

ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS PARA VERIFICAÇÃO DO PROCESSO DE DESINTOXICAÇÃO DO HERBICIDA MESOTRIONE EM PLANTAS DE *Zea mays*¹

*Analysis of the Electrophoretic Profiles of Cytoplasmic Proteins to Verify Detoxification of the Herbicide Mesotrione in *Zea mays* plants*

OGLIARI, J.², FREITAS, S.P.³, EVARISTO, J.A.E.³, GOMES, S.A.³, OKOROKOVA FAÇANHA, A.L.³, RETAMAL, C.A.³ e FAÇANHA, A.R.³

RESUMO - As plantas tolerantes a herbicidas apresentam rotas bioquímicas eficientes na desintoxicação dessas moléculas no interior da célula, e muitas enzimas citoplasmáticas participam desse processo. No presente trabalho, o perfil eletroforético de proteínas citoplasmáticas foi avaliado em folhas, caules e raízes de plantas de milho, durante o processo de desintoxicação, após tratamento com o herbicida mesotrione. Aos 15 dias após o plantio, foram aplicados 192 gramas por hectare ($g\ ha^{-1}$) do mesotrione, em pós-emergência; três e sete dias após a aplicação (DAA), foram coletados os tecidos para a realização de fracionamento celular e isolamento das proteínas solúveis do citoplasma. A atividade fotossintética foi analisada como marcador fisiológico do nível de fitointoxicação em diferentes estádios (1, 2, 3, 5 e 7 DAA). Enquanto a fotossíntese foi inibida nos primeiros 3 DAA, não se observou alteração significativa a partir do quinto dia. Medidas biométricas foram realizadas aos 7 DAA, não apresentando diferenças significativas. A análise dos perfis eletroforéticos das proteínas citoplasmáticas indicou maior expressão proteica em regiões de baixa massa molecular (~ de 21 a 65 kDa) nos tecidos de folhas e caules aos 3 DAA do mesotrione. Contudo, aos sete dias observou-se recuperação de perfis semelhantes aos tecidos de plantas não tratadas com o herbicida. Nas raízes, houve redução na biossíntese de proteínas sob tratamento com herbicida, tanto aos 3 quanto aos 7 DAA. Os resultados sugerem que as alterações do perfil eletroforético das proteínas citoplasmáticas das plantas de milho refletem bem o estágio de desintoxicação de seus tecidos e que, mesmo após o processo haver se estabelecido na parte aérea, as raízes continuaram a apresentar alterações, que indicam um processo mais prolongado de desintoxicação do mesotrione sobre o sistema radicular.

Palavras-chave: fitotoxicidade, milho, proteína, controle de plantas daninhas, metabolização de herbicida.

ABSTRACT - *Herbicide-tolerant plants have efficient biochemical pathways for detoxification of these molecules within the cell, with many cytoplasmic enzymes being involved in this process. In this study, the electrophoretic profiles of cytoplasmic proteins were evaluated in the leaves, stems, and roots of corn plants during the detoxification process after treatment with the herbicide mesotrione. At 15 days after planting, 192 grams per hectare ($g\ ha^{-1}$) of mesotrione were administered post-emergence. Three or seven days after application (DAA), tissues were collected to perform cell fractionation and isolation of soluble proteins from the cytoplasm. Photosynthetic activity was analyzed as a physiological marker of the level of intoxication at different stages (1, 2, 3, 5, and 7 DAA). While photosynthesis was inhibited in the first three days after spraying, there was no significant change on the fifth day. Biometric measurements were performed at seven DAA, and no significant differences were observed. Analysis of electrophoretic profiles of cytoplasmic proteins indicates higher expression of low molecular weight (~ 21-65 kDa) proteins in leaves and stems for three days after mesotrione application. However, at seven days, we observed a recovery profile similar to the tissues of the*

¹ Recebido para publicação em 26.7.2013 e aprovado em 17.12.2013.

² Instituto Federal Fluminense, Bom Jesus do Itabapoana-RJ, Brasil. <juares@uenf.br>; ³ Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ, Brasil.



plants not treated with herbicides. There was a reduction in the roots of herbicide-treated plants in protein biosynthesis for as long as three to seven DAA. These results suggest that changes in the electrophoretic profile of corn plant cytoplasmic proteins reflect the stage of tissue detoxification. Furthermore, even after proceedings have been established in shoots, the roots continue to show changes that indicate a longer mesotrione detoxification process for the root system.

Keywords: phytotoxicity, corn, protein markers, weed control, herbicide metabolism.

INTRODUÇÃO

O mesotrione (2-(4-metil-2-nitrobenzoi)-1,3-cicloexano-1,3-dione) é um herbicida recomendado para o controle de plantas daninhas na cultura do milho e da cana-de-açúcar em aplicações em pós-emergência e integra o grupo químico das 2 benzoilcicloexano-1,3-dione (tricetonas), o qual atua inibindo a enzima 4 hidroxifenilpiruvato dioxigenase - HPPD, (EC1.13.11), induzindo a redução da síntese de carotenoides (Lee et al., 1997; Mitchell et al., 2001; Rodrigues & Almeida, 2011).

A planta absorve esse herbicida por meio das raízes e folhas, apresentando excelente movimento apossimplástico (Mitchell et al., 2001). As espécies de plantas suscetíveis ao mesotrione começam a apresentar sintomas de amarelecimento das folhas aos três dias após a aplicação (DAA), com posterior branqueamento das folhas, progredindo para a necrose e morte em até duas semanas (Pallet, 2000; Johnson & Young, 2002).

Em alguns híbridos de milho mais sensíveis, o mesotrione tem provocado leve fitointoxicação, porém não foram observadas perdas na produtividade de grãos (O'Sullivan et al., 2002; Masiunas et al., 2004). As espécies tolerantes a herbicidas em geral possuem a capacidade de desativar seus princípios ativos e/ou de realizar a remoção do componente tóxico do citoplasma, compartimentalizando-o no vacúolo e/ou excretando-o para o meio extracelular (Mitchell et al., 2001; O'Sullivan et al., 2002; Johnson & Young, 2002; Armel et al., 2005). Todavia, o mecanismo de tolerância de plantas de milho ao mesotrione permanece desconhecido.

Os efeitos fitotóxicos sobre a fisiologia da planta variam em função da quantidade de herbicida absorvido e que chega às enzimas ou proteínas específicas, podendo ser o suficiente, ou não, para que a fitointoxicação se

manifeste. Plantas tolerantes a herbicidas possuem rotas metabólicas específicas, que previnem possíveis danos causados por esses produtos químicos (Yuan et al., 2006). Essa proteção é realizada por determinadas enzimas e outras proteínas de defesa das plantas, principalmente de localização citoplasmática, que possuem ampla faixa de especificidade, possibilitando que muitos herbicidas sejam metabolizados por uma ou várias enzimas e moléculas de defesa (Hatzios & Penner, 1982).

