada no tratamento com amonio-glufosinate e haloxyfop-R de forma isolada, e nas misturas de glyphosate + 2,4-D, amonio-glufosinate + haloxyfop-R e glyphosate + amonio-glufosinate + haloxyfop-R, já a GPX foi inibida nas misturas de glyphosate + 2,4-D + amonio-glufosinate + haloxyfop-R, glyphosate + 2,4-D + amonio-glufosinate, glyphosate + 2,4-D + haloxyfop-R, 2,4-D + amonio-glufosinate + haloxyfop-R, e 2,4-D + haloxyfop-R e glyphosate + amonio-glufosinate. E todos os tratamentos inibiram a ALA-D. Os herbicidas, especialmente as misturas, portanto provocaram aumento na atividade das enzimas antioxidantes que decompõem o H₂O₂ como CAT e APX, além de uma inibição da atividade das enzimas GPX e ALA-D. Isso pode estar associado a uma alta geração de H₂O₂, que somada provavelmente à produção de outras EROs causaram uma sobrecarga do sistema de defesa antioxidante do milho transgênico gerando danos aos lipídios nas plantas.

Palavras-chave: *Zea mays* L, Enlist™, estresse oxidativo, defesa antioxidante.

ABSTRACT- A corn cultivar with resistance to 2,4-D, glyphosate, ammonium glufosinate and haloxyfop-R has been developed, and it is known that the herbicide application, generally induced by the accumulation of oxygen oxygen (ROS), can oxidative damage to plants. Thus, the present study aims to evaluate whether herbicide application adversely affects the activity of antioxidant enzymes and of ALA-D in transgenic maize hybrid resistant to glyphosate, 2,4-D and ammonium-glufosinate and haloxyfop-R herbicides. The experiment was carried out in a greenhouse at the Federal University of the South Frontier, Erechim Campus in 2018. The experiment was a completely randomized block design with four replicates (two plants per replicate) using the Enlist™ corn transgenic hybrid. The application of the herbicides was carried out in an isolated post-emergence or in tank mixtures at the doses recommended for the control of weeds. After 7 days of herbicide application, the aerial part of the plants was collected, later macerated in liquid nitrogen and used to determine the activity of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GPX). such as lipid peroxidation levels and the activity of the enzyme delta-aminolevulinatase

dehidratase (ALA-D) in plants. The results showed that glyphosate herbicide and mixtures promoted lipid peroxidation in transgenic maize. There was also an increase in CAT activity after application of haloxyfop-R and haloxyfop-R + ammonium-glufosinate, and APX was activated in treatment with ammonium glufosinate and haloxyfop-R alone, and in glyphosate + 2,4 -D, ammonium glufosinate + haloxyfop-R and glyphosate + ammonium glufosinate + haloxyfop-R, whereas GPX was inhibited in the glyphosate + 2,4-D + ammonium-glufosinate + haloxyfop-R mixtures, glyphosate + 2,4 -D + ammonium glufosinate, glyphosate + 2,4-D + haloxyfop-R, 2,4-D + ammonium glufosinate + haloxyfop-R, and 2,4-D + haloxyfop-R and glyphosate + ammonium glufosinate. And all treatments inhibited ALA-D. The herbicides, especially the mixtures, therefore caused an increase in the activity of the antioxidant enzymes that decompose the H₂O₂ as CAT and APX, besides an inhibition of the activity of the enzymes GPX and ALA-D. This may be associated with a high H₂O₂ generation, which added to the production of other EROs caused an overload of the antioxidant defense system of transgenic maize causing damage to plant lipids.

Keywords: *Zea mays* L, Enlist™, oxidative stress, antioxidant defense.

INTRODUÇÃO

Na busca de uma estratégia para contornar problemas com plantas daninhas, a empresa *Corteva Agrosciences*™ desenvolveu um híbrido de milho resistente ao 2,4-D, ao glyphosate, ao amônio-glufosinate e ao haloxyfop-R. A resistência foi atingida por meio da inserção de genes bacterianos no DNA do milho (WRIGHT et al., 2010; USDA-APHIS, 2013).

Para apresentar a resistência ao herbicida 2,4-D, a planta geneticamente modificada, possui o transgene ariloxialcanoato dioxigenase (*aad-1*) da bactéria de solo *Sphingobium herbicidorovans*, que degrada o herbicida em 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), composto que não apresenta atividade herbicida (WRIGHT et al., 2010). Além disso, o *aad-1*, proporciona resistência aos herbicidas da classe dos ariloxifenoxipropionatos (AOPPs), mais especificamente ao haloxyfop-R e quizalofop-p-ethyl. Esses herbicidas agem inibindo a enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase) em gramíneas, que catalisa o primeiro passo da biossíntese de ácidos graxos (WENGER; NIDERMAN, 2007). E o *aad-1* consegue catalisar a degradação desses herbicidas, aos seus equivalentes fenóis inativos (WRIGHT et al., 2010), conferindo assim, resistência à planta a esses herbicidas também. Este evento contém ainda, o gene *cp4 epsps* da *Agrobacterium tumefaciens*, que codifica a enzima CP4 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (CP4 EPSPs), que confere resistência ao herbicida glyphosate (WRIGHT et al., 2010), e além disso, essa tecnologia também apresenta resistência a amônio-glufosinate.

Dentre os herbicidas introduzidos na tecnologia, o ácido 2,4-D foi o primeiro análogo de auxina sintética do ácido indol-3-acético (AIA, auxina natural) usado na agricultura (GROSSMANN, 2010). O seu modo de ação é como uma auxina, mas em altas concentrações,

acaba alterando o crescimento normal, provocando danos letais à planta (GROSSMANN, 2010), por gerar epinastia das folhas e retorcimento do caule e engrossamento das gemas terminais (SILVA et al., 2007). O haloxyfop-R como já mencionado é um herbicida sistêmico do grupo químico dos ariloxifenoxipropiônicos (AOPPs), que inibe a enzima acetilcoenzima-A carboxilase (ACCase), responsável por catalisar reações de síntese de ácidos graxos, interrompendo a formação dos lipídios e membranas celulares (VIDAL; MEROTTO JR, 2001; ROMAN, et al. 2007). Já o glyphosate inibe a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) da via do chiquimato (DUKE; POWLES, 2008), que catalisa a reação de chiquimato-3-fosfato (S3P) e fosfoenolpiruvato para formar 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato (EPSP) (MAEDA; DUDAREVA, 2012). A inibição da EPSPs especificamente resulta em acúmulo de chiquimato (SINGH; SHANER, 1998), o que acaba inibindo a biossíntese de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) sendo letal para plantas sensíveis (SAMMONS; GAINES, 2014). O amonio-glufosinate é um herbicida de contato que se transloca na planta a uma pequena distância (CARVALHO, 2013). Ele inibe a ação da glutamina sintetase que auxilia na produção de glutamina e desintoxicação da amônia em animais e plantas (JEWELL; BUFFIN 2001), e isso provoca muitos efeitos na planta, como o acúmulo de amônia, a inibição na síntese de aminoácidos precursores de proteínas, produção de radicais livres e o bloqueio na fotossíntese, levando a planta à morte (CARVALHO, 2013).

As plantas estão continuamente expostas a vários fatores de estresse, que afetam a sua produção. Esses estresses ambientais geralmente induzem o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem causar danos oxidativos severos às plantas, como a inibição de crescimento, desenvolvimento e a produtividade de grãos (BAILEY-SERRES; MITTLER, 2006). Dentre esses vários fatores estão a salinidade, seca, metais, altas temperaturas, deficiência de nutrientes, poluição e principalmente os herbicidas (GILL; TUTTEJA, 2010), que podem provocar vários efeitos ecotoxicológicos e ambientais, além de desencadear alterações no sistema antioxidante em organismos não-alvo, e em plantas sensíveis (ALVES et al., 2018).

As EROs são produzidas naturalmente através do metabolismo celular em diversas vias metabólicas, localizadas em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Cerca de 1 a 2% de O₂ consumido pelas plantas é desviado para formação de EROs (GILL; TUTTEJA, 2010). No entanto quando em excesso acabam desencadeando danos às proteínas e aos ácidos nucleicos, além da peroxidação de lipídios de membrana, podendo levar as células do organismo à morte (MILLER et al., 2010). Entre as EROs estão o oxigênio singlete (¹O₂), o radical superóxido (⁻O₂), o hidroxil ([•]OH) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (SHARMA et al., 2012). Diante

disso, para eliminar os danos provocados pelas EROs, as plantas desenvolveram mecanismos de proteção, o sistema antioxidante enzimático e o não enzimático (antioxidantes de baixos pesos moleculares) (MITTLER, 2002).

O sistema enzimático é formado por enzimas antioxidantes, dentre elas, tem-se a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), a catalase (CAT, 1.11.1.6), a ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), e a guaiacol peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7) (DEUNER et al., 2008; BARBOSA et al., 2014). A SOD dismuta O_2^- a H_2O_2 (SHARMA et al., 2012) e a APX e a CAT possuem o papel de converter a produção de H_2O_2 em H_2O e O_2 (SHEHAB et al., 2010; HIPPLER et al., 2015; SILVA et al., 2016). E a GPX também atua na remoção de H_2O_2 (MOLLER et al., 2007).

Além do sistema enzimático antioxidante existe uma enzima considerada biomarcadora para a geração de estresse, que é a enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D E.C.4.2.1.24) e não atua no sistema de defesa antioxidante, mas é afetada em situações de estresse oxidativo (FOLMER et al., 2003). Sua importância se dá ainda pela capacidade de fazer parte de vários processos importantes na planta, como a fotossíntese e a respiração (TANAKA; TANAKA, 2007) por catalisar a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido δ -aminolevulinico a porfobilinogênio, (PEREIRA et al., 2006), via que promove a formação de compostos como porfirinas, heme e clorofilas (JAFFE et al., 2000).

