

MODO DE AÇÃO DO GLYPHOSATE

Eivaldo Domingues Velini – Professor Adjunto
FCA / UNESP – Botucatu
Stephen O. Duke – NPURU
USDA – Oxford / Mississippi.
Maria Lúcia Bueno Trindade – Pesquisadora
Bioativa / Compostos Bioativos – Botucatu
Dana Kátia Meschede – Doutoranda
FCA / UNESP – Botucatu
Caio Antonio Carbonari – Doutorando
FCA / UNESP – Botucatu

INTRODUÇÃO

O modo de ação de um herbicida corresponde a todo o conjunto de eventos que ocorrem desde o seu contato inicial com as plantas até que as mesmas estejam mortas ou com o crescimento paralisado. As etapas fundamentais para que exista o controle são: contato com a planta; penetração (no apoplasto, reversível e sem gasto de energia); absorção (passagem para o simplasto, com gasto de energia e irreversível); movimentação na planta (entre órgãos, tecidos, células e organelas); metabolismo e outras formas de inativação ou ativação; interação com o sítio de ação e desencadeamento de eventos que efetivamente levam as plantas à paralisação do crescimento ou à morte.

Mesmo o glyphosate sendo o herbicida de mais amplo uso e o mais estudado em todo o mundo, as informações disponíveis ainda são insuficientes para uma completa compreensão e descrição do seu modo de ação. Outros capítulos deste livro abordam alguns dos tópicos listados. Este texto se concentrará na discussão da interação do glyphosate com o seu sítio de ação e nos eventos que estão relacionados à morte das plantas por este herbicida.

Os herbicidas conhecidos até o momento interagem com proteínas (na grande maioria enzimas) das plantas, comprometendo a funcionalidade das mesmas. O sítio de ação do glyphosate é a enzima EPSPs (5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase, E.C. 2.5.1.19). É o único composto capaz de inibir a sua atividade em doses ou concentrações que viabilizem o seu uso comercial como herbicida.

A intensidade de ação de um herbicida sobre uma dada planta está relacionada a uma série de variáveis como a dose recebida, a velocidade e intensidade de penetração e absorção, a movimentação na planta e a intensidade de ativação ou inativação. Especificamente em

termos de características do sítio de ação, destacam-se a seqüência de aminoácidos da proteína / enzima na qual se liga o herbicida e a abundância da mesma nos tecidos vegetais. Em termos de seqüência de aminoácidos, a alteração de apenas uma base nitrogenada no DNA e, conseqüentemente, no RNA pode induzir à alteração da seqüência original, criando condições para uma ligação mais ou menos intensa do herbicida. A alteração na seqüência de bases no DNA e no RNA, com reflexos na seqüência de aminoácidos na proteína / enzima, está frequentemente associada à resistência de plantas a herbicidas inibidores da ALS, da síntese de carotenóides e inibidores do Fotossistema II (relacionado à seqüência de aminoácidos da proteína D1). Excetuando-se as culturas transgênicas, que receberam genes que codificam a síntese de formas da enzima com menor afinidade ao glyphosate, provenientes de microrganismos, a enzima EPSPs caracteriza-se pelo alto nível de conservação em plantas, ou seja, pela baixa variabilidade na seqüência de aminoácidos em seus grupos funcionais. Considerando apenas as características do sítio de ação, a maior ou menor suscetibilidade ao herbicida está prioritariamente associada à abundância da enzima EPSPs, que por sua vez é regulada aos níveis transcricional (número de unidades de RNAm produzidas) e pós-transcricional (número de unidades de RNAm que efetivamente são convertidas em unidades da enzima).

O elevado nível de conservação da enzima EPSPs é responsável por uma das mais notáveis características do glyphosate: a capacidade de controlar praticamente todos os tipos de plantas. A dose necessária para o controle varia de espécie para espécie, mas todas as plantas exibem sintomas de intoxicação, mais ou menos intensos, quando tratadas com o herbicida. Esta característica faz do glyphosate um herbicida de amplo espectro de controle, bastante útil quando se pretende o controle de uma comunidade diversificada de plantas daninhas como nas aplicações de dessecação prévias à semeadura ou plantio de culturas em plantio direto ou cultivo mínimo.

As informações disponíveis indicam que o sítio de ação do glyphosate é a inibição da enzima EPSPs com conseqüente redução na disponibilidade dos aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina. Contudo, estudos com o fornecimento destes aminoácidos a plantas tratadas com glyphosate evidenciam que nem sempre os efeitos do herbicida podem ser revertidos. Aparentemente, os efeitos do glyphosate não podem ser completamente explicados pela interferência na síntese protéica e enzimática. A interferência na alocação do

carbono e a falha na produção de compostos fenólicos parecem ser as principais causas da redução do crescimento e da morte das plantas, como será discutido.

Em função da complexidade do modo de ação do glyphosate, este texto será fracionado em tópicos para facilitar a compreensão pelo leitor.