Nas plantas tolerantes, a desintoxicação das moléculas de herbicidas no interior da célula ocorre em quatro fases distintas (Coleman et al., 1997). Na primeira, muitas enzimas presentes no citoplasma, como citocromo P450 mono-oxigenases (P450), esterases, amidases, arilacilamidases e nitrilases, adicionam grupos funcionais nas moléculas de herbicidas, por meio das reações de hidrólise, oxidação ou redução, tornando as moléculas de herbicida ativas para que as enzimas atuem nas fases posteriores (Kreuz et al., 1996; Coleman et al., 1997; Eerd et al., 2003). Na segunda fase, os grupos funcionais gerados ou introduzidos nos herbicidas são utilizados como sítios para a realização da conjugação com a glicose, glutationa, aminoácidos/proteínas ou outros compostos orgânicos, por meio de enzimas como a UDP:glicosiltransferases e a glutationa S-transferase, formando conjugados de baixa toxicidade e mais solúveis no meio intracelular, para serem posteriormente eliminados do citoplasma (Lamoureux et al., 1991; Riechers et al., 1998; Ogliari et al., 2009).

Várias substâncias naturais produzidas pelas próprias plantas, a exemplo de compostos anti-herbivoria, como as fitoalexinas antifúngicas, são extremamente tóxicas às próprias células, e o mecanismo de desintoxicação atua para proteger a célula (Dixon et al., 1994; van Etten et al., 1995; Marrs, 1996). Muitas dessas enzimas citoplasmáticas também participam nas fases de desintoxicação de herbicidas,

apresentando massa molecular que pode variar de 21 a 65 kDa.

Conhecer como os vegetais se protegem desses compostos é essencial para obter, através da bioengenharia, variedades agrícolas mais resistentes a herbicidas, o que pode aumentar a produtividade das plantas. A eletroforese de proteínas em géis de poliacrilamida é uma técnica relativamente simples, rápida e de alto valor informativo, a qual permite um estudo das mudanças globais ocorridas nas frações proteicas e das proporções em que são encontradas nos tecidos das plantas em diferentes condições. A aplicação desse método possibilita evidenciar proteínas ou polipeptídios, que podem ser afetados da seguinte maneira: diminuição ou incrementação pela ação dos herbicidas; também leva a identificar quais dessas moléculas têm maior participação nas rotas de desintoxicação de produtos químicos em plantas tolerantes ou resistentes.

O objetivo deste trabalho foi estudar as mudanças induzidas nas proteínas citoplasmáticas dos tecidos de folha, caule e raiz de plantas de milho, durante o processo de desintoxicação do herbicida mesotrione, após o tratamento. Os dados obtidos foram discutidos com base no potencial de uso da técnica SDS-PAGE para avaliações mais precisas de alterações citoplasmáticas relacionadas com as diferentes fases do processo de fitointoxicação e desintoxicação em tecidos de plantas de milho expostas ao herbicida mesotrione.

MATERIAL E MÉTODOS

As plantas de milho (híbrido Braskalb 330) foram cultivadas em vasos de 4,5 litros, com substrato areia e solo (2:1), sendo semeadas quatro sementes de milho por vaso, permanecendo uma planta após o desbaste, realizado oito dias após o plantio (DAP). As plantas foram irrigadas sempre que necessário. O experimento foi conduzido em ambiente natural na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP) do CCTA, no campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes-RJ.

O tratamento consistiu em 192 gramas por hectare ($g\ ha^{-1}$) de mesotrione (Rodrigues & Almeida, 2011), aplicados aos 15 dias após o

plantio (DAP), estando as plantas de milho com quatro folhas. A aplicação do herbicida foi realizada com pulverizador costal, pressurizado a CO_2 , com pressão constante de $3,0\ kgf\ cm^{-2}$, e equipado com um bico Teejet DG 8002. A aplicação do produto foi feita às 7h em dias de sol e umidade relativa em torno de 65%.

As extrações das proteínas solúveis do citoplasma dos tecidos de raiz, caule e folha de milho foram realizadas aos três e sete dias depois da aplicação do herbicida (DAA). Após a colheita nas respectivas épocas, as plantas foram mantidas no gelo e encaminhadas ao laboratório, para extração das proteínas. As plantas foram pesadas individualmente, seguindo-se a maceração em almofariz com nitrogênio líquido, e colocadas em tubos de 50 mL, na presença de tampão de extração (70 mM Tris-HCL pH 8,0; 250 mM sacarose; 10% glicerol; 150 mM KCl; 0,2% PVP; 2 mM PMSF; 2 mM benzamidina; 2 mM DDT e 5 mM EDTA), na proporção de 1:2 massa/volume (material vegetal: tampão de extração). O homogeneizado foi centrifugado a 8.000 *g* por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante foi retirado e centrifugado por mais duas vezes a 10.000 *g* por 30 min. O sobrenadante da última centrifugação foi coletado e acondicionado em tubos de 2 mL e armazenado a -70 °C, para posterior análise eletroforética das proteínas, e o precipitado foi descartado. As proteínas solúveis extraídas tiveram a concentração total determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976).

O extrato total de proteínas extraídas foi submetido a 10 ciclos de sonicação, com descanso de 30 segundos, no aparelho Sonic Dismembrator (Fisher Scientific), durante 30 segundos; posteriormente, 30 μg de cada amostra foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes, segundo o método de Laemmli (1970). A aplicação do extrato total obedeceu à seguinte ordem: foi adicionada uma parte de tampão de amostra (contendo SDS 2%, β -mercaptoetanol 4% e ureia 8M) para cada três partes de extrato total de proteínas de cada um dos três tecidos aplicados por poço, visando à separação por eletroforese em SDS-PAGE em minigel. A separação proteica ocorreu sob corrente de aproximadamente 100 V - 20 mA, até a linha de frente atingir a parte inferior



