

# Mecanismo de ação e resistência aos herbicidas induzidos pela ação da luz

**Dr. Scott Nissen, Professor  
Colorado State University, Fort Collins, CO**

**Assistance from:  
Drs. Franck Dayan, Pat Tranel, Dean Riechers**



## Sumário da aula

- Mecanismos para minimizar oxigênio reativo
- Impacto das espécies reativas de oxigênio
- Revisão dos ingredientes ativos atuais e mecanismos de ação básico
- Situação atual dos inibidores da PROTOX, FSII, FSI e biossíntese de carotenóides (PDS e HPPD) resistência
- Mecanismos de resistência conhecidos
- Implicações para a Produção agrícola

## Proteção das espécies reativas de oxigênio

- As plantas têm defesas contra níveis normais de espécies reativas de oxigênio:

*superóxido dismutase (SOD)*



- SOD está presente no estroma e tilacóides; isoenzima presentes no citoplasma e mitocôndria.

*ascorbato peroxidase*



## Proteção do $\text{O}_2$

- Ascorbato pode espontaneamente reagir com a superóxido



- Principal reação para destruição do peróxido de hidrogênio; produz DHasc. A atividade da ascorbato peroxidase encontrada tanto no cloroplasto quanto na mitocôndria

*DHasc. redutase*



- Enzima encontrada principalmente nos cloroplastos, embora a forma citoplasmática tem sido relatada

## Proteção do O<sub>2</sub>

- Regeneração da glutatona pela GSH redutase
- Usa o NADPH para regenerar a GSH
  - ▣  $\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{GSSG} \longrightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{GSH}$

## Proteção fora do cloroplasto

- Catalase não é uma enzima do cloroplasto
- Localizada nos peroxissomos que são frequentemente associado com cloroplastos
- Como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode difundir livremente e penetrar membranas, os peroxissomos são importantes na destruição dos radicais livres



## Geração de Oxigênio Singlet

- Estado singlet vs. triplet
  - ▣ As moléculas tem um número par de elétrons com todos os elétrons pareados
  - ▣ Spin do elétron são opostos, então a molécula é chamada de estado de singlet
  - ▣ Spins dos elétrons são paralelos, então um estado triplet existe (geralmente maior energia que o estado de singlet)
- Clorofila vai de estado singlet, para um estado excitado a partir de elétrons transferidos para a plastoquinona

## Geração de Oxigênio Singlet

- Herbicidas que bloqueiam o transporte de elétrons produzem elétrons excitados singlet que decaem para o estado estável de triplet
- Normalmente o  $\beta$ -caroteno pode neutraliza eta clorofila triplet, mas com a inibição do herbicida durante o dia, o  $\beta$ -caroteno é supercarregado e  $^3\text{Chl}^*$  pode reagir com o oxigênio para formar um oxigênio singlet altamente reativo
  - ▣  $^3\text{Chl}^* + ^3\text{O}_2 \text{ -----} > ^1\text{Chl} + ^1\text{O}_2^*$

## Geração de Oxigênio Singlet

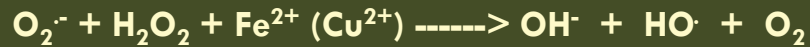
- ❑ O oxigênio singlet pode ser neutralizado pelo  $\beta$ -caroteno e alfa-tocoferol (vitamina E).
- ❑ Oxigênio é lipofílico e acumula no interior da membrana (7-8 X a concentração)
- ❑ Oxigênio singlet reage com o ácidos graxos insaturados, linoleico e linolênico
- ❑ Gera derivados de peróxido que eventualmente destrói os ácidos graxos e causa extravasamento da membrana

## Superóxido e outras espécies reativas de $O_2$

- ❑ O oxigênio pode aceitar um elétron vindo do transporte de elétrons fotossintético ao nível da ferredoxina ou através dos herbicidas bupiridilium para formar um ânion superóxido
  - ❑  $O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot -}$  (superoxide)
- ❑ Superóxido pode agir como um oxidante ou como um redutor; se ele reage com um outro anion superóxido, ele irá reduzir o segundo superóxido e forma  $H_2O_2$ 
  - ❑  $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$

## Radicais hidroxila

- A reação pode ocorrer na presença de  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$  reduzido



- Os radicais hidroxila são extremamente tóxicos e causam peroxidação lipídica
- Os radicais hidroxila podem extrair o átomo de hidrogênio dos ácidos graxos insaturados, formando  $\text{H}_2\text{O}$ .