COMPOSTOS E ENZIMAS ENVOLVIDOS NA ROTA DO ÁCIDO CHIQUÍMICO

A rota do ácido chiquímico, na qual o glyphosate atua, produz compostos fundamentais para o desenvolvimento vegetal. O principal produto da rota são os compostos fenólicos que podem representar até 35% da biomassa vegetal (Boudet et al., 1985). Segundo os autores, cerca de 20% de todo o fluxo de carbono nas plantas é processado pela rota do ácido chiquímico. As rotas envolvidas na produção de aminoácidos aromáticos e compostos fenólicos são descritas em um grande número de trabalhos científicos. Para simplificar a análise das informações, alguns trabalhos representativos foram selecionados e a rota do ácido chiquímico, essencial para a produção destes compostos, é descrita na Figura 1. As sete reações iniciais até a produção do corismato são similares em todas as espécies de plantas e microrganismos.

Embora alguns compostos como o ácido gálico e os taninos hidrolisáveis possam ser produzidos a partir de compostos iniciais da rota, a grande maioria das substâncias é produzida a partir do ácido corísmico (ou corismato). Este composto corresponde ao primeiro ponto de divisão da rota. Os principais produtos que derivam do corismato são os três aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano), mas há também a produção do p-hidroxibenzoato e do p-aminobenzoato. Cada um dos aminoácidos aromáticos dá origem a diversas famílias de compostos envolvidos na regulação do crescimento ou na defesa de plantas, destacando-se os taninos condensados, antocianinas, vitamina E, ácido indolacético (AIA), ácido salicílico, lignina, flavonas, isoflavonas, fenilpropanóides e cumarinas, fundamentais para o crescimento e desenvolvimento vegetal. Mas nem todos os compostos produzidos a partir do corismato derivam destes três aminoácidos. Por exemplo, o AIA (Ácido Indolacético) pode ser produzido a partir do triptofano, mas também a partir do antranilato.

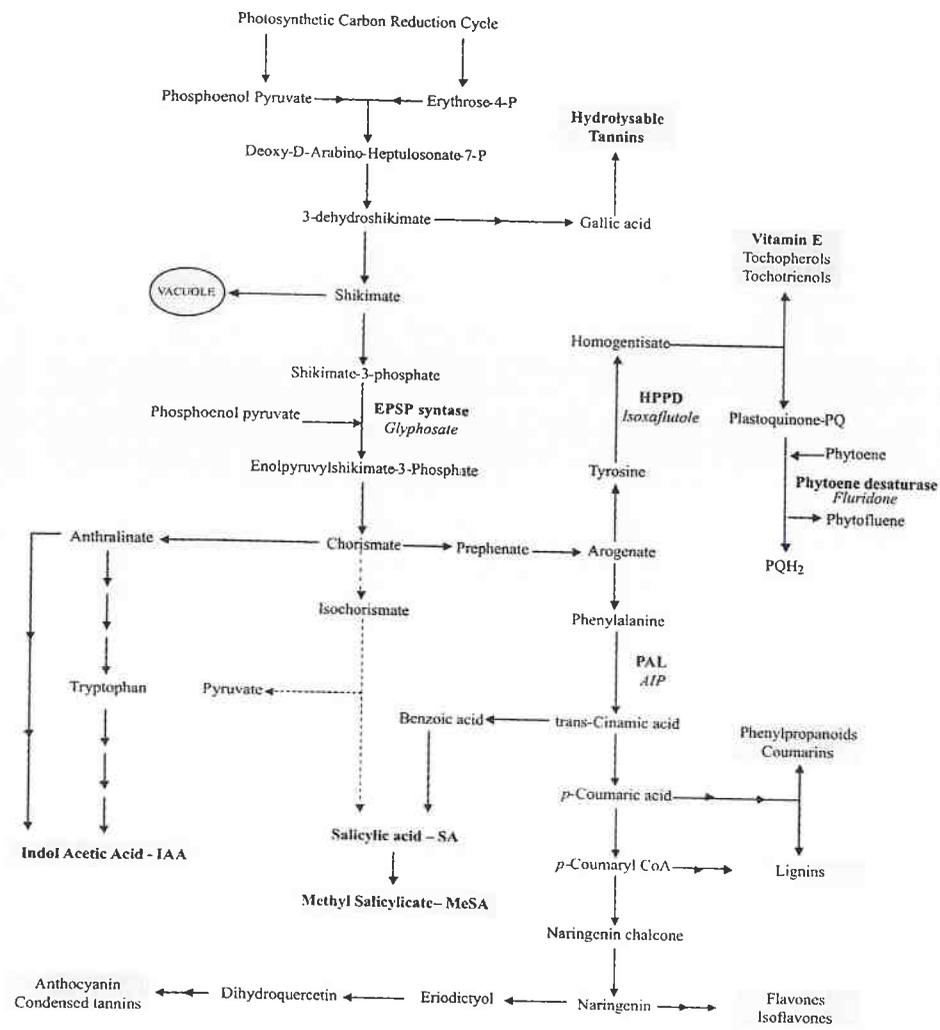


Figura 1 – Esquema da produção de aminoácidos aromáticos e compostos fenólicos. Sumário das informações apresentadas por: Taiz & Zeiger (2002); Rippert et al. (2004); Ossipov et al. (2003); Tanner et al. (2003); Wildermuth et al. (2001); Buchanan et al. (2000); Guillet et al. (2000); Mauchi-Mani & Slusarenko (1996) e Mousdale & Coggim (1991).