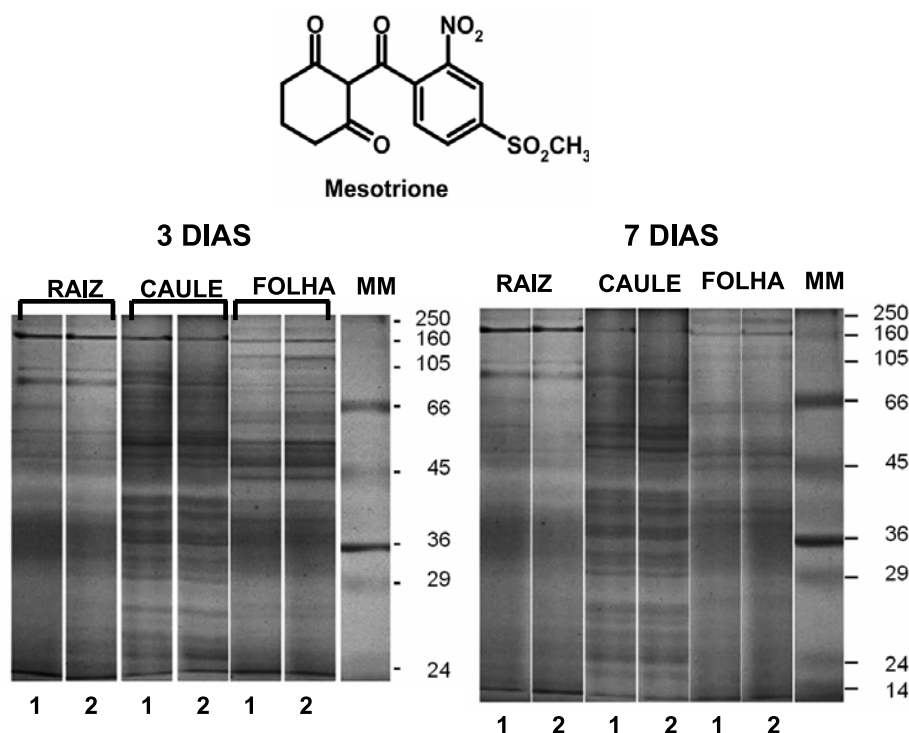
do gel. Os géis foram corados durante 12 horas em Coomassie Blue Brilliant 0,05%, conforme Bradford (1976), e descorados em solução de metanol 20% e ácido acético 10%.

A quantificação e a determinação da massa molecular relativa das proteínas do citoplasma foram realizadas por meio da comparação da mobilidade relativa das proteínas das amostras processadas com a mobilidade das proteínas de massa molecular (kDa) conhecida (Figura 1), mediante análise densitométrica computacional efetuada com o programa GEL PERFECT (Bozzo & Retamal, 1991), obtendo-se previamente as imagens no formato tif (gray) por meio de um *scanner* e um programa comercial.

O programa computacional GEL PERFECT disponibiliza a informação por meio de um gráfico, no qual o eixo das abscissas representa a migração relativa de uma banda (Rf), e o eixo das ordenadas, a área relativa dos picos das distintas bandas referentes à concentração máxima de uma determinada proteína. O

programa apresenta uma tabela de dados de cada banda, mostrando uma mancha, que representa o Rf, e a área que ocupa a concentração relativa em relação ao total da proteína carregada em cada canal e massa molecular em kiloDalton (kDa).

Outro estudo foi realizado com marcadores fisiológicos, na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP) do CCTA na UENF, para avaliar a taxa fotossintética e as medidas biométricas do milho. Na fotossíntese foram utilizadas cinco plantas de milho (híbrido Braskalb 330) por tratamento (controle e mesotrione), sendo uma planta por vaso, aplicando-se os mesmos tratamentos das condições dos experimentos anteriores, conforme descrito. Essa medição foi determinada por meio do sistema portátil de medição das trocas gasosas, modelo LI-6200 (LI - COR, Lincoln, NE, USA), utilizando uma câmara de 0,25 L, com área foliar de medição de aproximadamente 6,8 cm². Utilizou-se um aparelho com analisador de gás no infravermelho LI-6200 (Licor., NE, USA), possuindo conjunto de lâmpadas tipo LED (Light Emitting



1 - controle; 2 - herbicida mesotrione; MM - massa molecular das proteínas conhecidas.

Figura 1 - Eletroforeses de proteínas em gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE obtidos de extratos proteicos do citoplasma em células de raiz, caule e folhas de milho aos três e sete dias após os tratamentos (com e sem herbicida).

Diode) acoplado à superfície da câmara do IRGA, o que possibilitou a obtenção de um fluxo de fótons fotossintéticos de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sem aquecimento do tecido foliar. As épocas de avaliação foram as seguintes: 1, 2, 3, 5 e 7 dias após a aplicação, realizadas no horário entre 7 e 10 horas da manhã. A medição foi realizada na quarta folha do milho, na posição central do limbo foliar. No parâmetro biométrico, as plantas de milho foram cultivadas nas mesmas condições já descritas. Neste experimento foram utilizadas 25 repetições por tratamento, e aos 7 DAA as plantas foram coletadas para avaliação da altura e da massa verde e seca da parte aérea e seca da raiz.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As mudanças no perfil eletroforético das proteínas citoplasmáticas induzidas pelo tratamento com o herbicida mesotrione, analisado em raízes, caules e folhas de milho aos 3 e aos 7 DAA, são apresentadas na Figura 2. Nas folhas, observa-se aumento global na síntese de proteínas aos 3 DAA do mesotrione. As proteínas que mostraram maior expressão foram referentes às massas moleculares de 26 a 29 kDa, 38 a 42 kDa e 55 a 62 kDa (Figura 2A), apresentando aumentos na área das bandas em torno de 45, 20 e 32%, respectivamente. Já foi relatada na literatura a

indução de polipeptídios na faixa de massa molecular entre 24 e 62 kDa, relacionada com aumentos de expressão de proteínas participantes da primeira e segunda fases do metabolismo de desintoxicação do mesotrione (Coleman et al., 1997). As bandas com massa molecular de 55 a 62 kDa que apresentaram incremento após o tratamento podem refletir a participação de mono-oxigenases dependentes de citocromo P450 (P450), enzimas cuja massa molecular varia de 45 a 62 kDa (Schuler, 1996), e podem estar envolvidas na fase I de desintoxicação do mesotrione e na tolerância a vários outros herbicidas (Brown, 1989; Frear et al., 1991).

Em diferentes espécies de plantas existem expressivas isoformas da enzima P450, a qual atua sobre uma grande quantidade de substratos, incluindo vários princípios ativos de herbicidas (Tabela 1). A variabilidade na expressão dessas enzimas é uma dos principais determinantes da seletividade de herbicidas a diferentes espécies daninhas e de plantas cultivadas (Menendez & Prado, 1996). Tratamentos prolongados com um mesmo herbicida podem alterar a seletividade e induzir resistência na planta; assim, espécies sensíveis podem tornar-se resistentes após tratamentos que induzam uma maior expressão das P450 (Nelson et al., 1993; Hyde et al., 1996; Ohkawa et al., 1999).