## Impactos gerais

- Radicais peroxi de lipídeos insaturados começam uma nova cadeia de reação de peroxidação
- Eventualmente com a clivagem da cadeia de hidrocarboneto e Produção de cadeia curta de alcanos como etano, pentano e malondialdeídos
- A peroxidação pode também ocorrer com proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos (causando branqueamento)

## Sumário

- Equivalentes reduzidos vêm do transporte de elétrons fotossintético via NADPH
- Os herbicidas aumentam a Produção de espécies ativas de  $O_2$ , mas também indiretamente inibem sua remoção
- Níveis decrescentes de ascorbato e glutathiona reduzido
- Nenhuma detoxificação real par ao radical hidroxila uma vez formado

The reactive molecules such as singlet oxygen, hydroxyl radical, and triplet chlorophyll are the result of herbicide interaction. Each will initiate lipid peroxidation resulting in membrane destruction.

singlet oxygen



hydroxyl radical

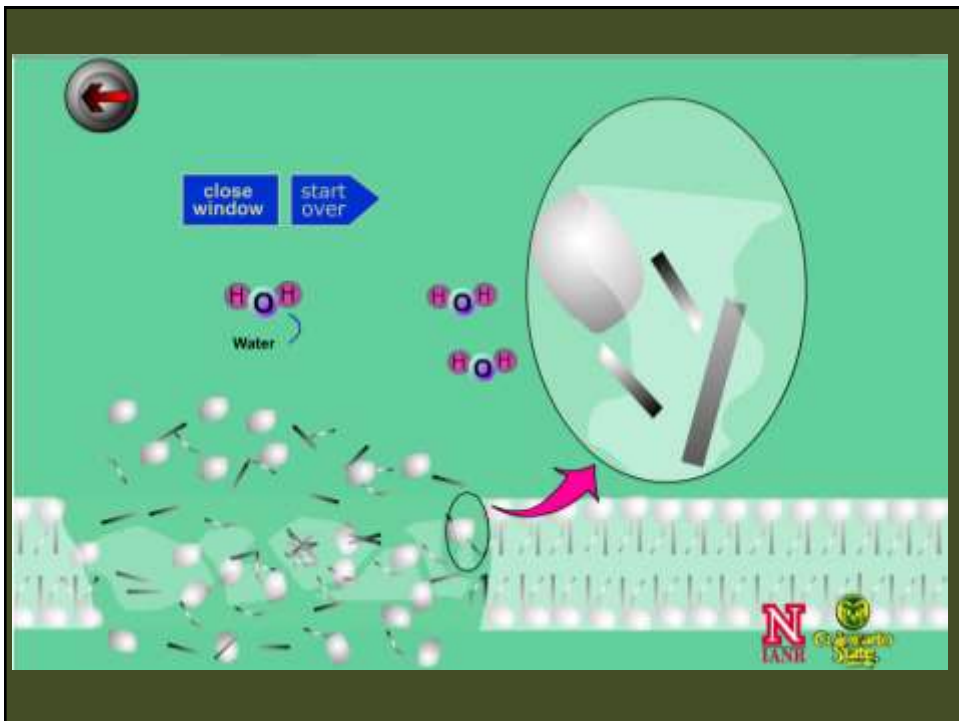
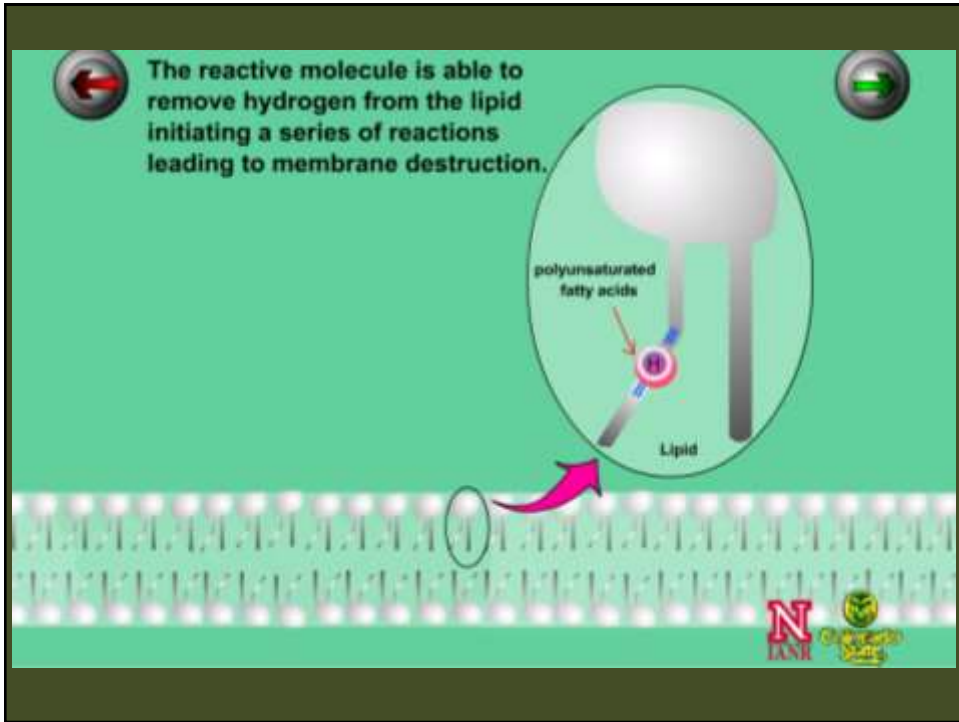