Não está claro como a regulação desta rota ocorre e se os sistemas de controle são similares nas várias espécies de plantas e microrganismos. As poucas informações disponíveis indicam que não. Exemplificando esta complexidade, Duke et al. (1980) observaram que

a aplicação de inibidores da PAL (fenilalanina-amônia-liase) implica na depleção dos níveis de trans-cinamato, no aumento das concentrações de fenilalanina e tirosina, além do aumento da quantidade extraída da própria enzima. Os resultados indicam que a abundância da enzima é regulada pelas concentrações do substrato (fenilalanina) e / ou do produto (ácido transcinâmico ou transcinamato). A aplicação do glyphosate também reduziu as concentrações de tirosina e fenilalanina, mas elevou a abundância da enzima. Os resultados indicam que nem sempre é possível concluir que produtos distantes do sítio de ação do glyphosate (EPSPs) terão sua síntese bloqueada ou intensamente reduzida pela aplicação do glyphosate, em função da presença de sistemas de controle da rota que podem compensar, ao menos em parte, a menor síntese de alguns dos compostos intermediários. De modo geral para herbicidas, quanto menor o número de reações e enzimas que separam um determinado composto de interesse até o sítio de ação (no caso do glyphosate a EPSPs) maior a probabilidade de que as concentrações do mesmo sejam reduzidas como resultado da aplicação do herbicida.

Quanto aos efeitos dos compostos ou classes de compostos destacados na Figura 1, discutiremos apenas alguns exemplos considerados de maior relevância. O primeiro refere-se à produção do ácido indolacético (AIA) que é completamente dependente da rota do ácido chiquímico. Alterações na atividade da enzima EPSPs e de outras enzimas envolvidas na produção de aminoácidos aromáticos e compostos fenólicos podem alterar, de modo significativo, as concentrações deste importante regulador de crescimento. Dentre as suas várias funções nas plantas, o AIA é fundamental para a alongação celular, a dominância apical, o crescimento de caules e raízes (principalmente em termos de profundidade) e produção de xilema (Taiz & Zeiger, 2002). Um exemplo prático da interferência do glyphosate na síntese de AIA ocorre quando se dá, na aplicação de glyphosate como maturador em cana-de-açúcar, um efeito secundário e a quebra da dominância apical (com morte ou não da gema apical) e a brotação de gemas laterais. Não foram encontrados trabalhos procurando utilizar o glyphosate, aplicado em baixas doses, para quebrar a dominância apical e estimular a brotação de gemas laterais, mas há um grande potencial de uso do herbicida com este fim, tanto em plantas daninhas quanto cultivadas. Um possível uso é estimular a brotação de plantas com reprodução vegetativa, facilitando o seu controle por uma segunda aplicação do composto.

O conjunto de compostos fenólicos pode ter efeitos importantes na absorção de luz, interferindo no processo fotossintético ou protegendo as plantas contra os efeitos da radiação ultravioleta. Efetivamente, Gitz et al. (2004) observaram que os compostos fenólicos têm uma importante função como filtros de luz, com comprimentos de onda correspondentes ao UV-B.

Um outro grupo importante de substâncias são os taninos, compostos polifenólicos com capacidade de afetar o crescimento de insetos e outros animais herbívoros, além de microorganismos, através da precipitação de enzimas e proteínas (Polya et al., 1995; Kawamoto et al., 1996; Mila et al., 1996; Salminen et al., 2001; Hartzfeld et al., 2002; Salminen et al., 2002 e Taiz & Zeiger, 2002). Tais compostos estão distribuídos em duas classes distintas destacadas na Figura 1. Os taninos condensados ou pró-antocianidinas são formados pela polimerização de unidades de flavonóides. Já os taninos hidrolisáveis derivam do ácido gálico, correspondendo a polímeros de ácidos fenólicos e açúcares simples. Quando o ácido fenólico é o próprio ácido gálico, os compostos são denominados galotaninos. Os galotaninos podem sofrer reações de oxidação, produzindo os elagitaninos, em que o ácido fenólico presente é o elágico. Informações adicionais sobre a estrutura e síntese destes compostos podem ser obtidas nos trabalhos de Tanner et al. (2003), Laitaine et al. (2002), Hagerman (2004), Yoshida et al. (1999) e Ossipov et al. (2003) além dos trabalhos já citados neste parágrafo. Destaca-se o trabalho de Mila et al. (1996) que cita que os taninos podem representar até 50% do peso seco de algumas espécies vegetais e as elevadas quantidades em que ocorrem fazem com que apresentem importantes efeitos em animais e microrganismos, embora a toxicidade destes compostos seja relativamente baixa. A análise da síntese de taninos indica a dificuldade em inferir sobre o controle de rotas metabólicas em plantas. O bloqueio da enzima EPSPs resulta na acumulação de ácido chiquímico, um precursor dos taninos hidrolisáveis e reduz a disponibilidade de fenilalanina, precursor dos taninos condensados. Portanto, não há como generalizar conclusões sobre efeitos do glyphosate para os taninos em geral. As duas sub-classes de compostos (hidrolisáveis e condensados) têm que ser tratadas separadamente.