Além disso, embora o milho seja comercialmente importante, não há muito conhecimento sobre o efeito de herbicidas à nível celular em cultivares transgênicas. Alguns trabalhos já investigaram os efeitos na fotossíntese e na geração de estresse oxidativo nas plantas expostas aos herbicidas mencionados nesse estudo (MOLDES et al., 2008; AHN, 2008; GOMES; JUNEAU, 2016; GOMES et al., 2016; YEO, et al. 2018). Diante disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar se a aplicação de herbicidas afeta negativamente a atividade de enzimas antioxidantes e da ALA-D em híbrido de milho transgênico resistente aos herbicidas glyphosate, 2,4-D e amonio-glufosinate e haloxyfop-R.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Erechim, RS, Brasil, no período de junho a julho de 2018. Foi utilizado o híbrido de milho PW Enlist™ 13K288 (PWE) transgênico com resistência aos herbicidas glyphosate, amonio-glufosinate, 2,4-D e haloxyfop-R. O cultivo das plantas foi em solo e

substrato na proporção de 1:1 do volume para cada material, em copos plásticos com capacidade para 0,5 L.

O delineamento utilizado foi completamente casualizado, com quatro repetições, com duas plantas por repetição. Os tratamentos foram compostos pelos herbicidas e suas respectivas doses recomendadas para o controle de plantas daninhas, e estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Tratamentos e dosagem dos herbicidas aplicados em milho Enlist™ (13K288 PWE). UFFS, Erechim, RS, 2018.

Tratamentos	Dose (g ha ⁻¹) de (i.a ou e.a)*	Nome Comercial	Dose comercial L ha ⁻¹
Testemunha sem herbicida	---	---	---
Glyphosate	1080	Roundup® Original	3,0
2,4-D	670	DMA® 806 BR	1,0
Amonio-glufosinate	400	Finale®	2,0
Haloxypop-R	60	Verdict®	0,5
Glyphosate + 2,4-D	1080+670	Roundup® Original+ DMA® 806 BR	3,0+1,0
Glyphosate+amonio-glufosinate	1080+400	Roundup® Original+ Finale®	3,0+2,0
Glyphosate + haloxypop-R	1080+60	Roundup® Original+ Verdict®	3,0+0,5
2,4-D + amonio-glufosinate	670+400	DMA® 806 BR +Finale®	1,0+2,0
2,4-D +haloxypop-R	670+60	DMA® 806 BR +Verdict®	1,0+0,5
Amonio-glufosinate+ haloxypop-R	400+60	Finale® +Verdict®	2,0+0,5
Glyphosate+2,4-D+ amonio-glufosinate	1080+670+400	Roundup® Original+ DMA® 806 BR +Finale®	3,0+1,0+2,0
Glyphosate+2,4-D+ haloxypop-R	1080+670+60	Roundup® Original+ DMA® 806 BR + Verdict®	3,0+1,0+0,5
Glyphosate + amonio-glufosinate + haloxypop-R	1080+400+60	Roundup® Original +Finale® +Verdict®	3,0+2,0+0,5
2,4-D + amonio-glufosinate +haloxypop-R	670+400+60	DMA® 806 BR +Finale® + Verdict®	1,0+2,0+0,5
Glyphosate+2,4-D+amonio-glufosinate +haloxypop-R	1080+670+400+60	Roundup® Original + DMA® 806 BR+ Finale® + Verdict®	3,0+1,0+2,0+0,5

* Dose recomendada pelo fabricante para o controle de plantas daninhas.

A aplicação foi realizada aos 22 dias após a emergência do milho (DAE), que estava no estágio V2 (com duas folhas verdadeiras completamente desenvolvidas), através de um

pulverizador costal pressurizado a CO₂, acoplado a esse uma ponta de pulverização do tipo DG 110.02, o qual proporcionou uma vazão 150 ha⁻¹ L.

Aos 7 dias após a aplicação dos herbicidas, todas as plantas foram coletadas e maceradas utilizando para as duas atividades nitrogênio líquido, e posteriormente mantidas em ultrafreezer à -80°C até a realização das análises bioquímicas.

Determinação das enzimas do sistema antioxidante

Preparação do extrato

O extrato enzimático para a determinação das atividades das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX) foi obtido através da homogeneização de 0,3 g de tecido vegetal em polivinilpolipirrolidona (PVPP 10%) e 1,5 mL de tampão de extração contendo tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,8), EDTA 10 mM, ácido ascórbico 200 mM e água Milli-Q. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 12000 g por 20 min à 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para mensurar a atividade enzimática e a quantificação das proteínas que foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina sérica bovina como padrão.

Catalase

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 a 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.

Ascorbato peroxidase

A atividade da ascorbato peroxidase seguiu o método de Nakano e Asada (1981), onde o meio de reação continha tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 10 mM, H₂O₂ 2 mM água Milli-Q, e extrato enzimático. A temperatura foi mantida constante à 27°C por imersão das amostras em banho-maria. A diminuição da absorbância a 290 nm durante 2 minutos foi registrada com intervalos de 10 em 10 segundos. A atividade enzimática foi expressa em Umol min/mg/proteína.

Guaiacol Peroxidase

A atividade da enzima guaiacol peroxidase foi determinada segundo Zeraik et al. (2008), usando guaiacol como substrato. A mistura de reação conteve 99 μL de tampão de fosfato de potássio (100 mM, pH 6,5), 99 μL de guaiacol (15 mM) e 99 μL de H_2O_2 (3 mM). Após a homogeneização, 5 μL do extrato de plantas foi adicionado a esta solução. A atividade da enzima foi medida através de espectrofotometria por oxidação de guaiacol em tetraguaiacol aumentando a absorbância a 470 nm. Os resultados estão expressos em U/mg de proteína.

δ -aminolevulinato desidratase (δ ALA-D)

O tecido vegetal foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, numa proporção de 1: 1 (p / v). O homogeneizado foi centrifugado a 6000 rpm a 4°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) aferindo-se a taxa de formação de porfobilinogênio (PBG). O meio de incubação dos ensaios continha tampão Tris-HCl 100 mM, PH 9,0 e o substrato ALA 3,6 mM. A incubação foi iniciada pela adição de 50 μL da preparação de tecido a um volume final de 300 μL e interrompida pela adição de 175 μL da mistura contendo 10% de ácido tricloroacético (TCA) e 10 mM de HgCl_2 . O produto da reação foi determinado com o reagente de Erlich a 555 nm, usando um coeficiente de absorção molar de $6,1 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (SASSA, 1982) para o sal de Erlich-porfobilinogênio. Os resultados foram expressos em nmol de PBG/h/mL.

Peroxidação Lipídica (TBARS)

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 a temperatura ambiente. Uma parte do sobrenadante (0,5 mL) foi misturado com 0,5 mL de solução de TBA+ (ácido tricloroacético 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 tricloroacético a 100%, hidroxitolueno butilado 0,1% e água MiliQ) 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: 440nm, 532nm e 600nm. Os equivalentes de MDA (TBARS) foram calculados com a seguinte fórmula:

$$[(\text{Abs } 532 + \text{TBA}) - (\text{Abs } 600 + \text{TBA}) - (\text{Abs } 532 - \text{TBA} - \text{Abs } 600 - \text{TBA})] = A$$

$$[(\text{Abs } 440 + \text{TBA} - \text{Abs } 600 + \text{TBA}) \times 0,0571] = B$$

$$\text{TBARS (nmol/ml)} = (A - B/157.000) \times 106$$

A razão entre o conteúdo de TBARS e o peso seco da amostra foi calculada. Os dados foram expressos em nmol/mL.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software GraphPad Prism 7.0, em ocorrendo significância foram comparados utilizando-se o teste Dunnet. Todos os testes foram efetuados a $p < 0,05$.

RESULTADOS

Peroxidação Lipídica

A peroxidação dos lipídeos produz malondialdeído (MDA), além de outros produtos, e é por meio desse composto que é possível determinar a peroxidação dos lipídeos das membranas das células da planta. No presente trabalho foi observado um aumento nos níveis de peroxidação lipídica no milho Enlist™, aos 7 dias após a aplicação dos tratamentos. O uso de glyphosate isolado ocasionou cerca de 41,37% de peroxidação lipídica e nas misturas: glyphosate + 2,4-D (50,61%), 2,4-D + amonio-glufosinate (45,83%), 2,4-D + haloxyfop-R (36,46%), amonio-glufosinate + haloxyfop-R (39,44%), glyphosate + 2,4-D + amonio-glufosinate (51,61%), glyphosate + 2,4-D + haloxyfop-R (46,68%), glyphosate + amonio-glufosinate + haloxyfop-R (48,60%) também houve um acréscimo na peroxidação dos lipídios em comparação com a testemunha, mostrando que houve estresse oxidativo (Figura 1).