triplet chlorophyll



Lipid

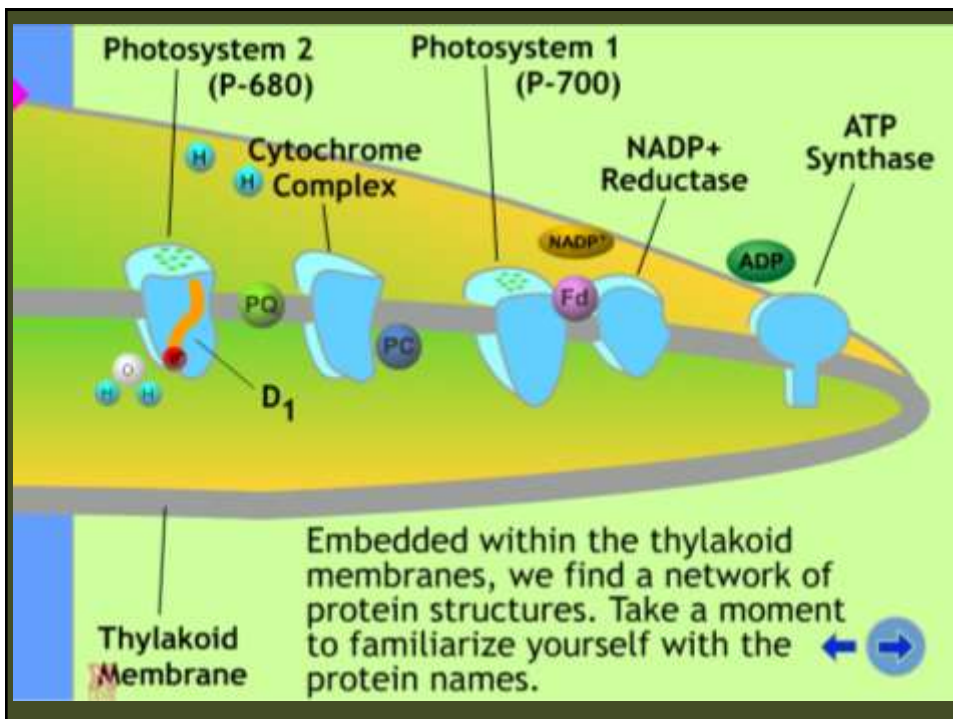






## Inibidores do FSII mais comuns

- **HRAC C1**
  - Triazines-simazine, atrazine, ametryne
  - Triazinone-hexazinone, metribuzin
  - Uracil-bromacil
- **HRAC C2**
  - Urea-diuron, tebuthiuron
  - Amide-propanil
- **HRAC C3**
  - Nitrile-bromoxynil, ioxynil
  - Benzothioadiazinone-bentazon
  - Phenyl-pyridazine-pyridate



## Estrutura da proteína D1

- D1 e D2 formam um complexo que em que duas plastoquinonas ligam-se,  $Q^A$  e  $Q^B$ .
- $Q^A$  liga se e aceita um elétron de cada vez
- $Q^B$  está mais fracamente ligada a proteína e pode aceitar dois elétrons:
  - ▣ Primeiro redução da molécula a semiquinone
  - ▣ Segundo redução posterior a hidroquinona.
- A hidroquinona pode então doar elétrons para o “pool” de plastoquinona na membrana da tilacóide

## Inibição do FSII

- Os herbicidas invadem o nicho de ligação da  $Q^B$  livre
- A ligação é reversível e não covalente, então impede que o  $Q^B$  ligue se ao elétron e interrompe o fluxo de elétrons
- Pode ser feitos estudos que mostram um herbicida deslocando outro herbicida que tem o mesmo sítio de ação. Por exemplo, metribuzin é facilmente deslocado pelo diuron