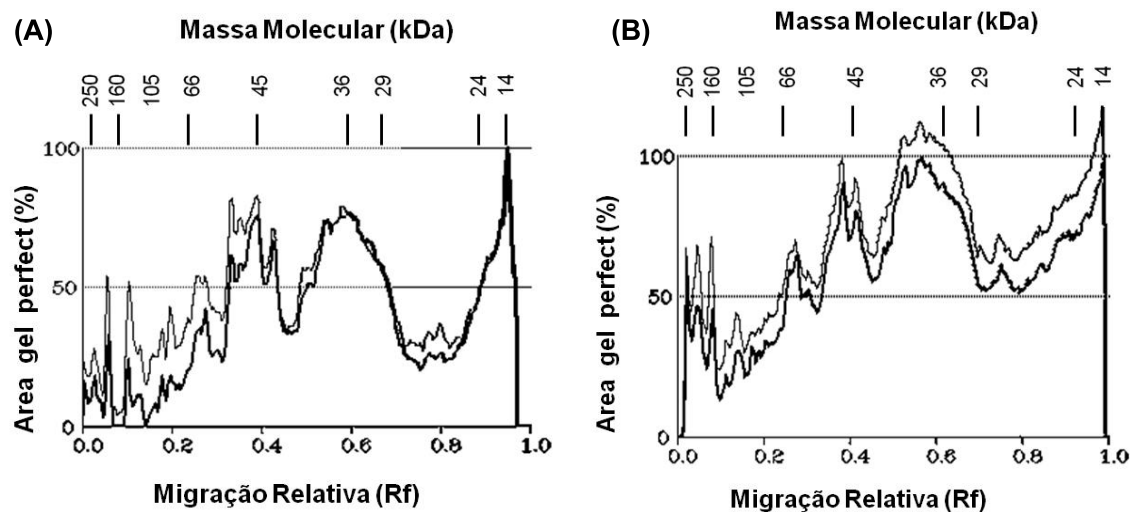


Figura 2 - Densitograma das proteínas do gel de poliacrilamida SDS-PAGE obtido de extratos proteicos do citoplasma em células de folhas de milho em duas épocas de avaliação nos tratamentos com e sem o herbicida mesotrione. (A) aos três dias após os tratamentos e (B) sete dias após os tratamentos. Obs.: tracejado mais intenso é o tratamento controle, e tracejado menos intenso, o tratamento com o herbicida mesotrione.



Tabela 1 - Enzimas citoplasmáticas envolvidas nas fases de desintoxicação de herbicidas em plantas

Enzima	Herbicida	Espécie de plantas	Citação
Citocromo P450 – fase I	monuron	<i>Gossypium hirsutum</i>	Frear et al. (1969)
	chlortoluron	<i>Zea mays</i>	Fonné-Pfister & Kreuz (1990)
	nicosulfuron	<i>Zea mays</i>	Hinz et al. (1997)
	chlortoluron	<i>Triticum aestivum</i>	Cabanne et al. (1987)
	diclofop-methyl	<i>Triticum aestivum</i>	Frear et al. (1991)
	pyrazosulfuron ethyl	<i>Oryza sativa</i>	Yun et al. (2001)
	diclofop-methyl	<i>Triticum aestivum</i>	McFadden et al. (1989)
	clodinafop-methyl	<i>Triticum aestivum; Zea mays; Hordeum vulgare</i>	Kreuz et al. (1991)
	bentazon	<i>Glycine max</i>	Sterling and Balke (1990)
	phenoxaprop-p-ethyl	<i>Hordeum vulgare</i>	Romano et al. (1993)
	clomazone	<i>Gossypium hirsutum</i>	Ferhatoglu et al. (2005)
	primisulfuron	<i>Zea mays</i>	Fonne-Pfister et al. (1990)
Glutatione s-transferase – fase II	atrazine	<i>Zea mays</i>	Shimabukuro et al. (1970)
	atrazine	<i>Abutilon theophrasti</i>	Anderson & Gronwald (1991)
	fomesafen	<i>Glycine max</i>	Andrews et al. (1997)
	metribuzin	<i>Glycine max</i>	Frear et al. (1985)
	glyphosate	<i>Zea mays</i>	Cataneo et al. (2003)
	alachlor	<i>Zea mays</i>	Mozer et al. (1983)
	fenoxaprop-ethyl	<i>Triticum aestivum</i>	Edwards & Cole (1996)
	acifluorfen	<i>Glycine max</i>	Frear et al. (1983)
	acetochlor	<i>Zea mays; Triticum aestivum</i>	Jablonkai and Hatzios (1991)
	fenoxaprop-p-methyl	<i>Echinochloa phyllopogon</i>	Bakkali et al. (2007)
	metolachlor e alachlor	<i>Setaria faberi</i>	Hatton et al. (1999)
	oxadiazon,	<i>Cicer arietinum</i>	Hunaiti & Ali (1991)
Glicosiltransferases – fase II	metribuzin	<i>Glycine max</i>	Frear et al. (1985)
	metribuzin	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Frear et al. (1983)
	picloram	<i>Euphorbia esula</i>	Frear et al. (1989)
	acifluorfen	<i>Glycine max</i>	Frear et al. (1983)
	bentazon	<i>Glycine max</i>	Leah et al. (1992)

Na mesma faixa de massa molecular em que se encontram as P450 também estão as UDP-glicosiltransferases, envolvidas na fase II do metabolismo de desintoxicação, participando da conjugação glicose-herbicida (Tabela 1). Estas enzimas possuem massas moleculares que variam de 40 a 62 kDa (Lamoureux et al., 1991; Leah et al., 1992), a mesma região dos géis de proteínas de folhas, onde se verificou aumento de 20 e 32%, sugerindo que o mecanismo de conjugação com a glicose pode ser ativado nas respostas ao mesotrione. A participação de UDP-glicosiltransferases é relatada na tolerância do tomate ao herbicida metribuzin (Frear et al., 1983b; Smith et al., 1989), bem como na resistência múltipla de

Alopecurus myosuroides ao herbicida clodinafop-propargyl (Brazier et al., 2002). No entanto, ainda não existem estudos descrevendo a participação destas enzimas nas respostas de plantas a tricetonas – classe a que pertence o mesotrione.

Um aumento de aproximadamente 45% na banda de 26 a 29 kDa (Figura 2A) pode ser correlacionado com a indução de outra enzima que atua na fase II do metabolismo de desintoxicação de herbicidas, as glutathione S-transferases (Tabela 1), cuja massa molecular varia de 20 a 30 kDa (Reinemer et al., 1996; Edwards & Dixon, 2003). Esta enzima possui papel importante no metabolismo de

desintoxicação celular de herbicidas aplicados em plantas tolerantes e, também, naquelas que adquirem resistência (Sandermann, 1992; Reade & Cobb, 1999). Em concordância com essa hipótese, o milho contém elevado nível de GST, representando mais de 1% do total das proteínas solúveis no citoplasma de suas células (Jablonkai & Hatzios, 1991; Marrs, 1996), com quatro isoformas já descritas para ele (Cole, 1994). Estas enzimas também têm papel importante na proteção da célula contra danos oxidativos gerados por radicais livres (Dirr et al., 1995).