A síntese de antocianinas, flavonóides e isoflavonóides também está relacionada a esta rota. As antocianinas estão envolvidas na expressão de um grande número de cores importantes na relação com animais (incluindo insetos) benéficos ou prejudiciais às plantas. Os fla-

vonóides são importantes para filtrar e evitar danos provocados por luz ultravioleta. Os isoflavonóides são compostos freqüentemente encontrados em leguminosas e com importantes funções na proteção contra insetos e patógenos.

A lignina é uma molécula fenólica altamente complexa e que só é menos abundante em plantas do que a celulose. A estrutura da lignina ainda não é completamente conhecida, mas a sua presença é fundamental para a rigidez das células e tecidos, interferindo na qualidade da madeira e na resistência a estresses bióticos e abióticos. A síntese deste composto e a eficácia como agente de reação a estresses é discutida em vários trabalhos, destacando-se Raes et al. (2003), Taiz & Zeiger (2002) e Cabané et al. (2004).

Um outro composto fenólico de grande relevância é o ácido salicílico. A relação do glyphosate com a síntese deste composto tem sido bastante discutida em função da importância do mesmo em termos de indução de resistência a patógenos. O ácido salicílico é o principal composto sinalizador envolvido no acionamento de genes de resistência a patógenos biotróficos. Quanto à sua síntese, predominam as informações indicando a via fenilalanina→ácido trans-cinâmico→ácido benzóico→ácido salicílico como a única ou a predominante em plantas (Ward et al., 1991; Ryals, 1996; Popova et al., 1997; Buchanan et al., 2000; Gaille et al., 2002; Ruuhola & Julkinen-Titto, 2003 e Shah, 2003). Contudo, trabalhos recentes têm indicado, também, a atividade da via corismato→isocorismato→ácido salicílico com a participação da enzima isocorismato sintase (Tegelen et al., 1999; Shah, 2003 e Wildermuth et al., 2001).

Sharon et al. (1992) observaram que doses sub-letais de glyphosate reduziram a produção de fitoalexinas que derivam da rota do ácido chiquímico e aumentaram o potencial de controle de *Cassia obtusifolia* pelo fungo *Alternaria cassiae*. Na presença do herbicida, foi possível reduzir em cinco vezes a quantidade de esporo necessária para promover o controle da planta daninha. Os autores não avaliaram e não discutem possíveis efeitos do glyphosate sobre a produção de ácido salicílico.

A relação do glyphosate com a ocorrência de doenças com a síntese do ácido salicílico e fitoalexinas não é simples e demanda muito mais informações do que as disponíveis para ser compreendida. O ácido salicílico não é uma fitoalexina, não interferindo diretamente nos patógenos, embora existam trabalhos indicando que o mesmo pode desempenhar papel importante na apoptose celular por intensificar o



estresse oxidativo em tecidos próximos a pontos iniciais de infecção. É um composto sinalizador e amplificador de sinais, que induz a expressão de genes de resistência (Figura 2). Para simplificar a análise do assunto, apresentaremos algumas informações sobre sistemas sinalizadores em plantas.

As defesas das plantas a agentes bióticos (pragas, doenças e interferência de plantas daninhas) e abióticos de estresse podem ser constitutivas ou induzidas. Na Figura 2, estão sumarizadas as informações disponíveis sobre os sistemas de reação ou defesa das plantas que serão discutidas nesse item.