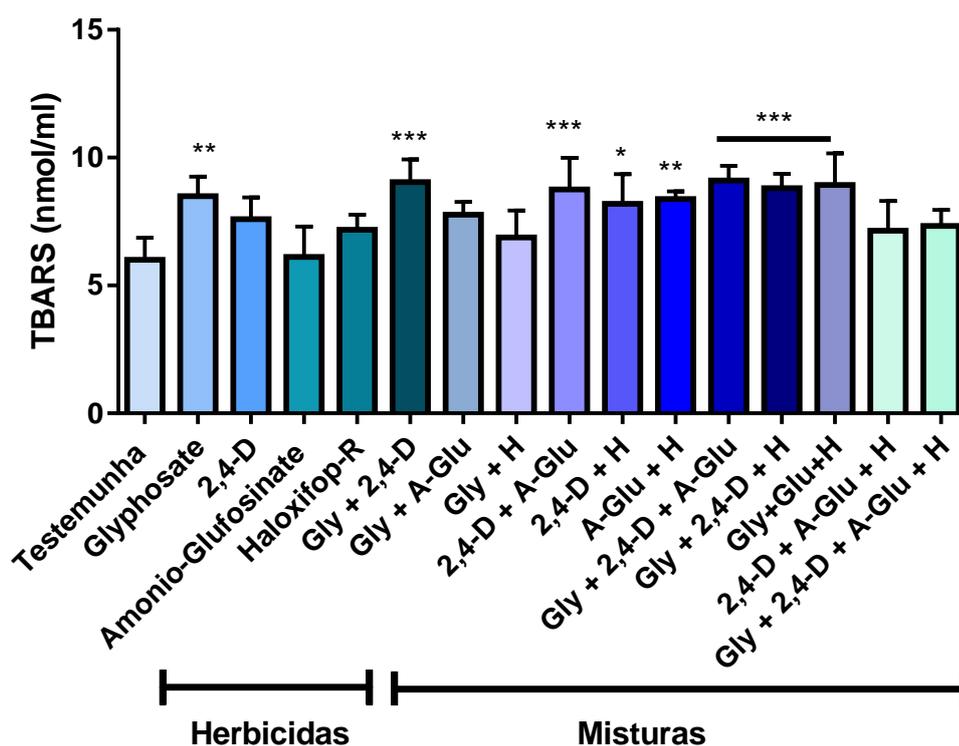


Figura 1- Efeito de herbicidas após 7 dias de aplicação no milho Enlist sobre a peroxidação lipídica. * Gly: glyphosate; A-Glu: amonio-glufosinate; H: haloxyfop-R. Os dados estão expressos em nmol/ml. Os asteriscos indicam a significância estatística quando os tratamentos diferem pelo teste de Dunnet em comparação com a testemunha sem herbicida: $p < 0,05$ (*); $p < 0,005$ (**); $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****). As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

Catalase

A atividade da enzima catalase (Figura 2) foi aumentada em relação à testemunha quando a planta foi exposta de forma isolada ao haloxyfop-R e à mistura amonio-glufosinate + haloxyfop-R em 157,80% e 173,39%, respectivamente. Os demais tratamentos não apresentaram nenhum aumento significativo comparados ao controle.

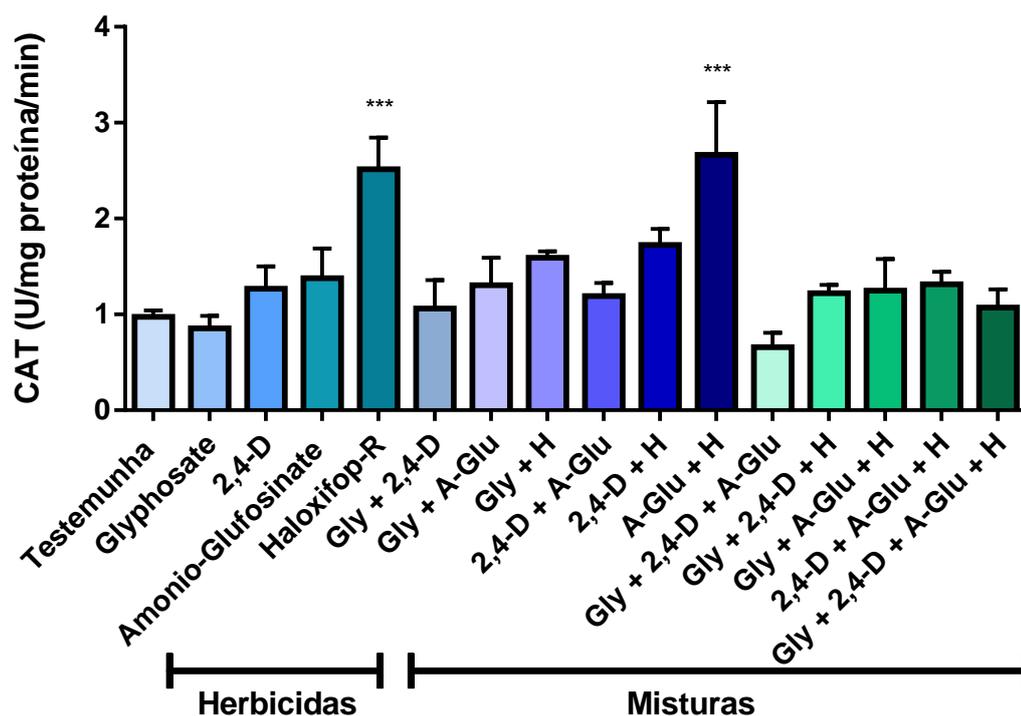


Figura 2- Efeito de herbicidas após 7 dias de aplicação no milho Enlist sobre a catalase. Gly: glyphosate; A- Glu: amonio-glufosinate; H: haloxyfop-R. Os dados estão expressos em Unidades/mg de proteína/min. Os asteriscos indicam a significância estatística quando os tratamentos diferem pelo teste de Dunnet em comparação com a testemunha sem herbicida: $p < 0,05$ (*); $p < 0,005$ (**); $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****). As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

Ascorbato peroxidase

Em relação à atividade da enzima APX (Figura 3) na cultivar de milho, avaliando a exposição aos herbicidas de forma isolada os herbicidas amonio-glufosinate e haloxyfop-R ativaram a enzima em 183,92% e 127,33%.

Entre as associações dos herbicidas, as misturas de glyphosate + 2,4-D (173,52%), glyphosate + haloxyfop-R (111,18%), 2,4-D + amonio-glufosinate (317,62%), amonio-glufosinate + haloxyfop-R (189,98%), e glyphosate + amonio-glufosinate + haloxyfop-R (145,18%) (Figura 3) foram as que mostraram um aumento na atividade da enzima ao se comparar com o controle, sugerindo que houve geração de ERO após a exposição.

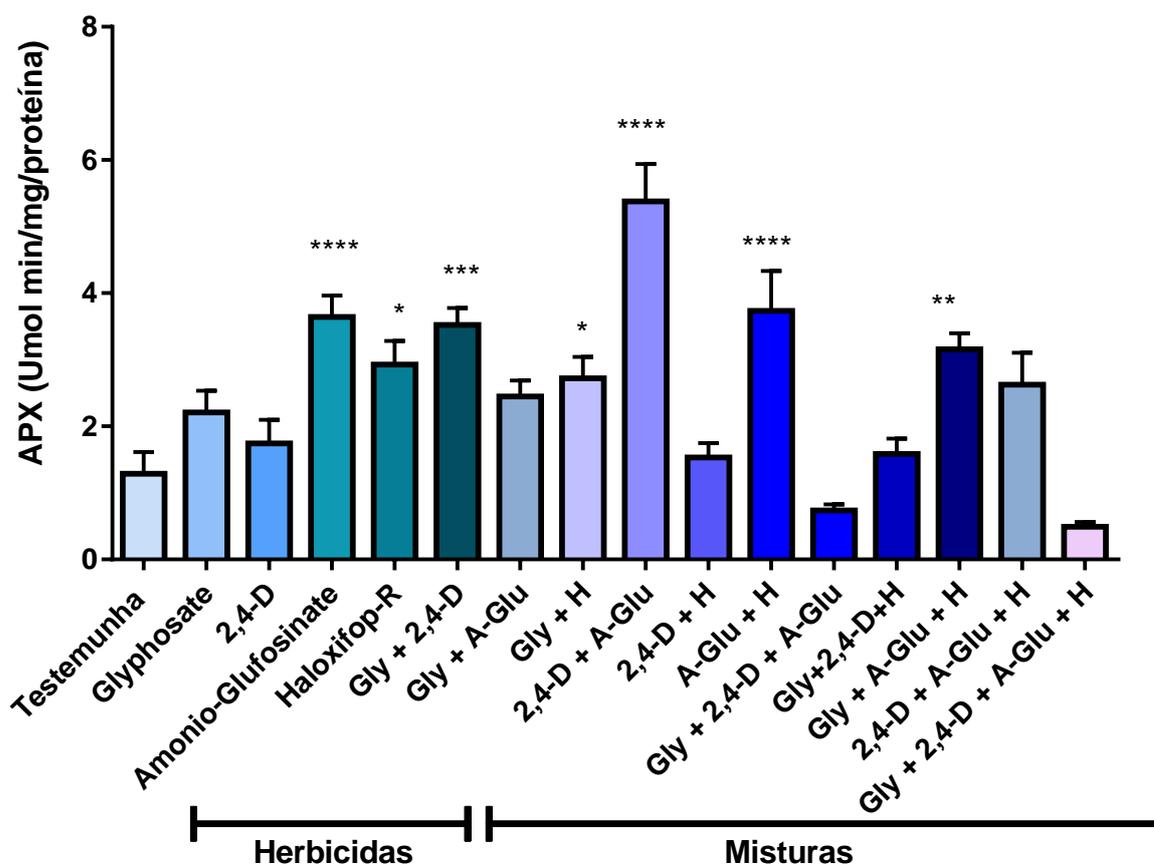


Figura 3- Efeito de herbicidas após 7 dias de aplicação na soja Enlist sobre a ascorbato peroxidase. Gly: glyphosate; A-Glu: amonio-glufosinate; H: haloxyfop-R. Os dados estão expressos em Umol min /mg /proteína. Os asteriscos indicam a significância estatística quando os tratamentos diferem pelo teste de Dunnet em comparação com a testemunha sem herbicida: $p < 0,05$ (*); $p < 0,005$ (**); $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****). As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

Guaiacol peroxidase

Uma outra enzima que foi afetada pelos tratamentos foi a guaiacol peroxidase. A GPX sofreu uma inibição de sua atividade somente em algumas misturas, não sendo prejudicada nos tratamentos de herbicidas de forma isolada. As misturas que estão entre as que provocaram esse efeito envolvem glyphosate + amonio-glufosinate e 2,4-D + haloxyfop-R que reduziram cerca de 48,57% e 50,86% da sua atividade em relação ao controle, respectivamente.