Ao analisar o perfil eletroforético aos 7 DAA, na folha, observou-se que o tratamento

com herbicida induziu a síntese de polipeptídios em menor intensidade, em relação aos 3 DAA, nas bandas com massas moleculares entre 21 e 41 kDa e 44 e 57 kDa (Figura 2B), representando estímulos de expressão média nas bandas de 18 e 15%, respectivamente. Por outro lado, observa-se recuperação do perfil para a distribuição das proteínas citoplasmáticas aos 7 DAA em relação ao controle, o que reflete a recuperação da homeostase citoplasmática nas células de milho – dado esse corroborado pela recuperação observada pelos indicadores fisiológicos relacionados à taxa fotossintética (Figura 3) e ao crescimento vegetativo (Tabela 2). A taxa fotossintética foi reduzida nos tratamentos aos 1, 2, 3 e 5 DAA

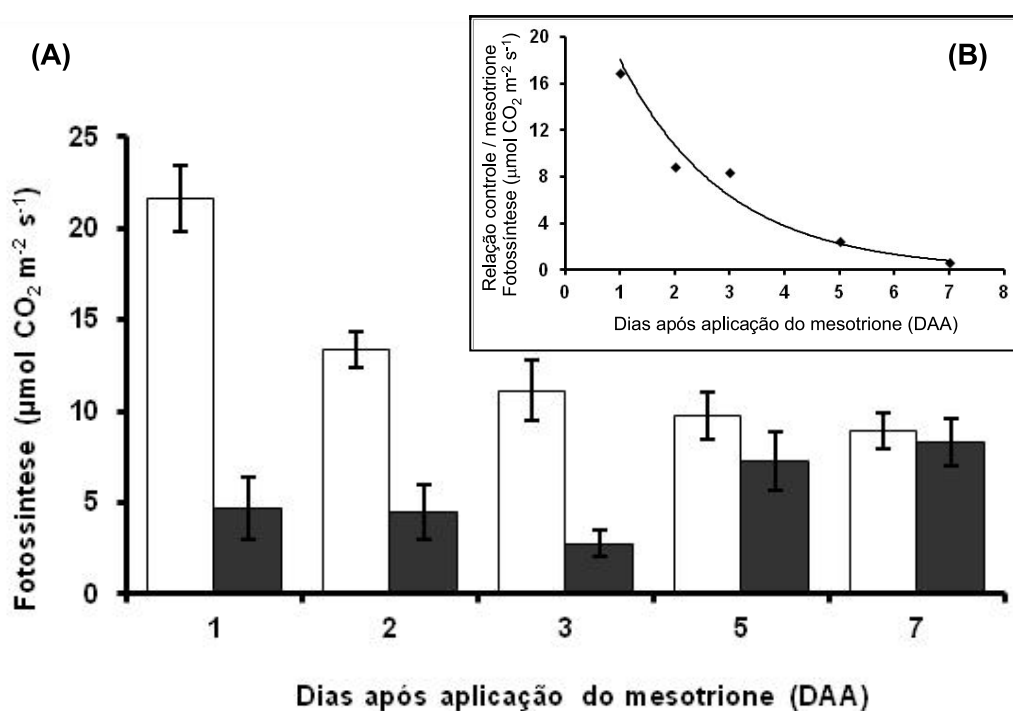


Figura 3 - (A) Taxa fotossintética em plantas de milho em cinco épocas (1, 2, 3, 5 e 7 DAA) de avaliação após a aplicação do herbicida mesotrione (192 g ha⁻¹). Resultado expresso como média ± desvio-padrão (n=5). Colunas transparentes = controle; colunas pretas = mesotrione. (B) a diferença da taxa fotossintética foi subtraída entre o tratamento controle e o herbicida mesotrione, em plantas de milho em cinco épocas (1, 2, 3, 5 e 7 DAA) de avaliação após a aplicação do herbicida mesotrione.

Tabela 2 - Valores de crescimento das plantas de milho aos sete dias após a aplicação do herbicida mesotrione (192 g ha⁻¹)

Tratamento	Altura	Massa verde da parte aérea	Massa seca da raiz	Massa seca da parte aérea
	(cm)			
Controle	62,12 a	36,67 a	5,99 a	3,93 a
Mesotrione	62,80 a	35,90 a	5,78 a	3,87 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna, para cada fator, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

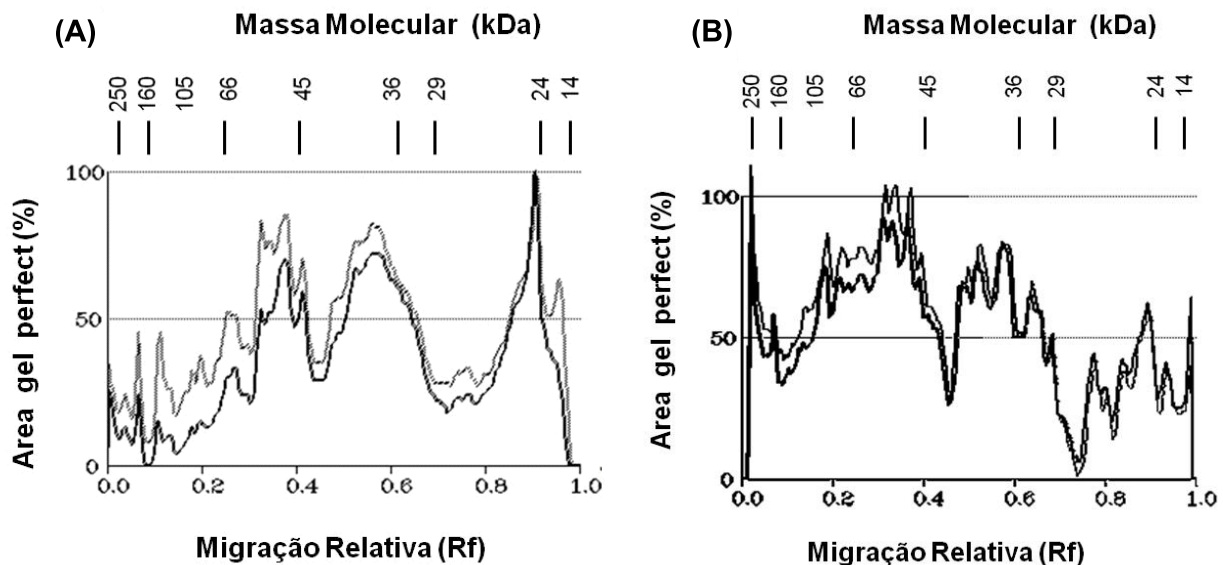


do mesotrione em 78, 66, 75 e 25%, respectivamente. Contudo, aos 7 DAA, a fotossíntese não apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (Figura 3A, B), indicando que o processo de desintoxicação da parte aérea estaria completo nesse estágio.