## RESISTÊNCIA

- **Mutantes resistentes a herbicidas tem sido usual na ajuda da determinação de como a proteína D1 funciona**
- **Aplicações repetidas de s-triazinas têm resultado em resistência a no mínimo 31 espécies de planta daninhas na Europa**
- **Mutantes resistentes a triazinas exibem uma mudança na ser-264 para glicina (AGT>GGT).**
- **Ocorre um nível de resistência de 10 X a triazinas quando estudada a planta inteira, e mais de 1.000 X quando estudado a nível de cloroplasto isolado**

## RESISTÊNCIA

- **Mutantes resistente de triazinas tendem a ter menor taxa de transferência de elétrons do Q<sup>A</sup> para o Q<sup>B</sup>**
- **Isso pode resultar em “penalidade na produção”**
- **psbA (o gene da D1) é um gene do cloroplasto, ele é geneticamente herdável maternalmente em muitas espécies de plantas**
- **Maiores taxas de degradação de herbicida; em alguns casos, aumento do nível de resistência**
- **A resistência de *Abutilon theophrasti* é devida a super expressão gênica de duas isoenzimas da GST que exibem atividade na Atrazina**

## RESISTÊNCIA

- Evidências em *Lolium rigidum* para vários tipos de resistência:
  - ▣ Uma envolve o aumento da atividade do cit. P450 (MFO)
  - ▣ Não há certeza se a enzima mutante é mais ativa ou se a enzima é superexpressa
  - ▣ Os estudos indicam que esta resistência é poligênica sob controle nuclear
  - ▣ Resultou em uma aparição gradual da resistência com o tempo e nível variáveis e padrões de resistência cruzada entre os biótipos dos diferentes locais

## Inibidores do PSI comum

- **HRAC D**
  - ▣ **Bipyridylum-paraquat, diquat**

## Bipyridylium Herbicides

- Paraquat (Gramoxone and Diquat, Reglone).
- Non-selective, post emergence.
- Rapid activity (20-30 min)
- No soil activity.
- Present as cations.
- High water solubility.
- Very little translocation, except if applied at dusk.
- Acutely toxic

## Mechanism of Action

- Bipyridylium herbicides can be reduced by PS I (single e<sup>-</sup>)
- Paraquat has a redox potential of -440 mV and ferredoxin has a redox potential of -432.
- Paraquat can accept the electron that would normally be transferred to ferredoxin and form a paraquat radical.

## Bipyridylum Herbicides

- Inhibition of photoreduction of  $\text{NADP}^+$  via ferredoxin is not the reason for rapid activity.
- The fast action of paraquat is due to the generation of superoxide when paraquat radical reacts spontaneously with  $\text{O}_2$ .
  - $\text{PQ} + \text{e}^- \text{-----} \rightarrow \text{PQ}^\cdot$
  - $\text{PQ}^\cdot + \text{O}_2 \text{-----} \rightarrow \text{PQ} + \text{O}_2^{\cdot-}$
- Paraquat and marijuana - lung irritation.

## Biochemical Effects on Plants

- Pigment photooxidation and bleaching
- Loss of photosynthetic activities
- Membrane leakage
- Loss of reduced glutathione and ascorbate
- Appearance of dehydroascorbate
- Evolution of ethane, propane (lipid peroxidation), and ethylene (stress reaction)

## Ultrastructural and Whole Plant Effects

- Membrane rupture at the level of the thylakoids, mitochondria, tonoplast, and plasmalemma.
- Rapid dehydration in light of leaves that have come into contact with the herbicide.

## Resistance

- Bipyridyliums are not metabolized in plants.
- Two mechanisms of resistance/tolerance are known
- Increased levels of enzymes involved in detoxification of activated  $O_2$  species (catalase, superoxide dismutase, etc.)
- Rapid sequestering of herbicide in the apoplast by binding to cell walls or veinal tissue

## RESISTANCE

- **More than one mechanism may function in a species.**
- **Most cases of paraquat and diquat resistance attributable to a single major gene**
  - ▣ *Conyza bonariensis* - single dominant nuclear gene; increased levels of detox. enzymes.
  - ▣ *Hordeum glaucum*, *H. leporinum*, *Arctotheca calendula* - single, nuclear, incompletely dominant gene.
  - ▣ *Lolium perenne* - resistance inherited as the result of a number of genes.