As menores atividades de GPX ocorreram ao se misturar o glyphosate + 2,4-D + amonio-glufosinate (75,38%), glyphosate + 2,4-D + haloxyfop-R, (92,51%), glyphosate + amonio-glufosinate + haloxyfop-R (75,59%), 2,4-D + amonio-glufosinate + haloxyfop-R (87,93%) e glyphosate + 2,4-D + amonio-glufosinate + haloxyfop-R (91,92%) comparadas à

testemunha (Figura 4), ou seja, as misturas que abrangeram associações de uma quantidade maior de mecanismos de ação foram mais prejudiciais do que as demais.

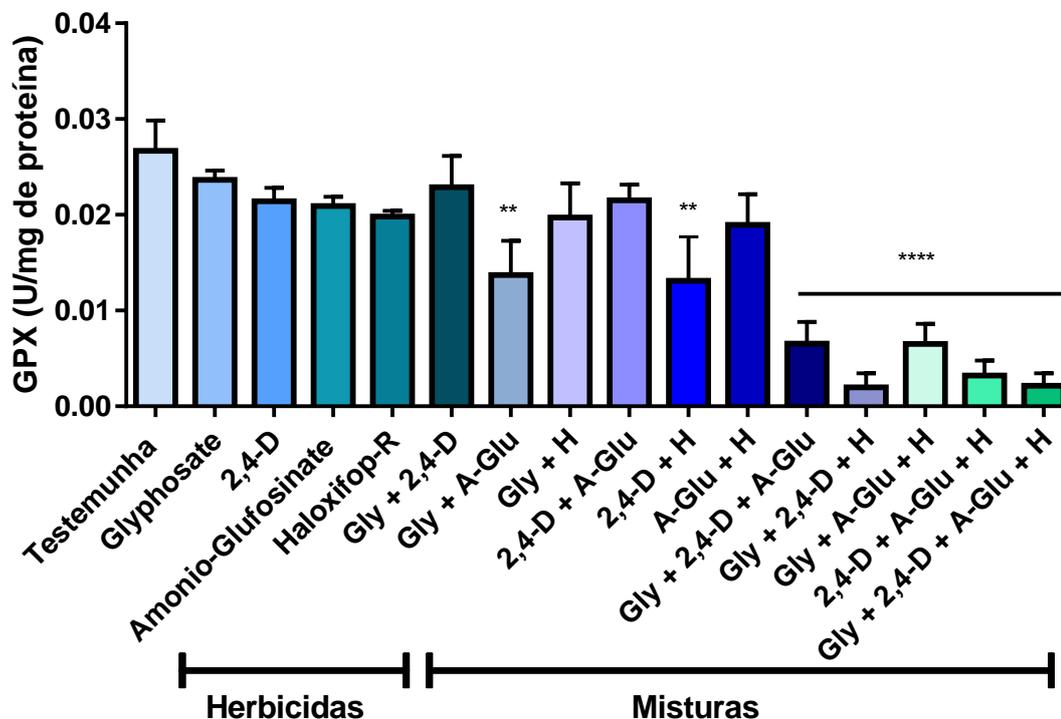


Figura 4 - Efeito de herbicidas após 7 dias de aplicação no milho Enlist sobre a guaiacol peroxidase. Gly: glyphosate; A-Glu: amonio-glufosinate; H: haloxyfop-R. Os dados estão expressos em U/mg de proteína. Os asteriscos indicam a significância estatística quando os tratamentos diferem pelo teste de Dunnet em comparação com a testemunha sem herbicida: $p < 0,05$ (*); $p < 0,005$ (**); $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****). As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

ALA-D

A atividade da ALA-D foi reduzida ao se usar os tratamentos herbicidas sobre o milho Enlist™ em comparação à testemunha sem herbicida. Em relação aos herbicidas aplicados separadamente, os tratamentos com glyphosate, 2,4-D, amonio-glufosinate e haloxyfop-R, inibiram a enzima em cerca de 52,7%, 59,82%, 67,63% e 66,52% de modo respectivo.

Uma inibição similar ocorreu nas misturas entre os herbicidas: glyphosate + 2,4-D (67,91%), glyphosate + amonio-glufosinate (60,66%), glyphosate + haloxyfop-R (64,84%), 2,4-D + haloxyfop-R (50,06%), amonio-glufosinate + haloxyfop-R (66,33%), glyphosate + 2,4-D + amonio-glufosinate (64,56%).

As outras misturas avaliadas também provocaram inibição, mas os valores foram menores: glyphosate + 2,4-D + haloxyfop-R (41,27%), glyphosate + amonio-glufosinate +

haloxyfop-R (39,62%), 2,4-D + amonio-glufosinate + haloxyfop-R (41,55%), glyphosate + 2,4-D + amonio-glufosinate + haloxyfop-R (41,40%), como podemos observar na Figura 5.

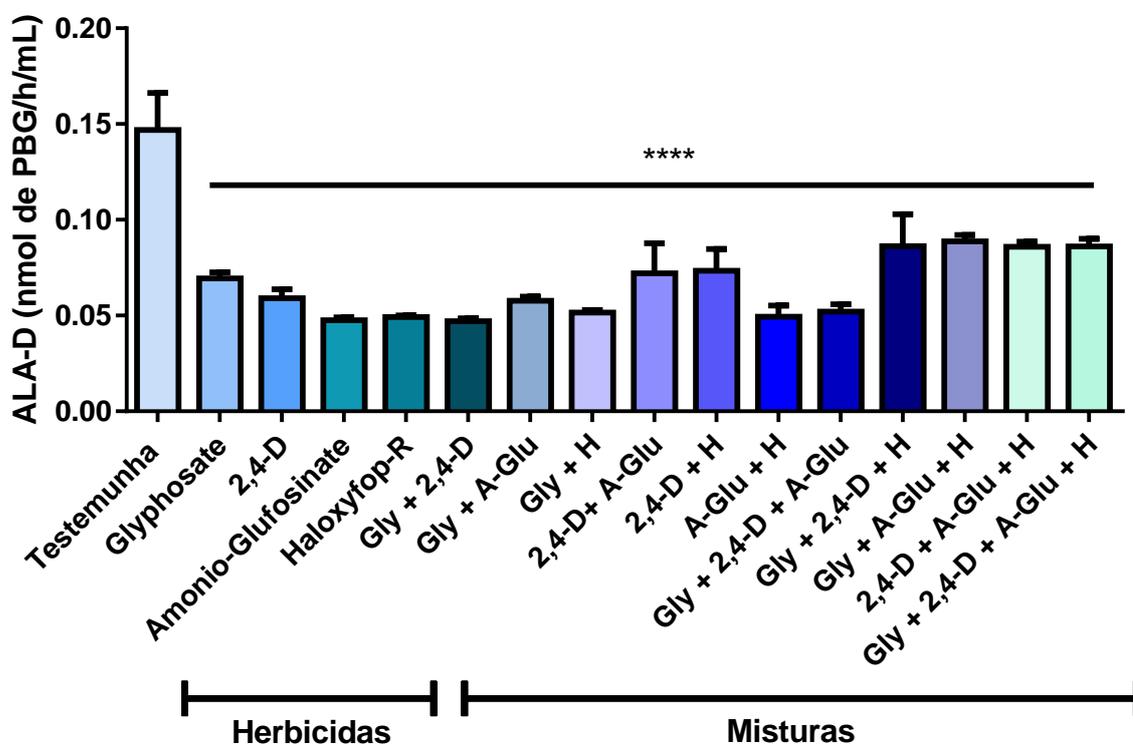


Figura 5- Efeito de herbicidas após 7 dias de aplicação no milho Enlist sobre a δ ácido aminolevulinato desidratase. Gly: glyphosate; A-Glu: amonio-glufosinate; H: haloxyfop-R. Os dados estão expressos em nmol de PBG/h/mL. Os asteriscos indicam a significância estatística quando os tratamentos diferem pelo teste de Dunnet em comparação com a testemunha sem herbicida: $p < 0,05$ (*); $p < 0,005$ (**); $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****). As barras representam o erro-padrão das médias de quatro repetições.

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou os efeitos da exposição do milho EnlistTM ao glyphosate, 2,4-D, amonio-glufosinate e haloxyfop-R na promoção de estresse oxidativo e na ativação de enzimas antioxidantes. Os resultados variaram de acordo com o herbicida aplicado em isolado e as suas respectivas misturas.

Em condições normais, a produção de EROs é limitada e removida de maneira eficiente pelo sistema de defesa antioxidante da planta, evitando assim que ocorram danos oxidativos aos compostos celulares (GILL; TUTEJA, 2010). No entanto, sabe-se que quando a produção de EROs aumenta na planta durante alguma situação de estresse como a exposição a herbicidas, além dela agir como sinalizadora na ativação das vias de resposta ao estresse e dos mecanismos

de defesa, pode representar uma ameaça às células (MITTLER, 2002), podendo desencadear diversas consequências, como danos às membranas da planta.

As membranas celulares acabam, portanto sendo um dos principais alvos do estresse oxidativo nas plantas, sendo a avaliação dos níveis de peroxidação lipídica um indicador importante sobre a resistência ou a geração de estresse (EKMEKCI; TERZIOGLU, 2005). No presente estudo, entre os herbicidas que foram aplicados de forma isolada, o glyphosate foi o único que promoveu aumento significativo na peroxidação lipídica (Figura 1). Já os herbicidas 2,4-D, amonio-glufosinate e haloxyfop-R não induziram aumento nos níveis de peroxidação quando aplicados individualmente (Figura 1). É possível que o estresse oxidativo causado pelo aumento dos níveis de EROs após as aplicações destes três herbicidas não tenha sido suficiente para causar degradação das membranas celulares, ou isso ocorreu devido à eficiência do sistema antioxidante das plantas, prevenindo assim, os danos às células.