A distribuição das proteínas citoplasmáticas nos tecidos de caules do milho na eletroforese unidimensional revelou padrões semelhantes aos apresentados nos tecidos de folha, tanto aos 3 quanto aos 7 DAA do herbicida (Figura 4A, B). Tal qual na folha, constatou-se que aos 3 DAA do mesotrione há maior expressão de proteínas com massas moleculares aproximadas entre 26 e 29 kDa, 39 e 43 kDa e 49 e 55 kDa, representando estímulos de expressão nas bandas de 30, 25 e de 48%, respectivamente. Esses resultados sugerem que as células do caule respondem ao tratamento com mesotrione induzindo rotas bioquímicas citoplasmáticas semelhantes às induzidas nas células das folhas, representando mudanças constitutivas da parte aérea da planta inerentes ao processo de desintoxicação do herbicida. Aos 7 DAA do herbicida, não houve aumento expressivo na síntese de

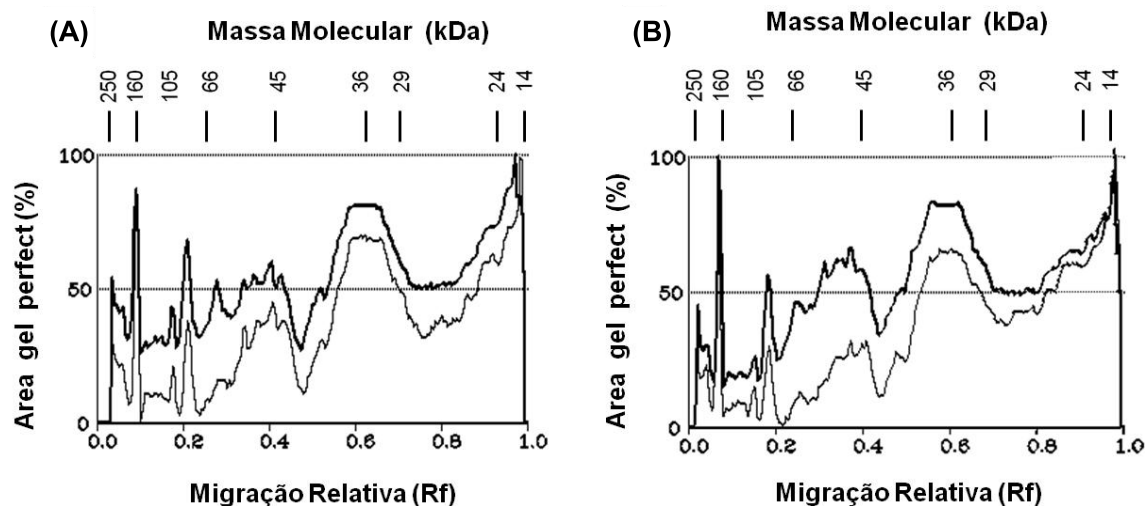
proteína, apenas nas massas moleculares, de 43 kDa e de 56 e 64 kDa, representando estímulos de expressão nas bandas de 25 e 20%, respectivamente (Figura 4B), tal qual ocorreu nos tecidos de folhas, não se observaram mudanças expressivas no perfil eletroforético citoplasmático das células do caule em relação às do controle, suportando a suposição de que o processo de desintoxicação da parte aérea estaria completo neste estágio.

Ao contrário do perfil verificado nos tecidos da parte aérea, o perfil eletroforético das proteínas citoplasmáticas de raízes de milho foi reduzido no tratamento com mesotrione, tanto aos 3 quanto aos 7 DAA do herbicida (Figura 5A, B). Em adição, houve notável mudança na expressão das proteínas aos 7 DAA em relação ao tratamento de 3 DAA – o primeiro apresentando maior supressão na faixa de massa molecular compreendida entre 24 e 53 kDa e 57 e 65 kDa, sugerindo reduções de expressão proteica de 38 e 77%, respectivamente, como se observa na Figura 5A. Aos 7 DAA ocorreu supressão nas massas moleculares de 26 a 37 kDa e de 39 a 65 kDa, com redução das áreas das bandas de 34 e 80%, respectivamente.



(A) aos três dias após os tratamentos e (B) sete dias após os tratamentos. Obs.: tracejado mais intenso é o tratamento controle, e tracejado menos intenso, o tratamento com o herbicida mesotrione.

Figura 4 - Densitograma das proteínas do gel de poliácridamida SDS-PAGE obtido de extratos proteicos do citoplasma em células de caule de milho em duas épocas de avaliação, nos tratamentos com e sem o herbicida mesotrione.



(A) aos três dias após os tratamentos e (B) sete dias após os tratamentos. Obs.: tracejado mais intenso é o tratamento controle, e tracejado menos intenso, o tratamento com o herbicida mesotrione.

Figura 5 - Densitograma das proteínas do gel de poliacrilamida SDS-PAGE obtido de extratos proteicos do citoplasma em células de raiz de milho em duas épocas de avaliação nos tratamentos com e sem mesotrione.

O efeito mais prolongado do mesotrione sobre as proteínas das células radiculares pode estar parcialmente relacionado com os danos iniciais no sistema fotossintético (Figura 3). De fato, as fitointoxicações provocadas por herbicidas podem causar inibição do transporte de fotoassimilados das folhas para os outros órgãos da planta (Royuela et al., 2000; Zabalza et al., 2004). A depleção fotossintética provocada pelo mesotrione nos tecidos aéreos das plantas, até o quinto DAA, deve levar a uma redução do conteúdo de açúcares e de outros compostos orgânicos a serem transportados para os tecidos não clorofilados, afetando principalmente as reações biossintéticas nas raízes (Rajcan & Tollenar, 1999).

Por outro lado, sabe-se que o mesotrione pode persistir no solo até 144 dias após a aplicação (Dyson et al., 2002; Chaabane et al., 2008), e a exposição permanente das células das raízes a tais concentrações residuais pode ser responsável pela permanência das mudanças dos perfis eletroforéticos dos tecidos radiculares mesmo transcorridos 7 DAA. Essa possibilidade amplia o potencial da análise do perfil eletroforético para verificação de níveis de fitointoxicação de tecidos específicos, mesmo quando outros indicadores fisiológicos indicam que a planta como um todo já se apresenta desintoxicada. Assim, aparentemente

as mudanças de expressão proteica verificadas na Figura 5 devem corresponder a modulações capazes de preservar as funções do sistema radicular, mesmo sob a ação do herbicida, provendo os tecidos aéreos com a água e os nutrientes necessários à manutenção de taxas de crescimento semelhantes às das plantas não tratadas (Tabela 2).