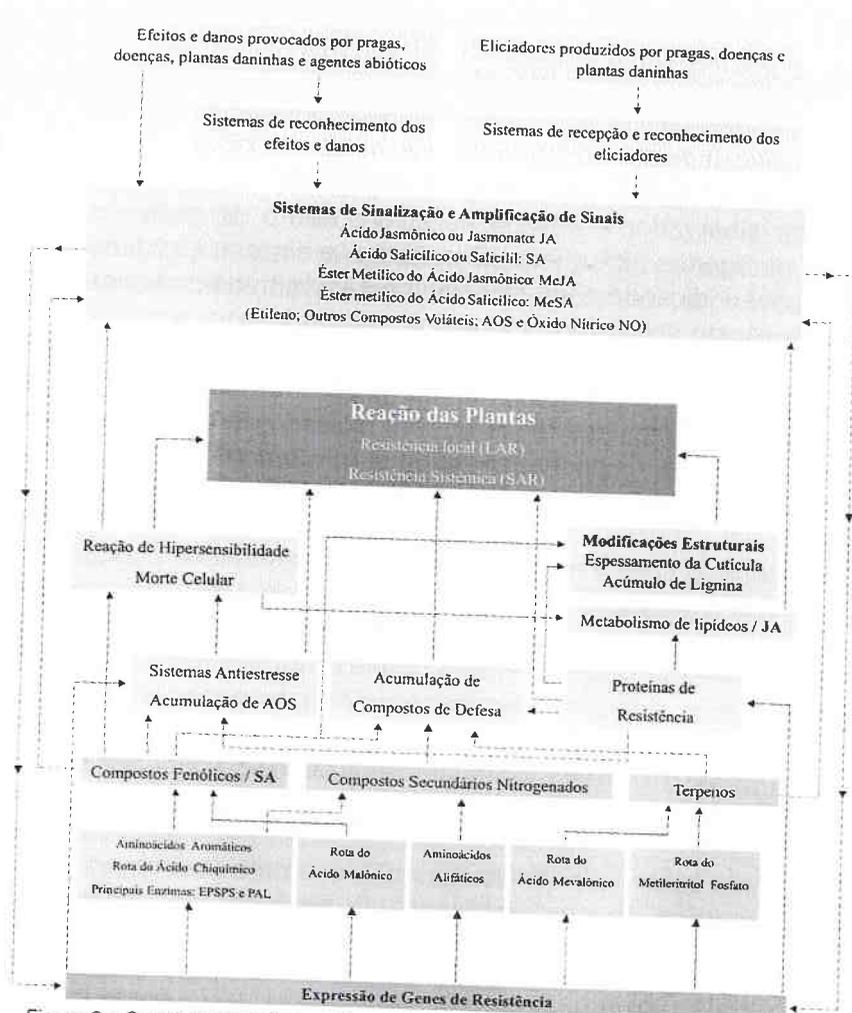


Figura 2 – Sumário das informações sobre os sistemas de autodefesa das plantas.

Inicialmente, os danos provocados por agentes bióticos ou abióticos são reconhecidos pelas plantas que acionam sistemas de sinalização e amplificação de sinais. Esta etapa inicial de reconhecimento dos danos é a menos conhecida em termos de literatura. Embora sejam freqüentes os trabalhos com identificação de eliciadores de pragas e doenças, pouco se sabe sobre a recepção e reconhecimento dos mesmos pelas plantas. Dentre as poucas informações disponíveis, Taiz e Zeiger (2002) citam que as proteínas R, envolvidas na resistência de patógenos e com grupos ricos em cisteína, têm grande afinidade com os eliciadores desses organismos, podendo atuar como um sistema de reconhecimento e acionamento dos mecanismos sinalizadores. A importância dos sistemas de reconhecimento também é discutida por Buchanan et al. (2000).

A partir do reconhecimento inicial, as rotas metabólicas são controladas pelos sistemas sinalizadores que, também, podem ser denominados de sistemas sincronizadores, garantindo que as respostas das plantas serão desencadeadas nas intensidades e níveis corretos.

Os compostos sinalizadores associados à síntese de compostos fenólicos são o ácido salicílico (SA) e o metil-salicilato. No caso do ácido salicílico, a resposta das plantas é sistêmica, ou seja, todos os tecidos da planta são envolvidos na resposta ao estresse ou ao sinalizador. Conforme será visto adiante neste texto, o SA e o MeSA são capazes de induzir a síntese deles próprios, atuando, também, como amplificadores de sinais.

Os sistemas sinalizadores conhecidos até o momento ativam genes de resistência, promovendo reações genéricas ou específicas nas plantas. Após a detecção do estresse ou a detecção do agente causal, várias rotas metabólicas podem ser ativadas ou inibidas nas plantas, modificando toda a síntese e acumulação de compostos. Os principais tipos de reação das plantas a estresses são:

- Produção e acumulação ou liberação de compostos secundários. Os compostos mais freqüentemente associados a patógenos, insetos e efeitos alelopáticos são os fenólicos e terpênicos.
- Produção e ação de proteínas de resistência como a fenilalanina amônia liase (PAL), envolvida na produção de compostos fenólicos, com destaque para o ácido salicílico e para a lignina.
- Intensificação ou bloqueio de sistemas antiestresse com acumulação ou inativação de espécies ativas de oxigênio (AOS).
- Modificações estruturais podem dificultar novos ataques, infecções ou minimizar os efeitos de estresses abióticos, destacando-se

o estresse hídrico. Destaca-se o aumento na síntese de lignina associado ao aumento da atividade da PAL.

- A reação de hipersensibilidade ou morte celular é o principal mecanismo de defesa de plantas a patógenos e tem como principais determinantes a acumulação de ácido salicílico, compostos fenólicos e AOS.

- Vários sistemas amplificam os sistemas sinalizadores, intensificando a reação da planta.

O ácido salicílico está prioritariamente associado à resistência a doenças promovidas por patógenos biotróficos. Mas o crescimento de plantas associado à resistência a doenças não pode ser analisado de modo reducionista, considerando-se que a síntese de ácido salicílico e a indução de genes de resistência por este composto será sempre efetiva e benéfica. Em muitas situações, infecções que levam a um pequeno comprometimento da área foliar são suficientes para promover grandes reduções de produtividade em diversos tipos de culturas. Os efeitos das doenças precisam ser analisados sob a ótica da expressão gênica e da acumulação de compostos, com capacidade de controlar os patógenos, mas que também podem intoxicar e limitar o crescimento das próprias plantas. Quando as plantas portam os genes corretos de resistência, a indução da expressão dos mesmos pelo ácido salicílico pode ser relevante em termos de resistência a doenças, mas se os genes são incorretos e incapazes de induzir à restrição do crescimento do patógeno, o efeito prático da maior expressão dos mesmos pode ser a limitação do crescimento da planta, por um processo autotóxico ou pelo gasto excessivo de energia. Exemplos de substâncias relacionadas à defesa contra patógenos e que podem interferir negativamente no crescimento de plantas são os compostos fenólicos em geral (com intensa absorção de luz e uma elevada demanda de energia para a sua produção), destacando-se a lignina.