Os tratamentos com misturas em que houveram danos às membranas foram as associações de 2,4-D + glyphosate, 2,4-D + amonio-glufosinate, 2,4-D + haloxyfop-R, amonio-glufosinate + haloxyfop-R, e ainda, as misturas de glyphosate + 2,4-D + amonio-glufosinate, glyphosate + 2,4-D + haloxyfop-R e glyphosate + amonio-glufosinate + haloxyfop-R que estão entre as que provocaram maiores valores de peroxidação (Figura 1).

No geral, os resultados demonstraram que a exposição às combinações desses herbicidas afetaram diretamente o sistema de defesa antioxidante, levando à peroxidação lipídica. O aumento das EROs geradas com as associações dos mecanismos pode provocar uma sobrecarga na defesa antioxidante, excedendo a sua capacidade de defesa que não foi suficiente no combate das EROs (GILL; TUTEJA, 2010).

O aumento na peroxidação lipídica em plantas após tratamentos com esses herbicidas é encontrado em alguns estudos, nos quais, os produtos foram aplicados de forma isolada. Na pesquisa de Gomes et al. (2016) os autores observaram aumento na peroxidação lipídica e maiores acumulações de H_2O_2 após as plantas serem tratadas com glyphosate. O mesmo fato foi observado após a aplicação de 2,4-D em trigo (AGOSTINETTO et al., 2016). Em pesquisa analisando algas, o amonio-glufosinate também induziu um aumento significativo na peroxidação lipídica (YEO et al., 2018), o que também foi observado após tratamento de *Acanthospermum hispidum* com o herbicida fluazifop-P-buthyl, do mesmo grupo do haloxyfop-R (LUO et al., 2004). Mas, não há ou são escassos os trabalhos que avaliaram os efeitos da associação desses herbicidas na geração de estresse oxidativo, especialmente em plantas transgênicas, por isso o estudo dos efeitos deletérios dos herbicidas sobre a defesa antioxidante da planta de milho é de extrema relevância. Para mitigar esses efeitos do estresse oxidativo as

plantas desenvolveram mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos que desempenham um importante papel no controle do acúmulo de EROs (MITTLER, 2002). O sistema enzimático é formado por enzimas antioxidantes, como catalase, ascorbato peroxidase e guaiacol peroxidase, especializadas na remoção de H_2O_2 (BARBOSA et al., 2014) que, também foram investigadas neste trabalho.

Além dessas, a enzima superóxido dismutase (SOD), que não foi estudada aqui, é a primeira no processo de desintoxicação (GILL; TUTEJA, 2010) e atua na conversão do radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (SHEHAB et al., 2010). Mas o objetivo desse estudo em relação às enzimas do sistema antioxidante foi o de investigar somente as PODs (peroxidases) e a catalase.

A enzima CAT entra em ação para dismutar o H_2O_2 gerado pela SOD, em H_2O e O_2 a fim de diminuir os seus efeitos citotóxicos na planta (SHEHAB et al., 2010) agindo sem a necessidade de um doador de elétrons (APEL; HIRT, 2004), tornando-se uma das enzimas antioxidantes mais eficazes (AKCAY et al., 2010).

O presente estudo demonstrou que a atividade da catalase aumentou em comparação ao controle quando o milho foi exposto ao herbicida haloxyfop-R e também a mistura com amonio-glufosinate (amônio-glufosinate + haloxyfop-R) (Figura 2). Os herbicidas do grupo químico dos ariloxifenoxipropionatos como o haloxyfop-R, apresentam além de seu mecanismo de ação, o poder de gerar EROs, podendo levar as plantas suscetíveis ao estresse oxidativo (LUO et al., 2004). O resultado encontrado nesse trabalho demonstra que o haloxyfop-R, pôde afetar a cultivar de milho estudada, gerando acúmulo de espécies reativas, mesmo sendo ela resistente. O mesmo aconteceu com a mistura de haloxyfop-R com o amonio-glufosinate, o que mostra que a associação desses dois herbicidas com mecanismos de ação diferenciados intensificou a geração de EROs, atingindo níveis críticos, já que a CAT tem uma maior capacidade de remoção de H_2O_2 em comparação com as PODs como a APX (GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012). Embora a planta transgênica contenha os genes que desintoxicam esses herbicidas, o resultado acima implica que eles induzem fitotoxicidade no milho Enlist™ e demonstra que a CAT foi induzida pelo estresse e participou do mecanismo antioxidante e da proteção celular da planta.

A indução de fitotoxicidade em cultivares transgênicas por herbicidas também foi observada por Ahn (2008) em seu estudo com uma cultivar de arroz (*Oriza sativa*) resistente ao amonio-glufosinate, onde o herbicida desencadeou um acúmulo de H_2O_2 , mostrando que mesmo a planta sendo resistente houve uma situação de toxicidade provocada pelo herbicida. Neste estudo ainda, quando aplicados de forma isolada e conjunta, o amonio-glufosinate e o

haloxyfop-R também provocaram aumento na atividade da APX (Figura 3), outra enzima que é responsável pela conversão do H_2O_2 em água e O_2 , mas que utiliza o ascorbato como doador de elétrons. O aumento da atividade dessa enzima, em plantas tem sido visto em diversas situações de estresse (GILL; TUTEJA, 2010), e mesmo tendo a mesma função que a CAT, e agindo de forma conjunta no combate do alto acúmulo de H_2O_2 , as duas enzimas apresentam diferentes afinidades sobre o H_2O_2 : a APX faz a regulação fina, e a CAT remove o excesso dessa ERO (MITTLER, 2002; GILL; TUTEJA, 2010). Além disso, o haloxyfop-R e a sua mistura com amônio-glufosinate aumentaram a atividade das duas enzimas, o que mostra que a APX não conseguiu remover totalmente a quantidade de H_2O_2 gerada, e a CAT precisou entrar em ação.

No que tange as misturas de haloxyfop-R + amônio-glufosinate + glyphosate e haloxyfop-R + glyphosate e 2,4-D + glyphosate ocorreu um aumento da APX (Figura 3). O incremento dessa atividade parece estar relacionado ao aumento da tolerância ao estresse oxidativo, mas mostra que a associação do glyphosate a esses herbicidas que já tem potencial na geração de espécies reativas, como foi observado neste trabalho e ajudou no acúmulo de EROs. Desse modo pode-se constatar que essas associações afetam outras vias, além das alteradas pelos seus mecanismos de ação, provocando estresses.

Além disso, já foi relatado em vários estudos o potencial do glyphosate em induzir a acumulação de EROs (MOLDES et al., 2008; GOMES et al., 2016), embora esse herbicida não tenha como sua principal ação o estresse oxidativo. Entre os seus efeitos, incluem-se interferência na atividade mitocondrial prejudicando o fluxo normal de elétrons na cadeia transportadora de elétrons (GOMES; JUNEAU, 2016) e com isso há geração de toxicidade mesmo em culturas que apresentem resistência. Além disso, o AMPA (ácido aminometilfosfônico), o principal metabólito da degradação do glyphosate, bem como os ingredientes inertes do produto comercial, possuem risco de serem ainda mais tóxicos do que ele sozinho (GIESY et al., 2000; TSUI; CHU, 2003; GOMES et al., 2016), o que acaba sendo outro fator que proporcione seus efeitos na geração de EROs. Mas é importante mencionar que como a planta transgênica não metaboliza o glyphosate, somente tem uma menor afinidade por essa molécula, a formação de AMPA não pode ser atribuída diretamente à geração de EROs. Já que em condições de campo a formação deste composto nem sempre acontece. Em algumas espécies de plantas o glyphosate é metabolizado, enquanto em outras ele é detectado como molécula intacta. Essas diferenças podem ocorrer por diversas razões, pois ela depende de vários fatores como da taxa de absorção, genótipos e das condições ambientais (MONQUEIRO et al., 2004).

Percebe-se que a mistura de glyphosate com 2,4-D também promoveu aumento a APX, comprovando que o herbicida 2,4-D também tem o poder de promover um acúmulo de H_2O_2 (Figura 3), mostrando que os dois herbicidas juntos intensificaram a geração de espécies reativas.

Existem trabalhos que mostram que as EROs podem participar de mudanças na parede celular, permitindo o alongamento celular, que é necessário para a epinastia causada por 2,4-D, demonstrando que as espécies reativas de oxigênio desempenham um papel central na toxicidade do 2,4-D em plantas suscetíveis (PAZMIÑO, 2011; ROMERO-PUERTAS, 2004). No presente estudo pode-se observar que mesmo não exercendo seu papel herbicida o 2,4-D associado a outros produtos pode causar um aumento de EROs nas plantas. Uma hipótese seria a atuação de seus respectivos metabólitos na planta como o 2,4-DCP.

Dentre as enzimas antioxidantes já vistas no estudo, a enzima GPX é uma enzima contendo o grupo heme que também age na desintoxicação do excesso de H_2O_2 (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014). Essa enzima desempenha um papel importante na biossíntese de lignina e prefere compostos aromáticos como guaiacol e piragalol (ASADA, 1999) como doadores de elétrons (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014). Em relação a sua atividade nesse trabalho, verificou-se de maneira geral uma diminuição ao se comparar ao controle quando aplicadas algumas misturas. Dentre as que provocaram as maiores inibições, estão as que envolveram as misturas de glyphosate + 2,4-D + amonio-glufosinate + haloxyfop-R e glyphosate + 2,4-D + amonio-glufosinate; glyphosate + 2,4-D + haloxyfop-R e 2,4-D + amonio-glufosinate + haloxyfop-R). Além dessas mencionadas o 2,4-D + haloxyfop-R e glyphosate + amonio-glufosinate, também ocasionaram uma inibição da enzima, mas que foi de forma menos significativa em comparação ao controle (Figura 4). Esse resultado mostra que quando a atividade dessas enzimas diminui, como na exposição às misturas, pode estar havendo certo acúmulo de EROs. Isso sugere que a atividade da GPX não foi suficiente para remoção de H_2O_2 .