Análises genômicas, proteômicas e/ou metabolômicas são necessárias para determinar especificamente quais são as enzimas, polipeptídios e outras moléculas orgânicas que participam na conjugação e desintoxicação do mesotrione. Entretanto, os resultados deste estudo revelam que as mudanças nos padrões eletroforéticos de proteínas citoplasmáticas, dos diferentes tecidos das plantas, fornecem informações úteis na prospecção da prevalência de sinais de fitotoxicidade em tecidos específicos, do tempo de desintoxicação destes e da resistência de uma dada espécie a um dado herbicida.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa, e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, pelo apoio financeiro.



LITERATURA CITADA

- ARMEL, G. R. et al. Mesotrione plus atrazine mixtures for control of Canada thistle (*Cirsium arvense*). **Weed Sci.**, v. 53, n. 2, p. 202-211, 2005.
- ANDERSON, M. P.; GRONWALD, J. W. Atrazine resistance in a velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) biotype due to enhanced glutathione S-transferase activity. **Plant Physiol.**, v. 96, n. 1, p. 104-109, 1991.
- ANDREWS, C. J. et al. Glutathione Transferase Activities toward Herbicides Used Selectively in Soybean. **Pestic. Sci.**, v. 51, n. 2, p. 213-222, 1997.
- BAKKALI, Y. et al. Late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*): mechanisms involved in the resistance to fenoxaprop-p-ethyl. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 10, p. 4052-4058, 2007.
- BOZZO, S.; RETAMAL, C. Gel-perfect: Geles unidimensionales, un nuevo método densitométrico para computadores personales. **Arch. Biol. Medic. Exper.**, v. 181, n. 24, p. 181-184, 1991.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, n. 2, p. 248-254, 1976.
- BRAZIER, M. et al. O-glucosyltransferase activities toward phenolic natural products and xenobiotics in wheat and herbicide resistant and herbicide-susceptible blackgrass (*Alopecurus myosuroides*). **Phytochemistry**, v. 59, n. 2, p. 149-156, 2002.
- BROWN, H. M. Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonyleurea herbicides. **Pestic. Sci.**, v. 29, n. 3, p. 263-281, 1989.
- CABANNE, F. D. et al. Effect of the cytochrome P-450 inactivator 1-aminobenzotriazole on the metabolism of chlortoluron and isoproturon in wheat. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 28, n. 3, p. 371-380, 1987.
- CATANEO, A. C. et al. Atividade de glutatona s-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 307-312, 2003.
- CHAABANE, H. et al. Behaviour of sulcotrione and mesotrione in two soils. **Pestic. Manag. Sci.**, v. 64, n. 1, p. 86-93, 2008.
- COLE, D. J. Detoxification and activation of agrochemicals in plants. **Pestic. Sci.**, v. 42, n. 3, p. 209-222, 1994.
- COLEMAN, J. O. et al. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. **Reviews: Trends Plant Sci.**, v. 2, n. 4, p. 144-151, 1997.
- DIRR, H. et al. X-ray crystal structures of glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. **Eur. J. Biochem.**, v. 220, n. 3, p. 645-661, 1995.
- DIXON, R. A. et al. Early events in the activation of plant defense responses. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 32, n. 4, p. 479-501, 1994.
- DYSON, J. S. et al. Adsorption and degradation of the weak acid mesotrione in soil and environmental fate implications. **J. Environ. Quality**, v. 31, n. 2, p. 613-618, 2002.
- EDWARDS, R.; COLE, D. J. Glutathione transferase in wheat (*Triticum*) species with activity toward fenoxaprop-ethyl and other herbicides. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 54, n. 2, p. 96-104, 1996.
- EDWARDS, R.; DIXON, D. P. Metabolism of natural and xenobiotic substrates by the plant glutathione s-transferase superfamily. In: SANDERMANN, H. **Molecular Ecotoxicology of Plants**. Berlin: Springer Verlag, 2003. p. 17-50.
- EERD, L. L. et al. Pesticide metabolism in plant and microorganisms. **Weed Sci.**, v. 51, n. 3, p. 472-495, 2003.
- FERHATOGLU, Y. et al. The basis for the safening of clomazone by phorate insecticide in cotton and inhibitors of cytochrome P450s. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 81, n. 1, p. 59-70, 2005.
- FONNÉ-PFISTER, R.; KREUZ, K. Ring-methyl hydroxylation of chlortoluron by an inducible cytochrome P450-dependent enzyme from maize. **Phytochemistry**, v. 29, n. 9, p. 2793-2796, 1990.
- FONNE-PFISTER, R. et al. Hydroxylation of primisulfuron by an inducible cytochrome P450-dependent monooxygenase system from maize. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 37, n. 1, p. 165-173, 1990.
- FREAR, D. S. et al. N-Demethylation of substituted 3-(phenyl)-1-methylureas – isolation and characterization of a microsomal mixed function oxidase from cotton. **Phytochemistry**, v. 8, n. 11, p. 2157-2169, 1969.
- FREAR, D. S. et al. Acifluorfen metabolism in soybean: diphenylether bond cleavage and formation of homogluthathione, cysteine and glucose conjugates. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 20, n. 3, p. 299-310, 1983a.
- FREAR, D. S. et al. Metribuzin metabolism in tomato: Isolation and identification of N-glucoside conjugates. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 19, n. 3, p. 270-281, 1983b.
- FREAR, D. S. et al. Alternate pathways of metribuzin metabolism in soybean: formation of N-glucoside and homogluthathione conjugates. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 23, n. 1, p. 56-65, 1985.