Justificando o exposto, destaca-se o trabalho de Ruuhola & Julkinen-Titto (2003), indicando que a produção de ácido salicílico e de compostos fenólicos a ele associados foram importantes para a resistência de *Salix petandra* a patógenos, mas limitaram o crescimento das plantas. Resultados similares foram obtidos por Mauch et al. (2001), trabalhando com *Arabidopsis thaliana*. Um exemplo de composto fenólico associado ao SA é a lignina. Modificações na produção deste polímero podem ter importantes implicações na defesa da planta e no seu uso para fins industriais. Corroborando as informações apresentadas por Mauch et al. (2001)

e Ruuhola & Julkinen-Titto (2003), Velini et al. (2008) observaram que o bloqueio parcial da enzima EPSPs, através da aplicação de baixas doses de glyphosate, implicou em estímulos ao crescimento de várias espécies vegetais, incluindo eucalipto, pinus, milho e soja (não transgênica e suscetível ao glyphosate) conforme pode ser observado na Figura 3.

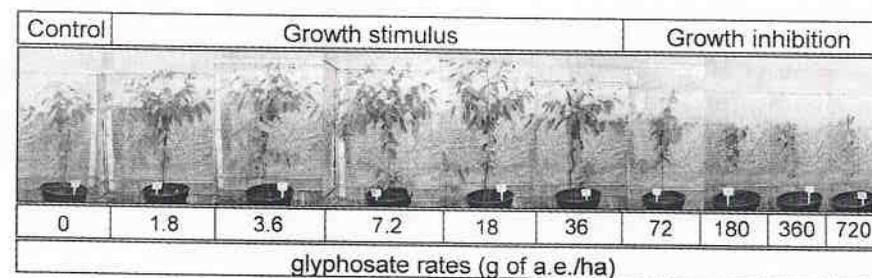


Figura 3 - Efeitos de doses de glyphosate sobre o crescimento de *Eucalyptus grandis*.

Deve ser destacado que Rippert et al. (2004) evidenciaram que a rota do ácido chiquímico está indiretamente envolvida com um segundo mecanismo de ação de herbicidas. O composto DKN (metabólito ativo do isoxaflutole) atua na conversão de hidroxifenilpiruvato (produzido a partir de tirosina) a homogentisato. O homogentisato é, por sua vez, utilizado na produção de tocoferol, tocotrienol e Vitamina E, importantes compostos antioxidantes. Os autores observaram que a atividade da EPSPs está diretamente relacionada às quantidades acumuladas de tirosina, tocoferol, tocotrienol e Vitamina E, com importantes efeitos na tolerância ao estresse oxidativo, além de implicar no aumento da resistência ao DKN (metabólito ativo do isoxaflutole).

Citamos apenas alguns exemplos de compostos e processos que podem estar associados à rota do ácido chiquímico com o objetivo de evidenciar a importância desta rota, em termos de crescimento e desenvolvimento vegetal. O bloqueio dos passos iniciais da rota pode modificar a produção de vários compostos fundamentais para a continuidade da vida das plantas. Os intrincados sistemas de controle da rota, fundamentados nas concentrações de substratos e produtos de cada reação, podem direcionar à rota ainda mais carbono do que os cerca de 20% normalmente verificados em plantas, na ausência

do herbicida (Boudet et al., 1985). Shultz et al. (1990) verificaram que após o tratamento com glyphosate, apenas o chiquimato e o chiquimato-3-fosfato podem representar até 16% do peso seco dos tecidos que atuam como drenos de fotoassimilados.

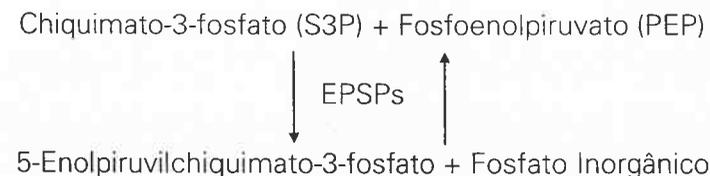
Finalmente, a rota do ácido chiquímico é responsável pela produção dos três aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina e triptofano, fundamentais para a continuidade da síntese protéica nas plantas. Todas as enzimas demandam tais aminoácidos. Com a redução das concentrações dos três aminoácidos aromáticos nas plantas, todos os processos que demandam a participação de proteínas / enzimas são indiretamente afetados.

A ação do glyphosate está certamente associada ao bloqueio da enzima EPSPs e a prova definitiva disso ocorreu com o desenvolvimento de variedades com seqüências alteradas desta enzima (com menor afinidade ao glyphosate) e / ou com maior expressão do gene associado a esta enzima. Mas os eventos pós-inibição da EPSPs, que levam as plantas à morte, não estão claramente estabelecidos. A sua ação resulta da inibição da rota do ácido chiquímico, mas não está correto dizer que o seu efeito decorre apenas do bloqueio da síntese dos aminoácidos aromáticos. Em geral, a suplementação com estes três aminoácidos não é suficiente para reverter os efeitos do glyphosate. A morte das plantas deve ser associada aos três efeitos mencionados: à falha na produção de um vasto conjunto de compostos que derivam da rota; à desregulação do fluxo de carbono e à redução da síntese protéica em função da redução das concentrações dos aminoácidos aromáticos.