Como já mencionado, a GPX, além de agir no balanço entre acúmulo e desintoxicação de EROs, está relacionada à formação de lignina e suberina, participando da formação de parede celular (FIELDES; GERHARDT, 1998). A inibição dessa enzima nesses tratamentos pode prejudicar a síntese de parede celular na planta, podendo causar uma redução da mesma após a aplicação desses tratamentos.

Posteriormente às análises das enzimas responsáveis pela defesa antioxidante, outro biomarcador que é diretamente afetado nas situações de estresse oxidativo, que é a enzima δ aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) (FOLMER et al., 2003) foi avaliada. De fato, esta enzima é sensível ao aumento da produção de EROs, pois possui em sua estrutura grupos

sulfidrílicos que podem ser facilmente oxidados (FARINA et al., 2001). Além disso, o estresse oxidativo pode modular negativamente a atividade da enzima δ -ALA-D (SALGUEIRO et al., 2016), sendo essa uma hipótese para os resultados do presente estudo que demonstraram que todos os tratamentos com os herbicidas sejam isolados ou em misturas, provocaram uma inibição da enzima em relação ao controle (Figura 5).

Além disso, a inibição da ALA-D pode exacerbar ainda mais a produção de EROs por aumentar os níveis de seu substrato, δ -ALA, e que possui efeitos pró-oxidante, contribuindo para uma diminuição das defesas antioxidantes da planta, já que 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 (JAFFE et al., 1995; NEAL et al., 1997). Talvez a diminuição da atividade da enzima GPX possa estar relacionada com esta causa, já que é formada pelo grupo heme.

Com a inibição da ALA-D pode ser sugerido que ocorra algum efeito na síntese dos compostos tetrapirrólicos como bilinas, clorofilas e heme (TANAKA; TANAKA, 2007), por isso ela é uma enzima chave na síntese de clorofila (TANAKA; TANAKA, 2007). O presente estudo sugere que a inibição da ALA-D poderia promover uma diminuição na síntese de clorofila da planta.

Além disso, a diminuição na clorofila como efeito dos herbicidas estudados nesse trabalho é abordada em alguns estudos que mostram que os efeitos do glyphosate se dão na fotossíntese, como a inibição da biossíntese de carotenoides e clorofilas (FEDTKE; DUKE, 2005). Que a aplicação de 2,4-D reduziu o teor de clorofila no trigo (AGOSTINETTO et al, 2016), o amonio-glufosinate desencadeou ligeira clorose e redução do teor de clorofila em arroz transgênico (AHN, 2008) e que o herbicida haloxyfop-R quando aplicado em ervilha, também levou a uma redução da clorofila (TORBATI et al., 2018). Percebe-se desse modo que há um efeito indireto causado por eles nas plantas. E além disso, como o presente estudo foi realizado com uma planta com capacidade de metabolização desses herbicidas ou com diminuição pela sua afinidade como no caso do glyphosate, os efeitos apresentados não podem ser secundários à inibição das suas vias de ação.

Contudo, as análises realizadas no estudo mostraram que apesar da mediação na remoção de H_2O_2 pelas enzimas CAT e APX após a aplicação dos tratamentos, houve a diminuição da atividade da GPX, o que mostra que ela acabou não sendo suficiente para remoção de H_2O_2 . No geral as enzimas não conseguiram reverter a situação de estresse nos tratamentos de glyphosate e nas misturas, que, por sua vez, provocaram um aumento na peroxidação lipídica mediada por EROs geradas sob a toxicidade dos herbicidas. Além disso,

a inibição da enzima ALA-D mostra que os herbicidas afetaram negativamente a sua atividade. O que também aconteceu com a GPX que também foi inibida, e que por estar envolvida na formação de lignina, sua inibição pode ocasionar diminuição na formação de paredes celulares na planta. Esses resultados reforçam que a planta de milho mesmo apresentando resistência aos tratamentos com herbicidas, sofreu toxicidade após a aplicação deles.

CONCLUSÃO

Os herbicidas, especialmente as misturas, provocaram a ativação das enzimas CAT e APX responsáveis pela decomposição de H₂O₂ no híbrido de milho. Mesmo assim, como evidenciado pelo aumento nos níveis de peroxidação lipídica, houveram danos aos lipídios da planta. Isso deve ter sido causado possivelmente não somente por ação de H₂O₂, mas também por outras EROs, fazendo com que ocorresse uma sobrecarga no sistema de defesa antioxidante do milho.

Ainda, a ALA-D foi inibida em todos os tratamentos com aplicação de herbicidas, indicando uma possível toxicidade destes, o que poderia estar ligado também à redução da atividade da GPX.

REFERÊNCIAS

AGOSTINETTO, D. et al. Changes in photosynthesis and oxidative stress in wheat plants submitted to herbicides application. **Planta Daninha**, v. 34, n. 1, p. 1-9, 2016.

AHN I. P. Glufosinate ammonium-induced pathogen inhibition and defense responses culminate in disease protection in bar-transgenic rice. **Plant Physiology**, v. 146, n. 1, p. 213–227, 2008.

AKCAY, U. C. et al. Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedling. **Plant Growth Regulation**, v. 61, n. 1, p. 21-28, 2010.

ALVES, C. et al. Effect of herbicides in the oxidative stress in crop winter species. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 90, n. 2, p. 1533-1542, 2018.

ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, T. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyl of maize seedlings. **Plant Physiology**, v. 109, n. 4, p.1247- 1257, 1995.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004.

- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, n. 1, p. 601–639, 1999.
- BAILEY-SERRES, J.; MITTLER, R. The roles of reactive oxygen species in plants cells. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 311, 2006.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p.453-460, 2014.
- 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, n. 1-2, p. 248- 254, 1976.
- CARVALHO, L. B. Dinâmica Fisiológica. Capítulo 4. In: CARVALHO, L. B. (org.). **Herbicidas**. Lages, SC, p. 21-52, 2013.
- DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 53, n. 2, 2014.
- DEUNER, S. et al. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Revista Ceres**, v. 55, p. 135-140, 2008.
- DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 319-325, 2008.
- EKMEKCI, Y.; TERZIOGLU, S. Efeitos do estresse oxidativo induzido por paraquat sobre trigos silvestres e cultivados. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 83, n. 2-3, p. 69-81, 2005.
- FARINA, M. et al. Selenoxides inhibit d-aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicology Letters**, v. 119, n. 1, p.27-37, 2001.
- FIELDES, M. A.; GERHARDT, K. E. Flax guaiacol peroxidases can be used to illustrate the possibility of misinterpreting the effects of stress on the activity of developmentally regulated enzymes. **Plant Science**, v. 132, n. 1, p. 89-99, 1998.
- FOLMER, V. et al. A high fat diet inhibits delta-aminolevulinic acid dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). **The Journal of Nutrition**. v. 133, n. 7, p. 2165-2170, 2003.
- GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 167, p. 35–120, 2000.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010.

- GOMES, M. P. et al. Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 65–70, 2016.
- GOMES, M. P.; JUNEAU, P. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) induced by glyphosate: Is the mitochondrial electron transport chain a target of this herbicide? **Environmental Pollution**, v. 218, p. 402–409, 2016.
- GROSSMANN K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, v. 66, p. 113-120, 2010.
- HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p.450-455. 1987.
- HIPPLER, F. W. R., et al. Towards soil management with Zn and Mn: estimates of fertilization efficacy of Citrus trees. **Annals of Applied Biology**, v. 166, n. 3, p. 484-495, 2015.
- HODGES, D. M., et al. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, n. 4, n. 1, p.604-611, 1999.
- JAFFE, E. K. et al. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase. **Biochemistry**, n. 34, n.1, p. 244-251, 1995.
- JAFFE E. K. et al. Porphobilinogen synthase from pea: expression from an artificial gene, kinetic characterization, and novel implications for subunit interactions. **Biochemistry**, v. 39, n. 30, p. 9018-9029, 2000.
- JEWELL, T.; BUFFIN, D. Health and environmental impacts of glufosinate ammonium. **Pesticide Action Network**, London, p. 1-22, 2001.
- LI, Y., et al. (2018). Factors Influencing Leaf Chlorophyll Content in Natural Forests at the Biome Scale. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 64, 2018.
- LUO X.; SUNOHARA Y.; MATSUMOTO H. Fluazifop-butyl causes membrane peroxidation in the herbicide-susceptible broad leaf weed bristly starbur (*Acanthospermum hispidum*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 78, n. 2, p. 93–102, 2004.
- MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 73-105, 2012.
- MILLER, G. et al. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell & Environment**, v. 33, n. 4, p. 453-467, 2010.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 1, p. 4405-410, 2002.
- MOLDES C. A. et al. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 4, p. 469-479, 2008.
- MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, n. 1, p.459-481, 2007.

- MONQUERO, P. A. et al. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta daninha**, v. 22, n. 3, p. 445-451, 2004.
- MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C.; MARTINS, A. F. Effects of cadmium, lead, mercury and zinc on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity from radish leaves. **Biologia Plantarum**, 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**. v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- NEAL, R., et al. Pro-oxidant effects of delta-aminolevulinic acid (delta-ALA) on Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Toxicology Letters**, v. 91, n. 3, p. 169-178, 1997.
- PAZMIÑO, D. M., et al. Differential response of young and adult leaves to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: role of reactive oxygen species. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, n. 11, p. 1874-1889, 2011.
- PEREIRA L. B. Effect of aluminum on δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) and the development of cucumber (*Cucumis sativus*). **Environmental and Experimental Botany**, v. 57, n. 1, p 106–115, 2006.
- ROMAN, E. S. et al. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Editora Berthier, 2007.
- ROMERO-PUERTAS, M. C. et al. Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, n. 9, p. 1135-1148, 2004.
- SALGUEIRO, A. C. F. et al. Effects of Bauhinia forficata Tea on Oxidative Stress and Liver Damage in Diabetic Mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 9, 2015.
- SAMMONS, R. D.; GAINES, T. A. Glyphosate resistance: state of knowledge. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p. 1367-1377, 2014.
- SASSA, S. Delta-Aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**, v. 28, n. 2-3, p. 133–145, 1982.
- SHARMA, P. et al. ; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. 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.
- SHEHAB, G. G.; AHMED, O. K.; EL-BELTAGI, H. S. Effects of Various Chemical Agents for Alleviation of Drought stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 38, n. 1, p. 139-148, 2010.
- 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.