- FREAR, D. S. et al. Picloram metabolism in leafy spurge: isolation and identification of glucose and gentiobiose conjugates. **J. Agric. Food Chem.**, v. 37, n. 5, p. 1408-1412, 1989.
- FREAR, D. S. et al. Induced microsomal oxidation of diclofop, triasulfuron, chlorsulfuron, and linuron in wheat. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 41, n. 3, p. 274-287, 1991.
- HATZIO, K. K.; PENNER, D. **Metabolism of herbicides in higher plants**. Minneapolis: Burgess, 1982. 142 p.
- HINZ, J. R. R. et al. Nicosulfuron, primisulfuron, and bentazon hydroxylation by corn (*Zea mays*), woolly cupgrass (*Eriochloa villosa*), and shattercane (*Sorghum bicolor*) cytochrome P-450. **Weed Sci.**, v. 45, n. 4, p. 474-480, 1997.
- HYDE, R. J. et al. Chlorotoluron metabolism in leaves of resistant and susceptible biotypes of the grass weed *Alopecurus myosuroides*. **Pestic. Sci.**, v. 49, n. 2, p. 185-190, 1996.
- HATTON, P. J. et al. Glutathione transferases involved in herbicide detoxification in the leaves of *Setaria faberi* (giant foxtail). **Physiol. Plant.**, v. 105, n. 1, p. 9-16, 1999.
- HUNAITI, A.; ALI, B. R. The induction of chickpea glutathione-S-transferase by oxadiazon. **Phytochemistry**, v. 30, n. 7, p. 2131-2134, 1991.
- JABLONKAI, I.; HATZIOS, K. K. Role of glutathione and glutathione S-transferase in the selectivity of acetochlor in maize and wheat. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 41, n. 3, p. 221-231, 1991.
- JOHNSON, C. B.; YOUNG, B. G. Influence of temperature and relative humidity on the foliar activity of mesotrione. **Weed Sci.**, v. 50, n. 2, p. 157-161, 2002.
- KREUZ, K. et al. Metabolism of the aryloxyphenoxypropanoate herbicide, CGA-184927, in wheat, barley and maize – differential- effects of the safener, CGA-185072. **Z Naturforsch C.**, v. 46, n. 6, p. 901-905, 1991.
- KREUZ, K. et al. Old enzymes for a new job: herbicide detoxification in plants. **Plant Physiol.**, v. 111, n. 3, p. 349-353, 1996.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 2, p. 680-685, 1970.
- LAMOUREUX, G. L. et al. Glutathione and glucoside conjugation in herbicide selectivity. In: CASELY, J. C.; CUSSANS, G. W.; ATKIN, R. K. (ED.). **Herbicide resistance in weeds and crops**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991. p. 227-261.
- LEAH, J. M. et al. Isolation and characterization of two glucosyltransferases from *Glycine max* associated with bentazon metabolism. **Pestic. Sci.**, v.34, n. 1, p. 81-87, 1992.
- LEE, D. L. et al. The discovery and structural requirements of inhibitors of *n*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **Weed Sci.**, v. 45, n. 3, p. 601-609, 1997.
- MARRS, K. A. The functions and regulation of *glutathione* S-transferases in plants. **Ann. Rev. Plant Physiol. Molec. Biol.**, v. 47, n. 1, p. 127-158, 1996.
- MASIUNAS, J. et al. Sweet corn cultivar tolerance to mesotrione. **Weed Sci. Soc. Am. Meeting. Abstr.**, v. 44, n. 1, p. 58, 2004.
- McFADDEN, J. J. et al. Aryl hydroxylation of diclofop by a cytochrome-P450 dependent monooxygenase from wheat. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 34, n. 1, p. 92-100, 1989.
- MENENDEZ, J.; PRADO, R. Detoxification of chlorotoluron in a chlorotoluron-resistant biotype of *Alopecurus myosuroides*. Comparison between cell cultures and whole plants. **Physiol. Plant.**, v. 99, n. 1, p. 97-104, 1996.
- MITCHELL, G. et al. Mesotrione: A new selective herbicide for use in maize. **Pestic. Manag. Sci.**, v. 57, n. 2, p. 120-128, 2001.
- MOZER, T. J. et al. Purification and characterization of corn glutathione S-transferase. **Biochemistry**, v. 22, n. 5, p. 1068-1072, 1983.
- NELSON, D. R. et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. **DNA Cell Biol.**, v. 12, n. 1, p. 1-51, 1993.
- OGLIARI, J. et al. Sistema primário de transporte de prótons integra os mecanismos de desintoxicação do mesotrione de milho. **Planta Daninha**, v. 27, n. 4, p. 799-807, 2009.
- OHKAWA, H. et al. The use of cytochrome P450 genes to introduce herbicide tolerance in crops: a review. **Pestic. Sci.**, v. 55, n. 9, p. 867-874, 1999.
- O'SULLIVAN, J. et al. Sweet corn (*Zea mays*) cultivar sensitivity to mesotrione. **Weed Technol.**, v. 16, n. 2, p. 421-425, 2002.
- PALLET, K.E. et al. The mode of action of isoxaflutole. I. Physiological effects, metabolism, and selectivity. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 62, n. 1, p. 113-124, 2000.
- RAJCAN, I.; TOLLENAAR, M. Source: sink ratio and leaf senescence in maize: II. Nitrogen metabolism during grain filling. **Field Crops Res.**, v. 60, n. 2, p. 255-265, 1999.



- READE, J. P. H.; COBB, A. H. Purification, characterization and comparison of glutathione S-transferase from black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) biotypes. **Pestic. Sci.**, v. 55, n. 10, p. 993-999, 1999.
- REINEMER, P. et al. Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: Structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. **J. Molec. Biol.**, v. 255, n. 2, p. 289-309, 1996.
- RIECHERS, D. E. et al. Chromosomal location and expression of a herbicide safener-regulated glutathione S-transferase gene in *Triticum aestivum* and linkage relations in *Hordeum vulgare*. **Genoma**, v. 41, n. 3, p. 368-372, 1998.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 6.ed. Londrina: IAPAR, 2011. 697 p.
- ROMANO, M. L. et al. The effect of monooxygenase and glutathione-S-transferase inhibitors on the metabolism of diclofop-methyl and fenoxaprop-ethyl in barley and wheat. **Pestic Biochem. Physiol.**, v. 46, n. 1, p. 181-189, 1993.
- ROYUELA, M. et al. Physiological consequences of continuous, sublethal imazethapyr supply to pea plants. **J. Plant Physiol.**, v. 157, n. 3, p. 345-354, 2000.
- SANDERMANN, H. Plant metabolism of xenobiotics. **Trends Biochem. Sci.**, v. 17, n. 1, p. 82-84, 1992.
- SCHULER, M. A. The role of cytochrome P450 Monooxygenases in plant-insect interactions. **Plant Physiol.**, v. 112, n. 4, p. 1411-1419, 1996.
- SHIMABUKURO, R. H. et al. Glutathione conjugation: atrazine detoxification mechanism in corn. **Plant Physiol.**, v. 46, n. 1, p. 103-107, 1970.
- SMITH, A. E. et al. Metribuzin metabolism by lonmo cultivars with low, medium and high levels of tolerance to metribazin. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 35, n. 3, p. 284-290, 1989.
- STERLING, T. M.; BALKE, N. E. Bentazon uptake and metabolism by cultured plant cells in the presence of monooxygenase inhibitors and cinnamic acid. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 38, n. 1, p. 66-75, 1990.
- van ETTEN, H. D. et al. Detoxification of phytoanticipins and phytoalexins by phytopathogenic fungi. **Canadian J. Bot.**, v. 73, S1, p. 518-552, 1995.
- ZABALZA, A. et al. Carbohydrate accumulation in leaves of plants treated with the herbicide chlorsulfuron or imazethapyr is due to a decrease in sink strength. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 10, p. 7601-7606, 2004.
- YUAN, J. S. et al. Non-target-site herbicide resistance: a family business. **Trends Plant Sci.**, v. 1, n. 1, p. 6-13, 2006.
- YUN, M. S. et al. Involvement of cytochrome P-450 enzyme activity in the selectivity and safening action of pyrazosulfuron-ethyl. **Pest Manag. Sci.**, v. 57, n. 3, p. 283-288, 2001.