CARACTERIZAÇÃO DO SÍTIO DE AÇÃO DO GLYPHOSATE

A enzima EPSPs é codificada no núcleo e desempenha sua função no cloroplasto (Stauffer et al., 2001). É importada pelos cloroplastos a partir do citoplasma como um precursor. Catalisa a ligação dos compostos chiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato, produzindo o enolpiruvilchiquimato-3-fosfato e fosfato inorgânico (Peterson et al., 1996). Segundo Hess (1993) o glyphosate é um inibidor não competitivo e competitivo, respectivamente, com os dois substratos. A enzima reage inicialmente com o Chiquimato-3-fosfato (S3P) e depois com o Fosfoenolpiruvato (PEP). A afinidade do glyphosate com o complexo EPSPs-S3P é 75 vezes maior do que a do PEP; a velocidade de dissociação do glyphosate do sítio de ação é 2000 vezes menor do que a do

PEP (Ream et al., 1992). O glyphosate não é um análogo do PEP, pois inibe apenas a EPSPs e não outras PEP-enzimas e porque a ligação do glyphosate e do PEP à EPSPs não são idênticas; a ligação do glyphosate provavelmente ocorre no sítio de ligação do fosfato nesta enzima (Fedke & Duke, 2004). Na reação inversa, o glyphosate é competitivo com o fosfato inorgânico.



As enzimas EPSPs, provenientes de diferentes espécies, podem diferir drasticamente quanto à afinidade com o glyphosate; os valores de K_i encontram-se entre 80nM em *Pisum sativum* e 1-5 μ M em microrganismos (Fedke & Duke, 2004).

A inibição da EPSPs leva ao acúmulo de altos níveis de chiquimato nos vacúolos o que é intensificado pela perda de controle do fluxo de carbono na rota (Alves, 2000; Singh & Shaner, 1998).

Os processos de obtenção de plantas resistentes ou tolerantes ao glyphosate são discutidos por Shaner & Bridges (2002) e Meilan et al. (2002), sendo quase sempre fundamentados na superexpressão do gene responsável pela produção da enzima EPSPs ou no uso de seqüências de aminoácidos que condicionam maior afinidade da enzima com o PEP, que se liga ao chiquimato na produção do EPSP (como por exemplo a configuração correspondente ao gene CP4 EPSPs de *Agrobacterium* apresentada por Harrison et al., 1996). Nos cultivares de soja resistentes ao herbicida, as duas modificações estão presentes. Há uma terceira possibilidade, utilizada com menor freqüência, que é a inserção do gene GOX (glyphosate oxireductase, responsável pela transformação do glyphosate em glyoxylato e no metabólito inativo AMPA – ácido aminometil fosfônico).

A análise dos trabalhos de Baerson et al. (2002a), Baerson et al. (2002b) e Yuan et al. (2002) indica que, especificamente em termos de sítio de ação, as possibilidades para o desenvolvimento de plantas daninhas resistentes ao glyphosate são: 1) presença de mutações de ponto que aumentam a atividade da enzima EPSPs; 2) presença de

mutações de ponto que reduzem a afinidade da enzima com o glyphosate; 3) maior produção da enzima EPSPs em genótipos resistentes sendo que a alteração pode ocorrer ao nível transcricional ou pós-transcricional. A menor absorção, a menor movimentação e o maior metabolismo em plantas completam a lista dos mecanismos não excludentes, pelos quais as plantas daninhas podem se tornar resistentes ao glyphosate.

MOVIMENTAÇÃO NAS PLANTAS

Em termos de movimentação nas plantas, o glyphosate é translocado pelo simplasto, com acúmulo em tecidos subterrâneos, tecidos imaturos e meristemas. A translocação via apoplasto é limitada, provavelmente em função do herbicida se ligar a cátions (principalmente os bi e trivalentes) abundantes na seiva bruta. Ou seja, mesmo que haja a translocação, o mais provável é que o glyphosate seja inativado pela complexação com os cátions presentes. Quanto à movimentação do apoplasto para o simplasto, Denis & Delrot (1993) e Morin et al. (1997) demonstraram que proteínas de transporte de fosfatos, presentes nas membranas de *Vicia faba* e *Catharanthus roseus*, respectivamente, facilitaram a absorção do glyphosate.

O fato de o glyphosate ter seu transporte facilitado por proteínas de transporte de fosfato em plantas é bastante relevante. A expressão do gene associado a este transportador pode alterar a eficácia com que o glyphosate é absorvido (transportado do apoplasto ao simplasto) e translocado em plantas. As informações sobre o transporte do glyphosate em membranas são restritas, mas a dependência de proteínas de transporte de fosfato, conforme evidenciado nos trabalhos de Denis & Delrot (1993) e Morin et al. (1997) cria várias interfaces entre o conhecimento do glyphosate, a nutrição de plantas e o melhoramento vegetal. Plantas ou genótipos com maior expressão do gene associado à proteína de transporte de fosfato provavelmente terão uma maior absorção e translocação do glyphosate apresentando-se mais suscetíveis ao herbicida.