SILVA, A. A. FERREIRA, A. F., FERREIRA, L. R., Herbicidas: classificação e mecanismo de ação. In: SILVA, J. F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**, Viçosa: Editora UFV, 2007. p. 83-148.

SINGH B. K., SHANER D. L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, v. 12, n. 3, p. 527–530, 1998.

FEDTKE, K.; DUKE, S. Herbicides. In: HOCK, B.; ELSTNER, E. (Eds.). **Plant toxicology**. New York: Marcel Dekker, 2005. p. 247-330.

TANAKA, R.; TANAKA, A. Biossíntese de tetrapirrole em plantas superiores. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 321-346, 2007.

TORBATI, S.; MAHMOUDIAN, M.; ALIMIRZAEI, N. Nanocapsulation of herbicide Haloxypop-R-methyl in poly (methyl methacrylate): phytotoxicological effects of pure herbicide and its nanocapsulated form on duckweed as a model macrophyte. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 42, p. 132-145, 2018.

TSUI, M. T. K.; CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v. 52, n. 7, p. 1189–1197, 2003.

USDA-APHIS U. S. (DEPARTMENT OF AGRICULTURE-ANIMAL IN PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE) 2013. **Dow AgroSciences Petitions (09-233-01p, 09-349-01p, and 11-234-01p) for Determinations of Nonregulated Status for 2,4-D-Resistant Corn and Soybean Varieties** – Draft Environmental Impact Statement. US Department of Agriculture, Riverdale, MD, USA. Disponível em: <https://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/24d_deis.pdf>. Acesso em: 17 Jan. 2019.

VIDAL, R.A.; MEROTTO JÚNIOR, A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001.

WENGER, J. Y.; NIDERMAN, T. Chapter 9: Acetyl-CoA carboxylase inhibitors. In KRÄMER, W. Y.; SCHIMMER, U. (Ed.) **Modern Crop Protection Compounds**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, GmbH & Co., 2007. p. 335-357.

WRIGHT, T. R. et al. Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by *aryloxyalkanoate dioxygenase* transgenes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 47, p. 20240–20245, 2010.

YEO, B-S., et al. Combined effects of glufosinate ammonium and temperature on the growth, photosynthetic pigment content and oxidative stress response of *Chlorella* sp. and *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 6, p. 3043-3055, 2018.

ZERAIK, A. E. et al. Development of a spot test for peroxidase activity monitoring during a purification procedure. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p.731-734, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A soja foi a cultura que apresentou maior eficiência no combate ao estresse causado pelos herbicidas em comparação ao milho, o que mostra que as respostas à geração de EROs na planta variaram de acordo com a espécie.

- Em conjunto, os resultados podem sugerir que ambos os herbicidas promoveram alterações na homeostase das plantas, desencadeando a resposta do sistema antioxidante das mesmas, principalmente nas misturas entre os herbicidas.

-A enzima APX, teve papel muito importante no combate à EROs tanto na soja, como no milho.

-A CAT combateu os níveis mais críticos de EROs, complementando a atividade da APX.

-Na soja, os herbicidas glyphosate e 2,4-D promoveram o aumento da atividade da enzima APX, enquanto que o amonio-glufosinate promoveu o aumento da CAT. Esse aumento foi eficiente na superação da produção exacerbada de EROs gerada após a exposição aos herbicidas, o que foi constatado através da prevenção na formação de peroxidação lipídica das membranas celulares da planta.

- No milho, houve ativação da CAT após aplicação de haloxyfop-R, haloxyfop-R + amonio-glufosinate.

- A atividade da APX também aumentou no milho com uso de amonio-glufosinate e haloxyfop-R de forma isolada, e nas misturas de glyphosate + 2,4-D, amonio-glufosinate + haloxyfop-R e glyphosate + amonio-glufosinate + haloxyfop-R.

- O aumento na atividade das enzimas no milho não foi suficiente para prevenir a peroxidação lipídica, mostrando que esses herbicidas apresentaram toxicidade e alta geração de EROs, o que sobrecarregou o sistema de defesa antioxidante do milho transgênico gerando estresse oxidativo.

-A atividade da enzima GPX não foi alterada após a aplicação dos tratamentos na soja, podendo estar relacionado ao fato de que a quantidade de EROs geradas foram supridas pelo decorrente aumento na atividade das outras enzimas antioxidantes

-Já no milho, a GPX foi inibida nas misturas de glyphosate + 2,4-D + amonio-glufosinate + haloxyfop-R, glyphosate + 2,4-D + amonio-glufosinate, glyphosate + 2,4-D + haloxyfop-R, 2,4-D + amonio-glufosinate + haloxyfop-R, 2,4-D + haloxyfop-R e glyphosate + amonio-glufosinate.

- A inibição da GPX no milho, pode acarretar uma diminuição da síntese de parede celular na planta já que ela está associada a síntese de lignina, que pode ter sido decorrente da inibição da ALA-D que é precursora da via síntese do heme, já que a GPX que é constituída de heme.

-A inibição da enzima ALA-D ocorreu para os herbicidas glyphosate e 2,4-D aplicados em isolado e associados e na mistura de amonio-glufosinate com 2,4-D na soja.

- No milho a ALA-D, foi inibida em todos os tratamentos com herbicidas de forma isolada, e em misturas. Essa inibição consequentemente poderia gerar alguma deficiência na síntese da clorofila e do heme, já que a enzima é precursora da via de biossíntese desses compostos.

-Isso mostra que os herbicidas estudados contribuem para um aumento da geração de EROs como um efeito indireto a seus mecanismos de ação, já que as cultivares apresentam genes que possibilitam resistência a esses herbicidas.

Diante do exposto nos dois artigos: a cultivar de soja com a tecnologia Enlist™, se mostrou eficiente na eliminação de EROs, uma vez que não houve peroxidação lipídica. Já a cultivar de milho com tecnologia similar, não conseguiu reverter a geração de EROs provocadas pelo aumento nos níveis de peroxidação lipídica na maioria dos tratamentos, especialmente com glyphosate e nas diversas associações dos herbicidas. E ainda, a inibição da enzima ALA-D, nas duas cultivares sugere que os herbicidas poderiam causar algum efeito na via de síntese de clorofila e heme em que ela atua. Os resultados obtidos no presente estudos são bastante intrigantes, e evidenciam que os herbicidas estudados geram toxicidade mesmo nas plantas resistentes a eles, mas que ao mesmo tempo, as cultivares apresentam mecanismos de defesa muito eficientes, o que acaba eliminando ou apenas diminuindo os danos provocados pela geração de EROs, tornando-as promissoras para o cultivo agrícola.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINETTO, D. et al. Changes in photosynthesis and oxidative stress in wheat plants submitted to herbicides application. **Planta Daninha**, v. 34, n. 1, p. 1-9, 2016.
- AHN I. P. Glufosinate ammonium-induced pathogen inhibition and defense responses culminate in disease protection in bar-transgenic rice. **Plant Physiology**, v. 146, n. 1, p. 213–227, 2008.
- ALVES, C. et al. Effect of herbicides in the oxidative stress in crop winter species. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 90, n. 2, p. 1533-1542, 2018.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, n. 1, p. 601–639, 1999.
- BANCO DE DADOS DE APROVAÇÃO DE TRANSGÊNICOS DO SERVIÇO INTERNACIONAL PARA A AQUISIÇÃO DE APLICAÇÕES EM AGROBIOTECOLOGIA (ISAAA). **Evento: DAS44406-6.** Disponível em: <<http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/event/default.asp?EventID=345>>. Acesso em: 15 Jan. 2019.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v.44, n.3, p.453-460, 2014.
- BECHARA, E. J. Oxidative stress in acute intermitente porphyria and lead poisoning maybe triggered by 5-aminolevulinic acid. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 29, p. 841-851, 1996.
- BECKIE, H. J. et al. A Decade of Herbicide Resistance Crops in Canada. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, n. 4, p. 1243-1264, 2006.
- BECKIE, H. J. Herbicide-resistant weed management: Focus on glyphosate. **Pest Management Science**, v. 67, n. 2, p. 1037-1048, 2011.
- BREINIG, S. et al. Control of tetrapyrrole biosynthesis by alternate quaternary forms of porphobilinogen synthase. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 10, n. 9, p. 757–763, 2003.
- CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 149-164, 2010.
- CARVALHO, L. B. Dinâmica Fisiológica. Capítulo 4. In: CARVALHO, L. B. (org.). **Herbicidas**. Lages, SC, 2013 p. 21-52.
- CÉLERES. **Informativo Céleres**: terceiro levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2016/2017, abril de 2017. Uberlândia: Céleres, 2017. Disponível em: <<http://www.celeres.com.br/3o-levantamento-de-adocao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201617/>>. Acesso em: 17 jan. 2019.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB)- **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Safra 2018/19 - Sexto levantamento, v. 6, n.6, 2019. Disponível

em:< file:///C:/Users/user/Downloads/BoletimZGraosZmarcoZ-ZresumoZ2019.pdf>. Acesso em: 12 Mar. 2019.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 53, n. 2, 2014.

DEUNER, S. et al. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Revista Ceres**, v. 55, p. 135-140, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA E AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Transgenia: quebrando barreiras em prol da agropecuária brasileira**. 2017. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/tema-transgenicos/sobre-o-tema>>. Acesso em: 06 Jan. 2018.

FEDTKE, K.; DUKE, S. Herbicides. In: HOCK, B.; ELSTNER, E. (Eds.). **Plant toxicology**. New York: Marcel Dekker, 2005. p. 247-330.

FOLMER, V.; SOARES, J. C. M.; ROCHA, J. B. T. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content in the diet. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 34, p. 1279-1285, 2002.

FOLMER, V. et al. A high fat diet inhibits delta-aminolevulinate dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). **The Journal of Nutrition**. v. 133, n. 7, p. 2165-2170, 2003.

FORTE, C. T.; GALON, L.; BEUTLER, A. N.; BASSO, F. J. M.; NONEMACHER, F.; REICHERT JÚNIOR, F. W.; PERIN, G. F.; TIRONI, S. P. Soil management systems and their effect on the weed seed bank. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 53, n. 4, p. 435-442, 2018.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GOMES, M. P., et al. Reactive oxygen species and plant hormones. In: AHMAD, P. (Ed.), **Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling**. Academic Press: New York, 2014, p. 65-81.

GOMES, M. P.; JUNEAU, P. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) induced by glyphosate: Is the mitochondrial electron transport chain a target of this herbicide? **Environmental Pollution**, v. 218, p. 402-409, 2016.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**. v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em:<www.weedscience.org>. Acesso em: 17 Jan. 2019.

HEROUET-GUICHENEY, C. et al. Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 143-153, 2009.

HEROUET, C. et al. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate ammonium herbicide in transgenic plants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 41, n. 2, p. 134-149, 2005.

- HIPPLER, F. W. R. et al. Towards soil management with Zn and Mn: estimates of fertilization efficacy of Citrus trees. **Annals of Applied Biology**, v. 166, n. 3, p. 484-495, 2015.
- KHAKDAN, F. et al. The relationship between antioxidant compounds contents and antioxidant enzymes under water-deficit stress in the three Iranian cultivars of basil (*Ocimum basilicum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 9, p. 226, 2016.
- MADANI, A. et al. Perspective of oxidative stress in a biological system and prevention by naturally occurring antioxidant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 4, p. 287-295, 2010.
- MAEDA H.; DUDAREVA N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **Annu. Rev. Plant Biol. Annual Review of Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 73–105, 2012.
- MAROCHI, A. et al. Managing glyphosate-resistant weeds with cover crop associated with herbicide rotation and mixture. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 4, p. 381-394, 2018.
- MHAMDI, A. et al. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4197-4220, 2010.
- MILLER, G. et al. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell & Environment**, v. 33, n. 4, p. 453-467, 2010.
- MINGUELA, J. V.; CUNHA, J. P. A. R. **Manual de Aplicações de Produtos Fitossanitários**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2010.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 1, p. 4405-410, 2002.
- MOLDES, C. A. et al. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 4, p. 469–479, 2008.
- MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.459-481, 2007.
- NEGRÃO, D. R.; VIANA, S. R. F.; BROETTO, F. Preparo de Tampões e Métodos para Coleta, Procedimentos e Extração de Enzimas em Tecidos Vegetais. **Métodos de Trabalho em Bioquímica Vegetal e Tecnologia de Enzimas**, v. 1, p. 01-05, 2014.
- NORSWORTHY, J. K. et al. Reducing the risks of herbicide resistance: Best management practices and recommendations. **Weed Science**, v. 60, n. (sp1), p. 31-62, 2012.
- ORENSTEIN, J. **Transgênicos: uma tecnologia em constante disputa**. 2017. Nexo Jornal. Disponível em: <<https://www.nexojournal.com.br/explicado/2017/08/05/Transg%C3%AAnicos-uma-tecnologia-em-constante-disputa>>. Acesso em: 26 jan. 2018.
- PINTO, E. et al. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **Journal of Phycology**, v. 39, n. 6, p.1008-1018, 2003.
- REIMCHE G. B. **Herbicidas dessecantes na fauna edáfica e genotoxicidade**. 2014. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

RIZZARDI, M.A.; SILVA, L. Manejo de plantas daninhas eudicotiledôneas na cultura da soja Roundup Ready. **Planta daninha**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 683-697, 2014.

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

SAMMONS R. D., GAINES T. A. Glyphosate resistance: state of knowledge. **Pest Management Science**, v. 70, n. 9, p.1367–1377, 2014.

SAMPAIO, R. C.; MORAES, C. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. **Motriz**, v. 16, n. 2, p. 506- 515, 2010.

SERVIÇO INTERNACIONAL PARA A AQUISIÇÃO DE APLICAÇÕES EM AGROBIOTECNOLOGIA (ISAAA). **Situação Global dos Cultivos Transgênicos**. Disponível em:< <https://d335luupugsy2.cloudfront.net/cms/files/50569/15306214042018-07-03-ISAAA-Resumo-Executivo.pdf> >. Acesso em: 07 Jan. 2019.

SHANER, D. L. The Impact of Glyphosate-Tolerant Crops on the Use of Other Herbicides and on Resistance Management. **Pest Management Science**, v. 56, n.4, p. 320-326, 2000.

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.

SHEHAB, G. G.; AHMED, O. K.; EL-BELTAGI, H. S. Effects of Various Chemical Agents for Alleviation of Drought stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 38, p. 139-148, 2010.

SILVA, A. A. FERREIRA, A. F., FERREIRA, L. R., Herbicidas: classificação e mecanismo de ação. In: SILVA, J. F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**, Viçosa: Editora UFV, 2007. p. 83-148.

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.

SINGH B. K., SHANER D. L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, v. 12, n. 3, p. 527–530, 1998.

TANAKA, R.; TANAKA, A. Biossíntese de tetrapirrole em plantas superiores. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 321-346, 2007.

TRIPATHY, B. C.; PATTANAYAK, G. K. Chlorophyll Biosynthesis in Higher Plants. In: EATON-RYE J., TRIPATHY B., SHARKEY T. (Ed.) **Photosynthesis**. Advances in Photosynthesis and Respiration. Dordrecht: Springer, 2011. p. 63-94.

US ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Ingredients Used in Pesticide Products: 2,4-D**. 2013. Disponível em:< <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/24-d>>. Acesso em: 23 Jan. 2018.

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.

VILA-AIUB, M. et al. Glyphosate-resistant weeds of South American cropping systems: an overview. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 366–371, 2008.

WRIGHT, T. R. et al. Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 47, p. 20240-20245, 2010.

ANEXO- IMAGENS DO CULTIVO DAS PLANTAS



Figura 1: Cultivo de soja Enlist™ em copos plásticos com capacidade para 0,5 L.
(Fonte: FORTE, 2018).



Figura 2: Cultivo de milho Enlist™ em copos plásticos com capacidade para 0,5 L.
(Fonte: FORTE, 2018).

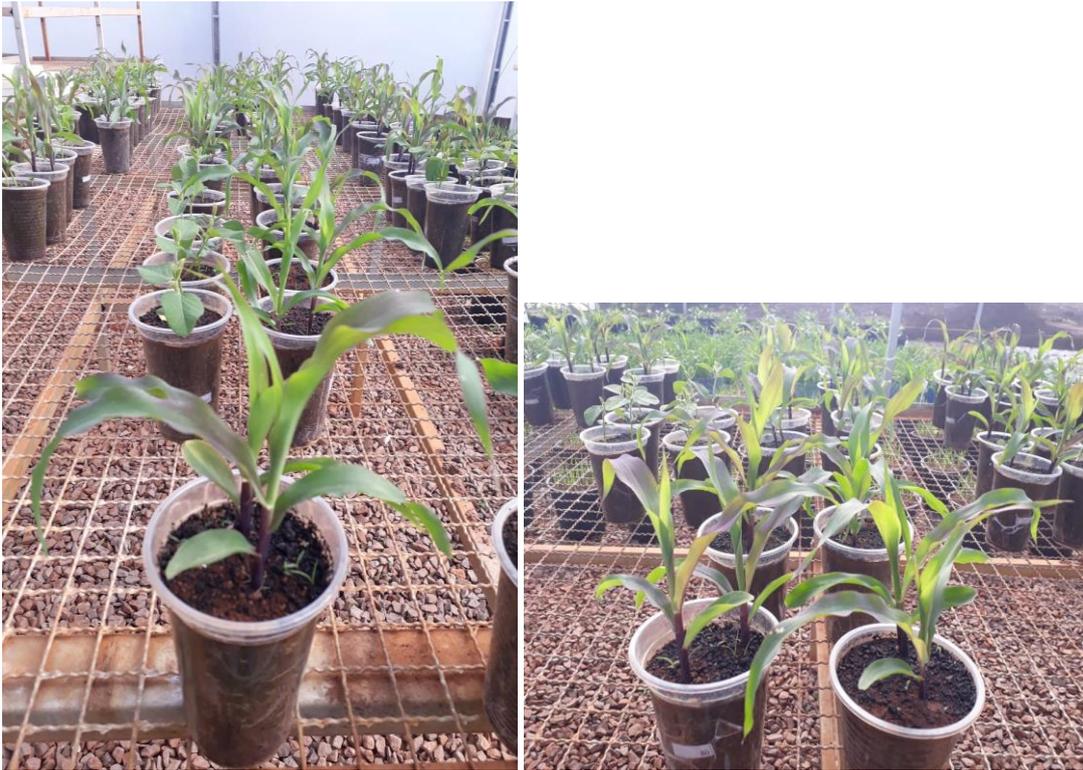


Figura 3: Cultivo de milho Enlist™ em copos plásticos com capacidade para 0,5 L. (Fonte: FORTE, 2018).



Figura 4: Cultivo de soja e milho Enlist™ em copos plásticos com capacidade para 0,5 L. (Fonte: FORTE, 2018).



Figura 5: Cultivo de soja e milho Enlist™ em copos plásticos com capacidade para 0,5 L. (Fonte: FORTE, 2018).



Figura 6: Cultivo de soja e milho Enlist™ em copos plásticos com capacidade para 0,5 L. (Fonte: FORTE, 2018).