A relação do glyphosate com o fósforo torna-se ainda mais complexa quando se considera que o fosfato e o glyphosate utilizam os mesmos sítios de sorção no solo e que baixas doses de glyphosate podem estimular a absorção do nutriente (Carbonari et al., 2007a; Carbonari et al., 2007b; Godoy, 2007). Nos trabalhos citados, os estímulos

do glyphosate à absorção de fósforo foram verificados para eucalipto e soja (convencional e resistente ao glyphosate). Se o glyphosate utiliza as proteínas de transporte de fosfato e induz a aumentos na absorção deste nutriente (provavelmente em função da maior expressão de proteínas de transporte), é possível que o glyphosate tenha a capacidade de estimular a sua própria absorção e transporte, o que justificaria, ao menos em parte, a maior eficiência de aplicações seqüenciais do herbicida em plantas daninhas de difícil controle.

CURVAS DE DOSE DE GLYPHOSATE E RESPOSTAS EM TERMOS DE INIBIÇÃO DAS PLANTAS

As curvas de dose x resposta para a grande maioria de combinações entre herbicidas e plantas indicam a ausência de efeitos em baixas doses e a ação inibitória em doses acima de um determinado limiar. Considerando as doses, há uma faixa inicial em que não são encontrados efeitos e uma segunda faixa em que o efeito é continuamente intensificado com o aumento da dose do composto. Em doses muito altas, há a estabilização dos efeitos sem grandes ganhos em termos de controle com aumentos das doses do herbicida. O modelo que melhor descreve este padrão de resposta de plantas a doses crescentes de herbicidas é o desenvolvido por Streibig (1980) apresentado a seguir:

$$y = F(x) = \frac{k}{1 + e^{bg} x^b} + d$$

Especificamente para o glyphosate, os trabalhos de Schabenberger et al. (1999), Wagner et al. (2003), Duke et al. (2006), Cedergreen et al. (2007), Godoy (2007), Carbonari et al. (2007a), Carbonari et al. (2007b) e Velini et al. (2008) observaram que baixas doses do herbicida podem estimular o crescimento de plantas. O estímulo de crescimento de uma planta por baixas doses de um composto tóxico é denominado "hormesis". Quando o estímulo ao crescimento em baixas doses é verificado, o modelo mais adequado para representar curvas de dose x resposta é o de Brain & Cousens (1989) descrito a seguir:

$$y = F(x) = \frac{k + fx}{1 + e^{bg} x^b} + d$$

Godoy (2007) observou que os estímulos do glyphosate ao crescimento da soja (convencional não resistente ao herbicida) foram mais intensos em tratamentos com menor disponibilidade do fósforo no solo. Há vários trabalhos em que estímulos de crescimento por baixas doses de glyphosate ocorreram mas não foram detectados e discutidos pelos autores. À luz do conhecimento atual, o estímulo do crescimento de plantas por baixas doses de glyphosate é uma hipótese que deve ser sempre considerada. O uso de modelos de regressão convencionais pode ser feito apenas após a comprovação de que os efeitos estímulos de crescimento em baixas doses (hormesis) não ocorreram.

Os estímulos em baixas doses indicam um comportamento que provavelmente não é único, mas é pouco freqüente entre os herbicidas. Algumas vezes os estímulos observados nos trabalhos citados, ocorrem em doses muito baixas do herbicida (1,8 a 3,6 g do ácido glyphosate / ha) e, quando as concentrações deste ácido fenólico foram avaliadas, estiveram sempre associados a aumentos nas concentrações do ácido chiquimico nas plantas, indicando que a ação resulta da interação do glyphosate com a enzima EPSPs. Os trabalhos citados mostram que a faixa de doses em que o glyphosate não atua em plantas é bastante estreita podendo ser de apenas 0 a 1,8 g do ácido / ha, em algumas espécies. Acima desta dose há uma segunda faixa de doses em que "podem ocorrer" estímulos de crescimento. Em uma terceira faixa de doses (em geral acima de 7,2 a 36 g do ácido / ha) é que se verificam os efeitos inibitórios sobre plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L.W.R.; SILVA J.B.; SOUZA, I. F. Efeito da aplicação de subdoses dos herbicidas glyphosate e oxyfluorfen, simulando deriva sobre a cultura do milho (*Zea mays* L.). **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.24, n.4, p.887-97. 2000.

BAERSON, S.R. et al. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase. **Plant Physiology**, Washington, V. 129, p. 1265-1275, 2002a.

BAERSON, S.R. et al. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). **Weed Science**, Washington, v. 50, p. 721-730, 2002b.

BOUDET, A.M.; GRAZIANA, A.; RANJEVA, R. In: Van Sumere, C.F. & Lea, P.J. **The biochemistry of plant phenolics**, Oxford: Clarendon Press, 1985. 135 p.

BRAIN, P.; COUSENS, R. An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. **Weed Research**, Oxford, v.29, p. 93-96, 1989.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES R.L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. 3.ed., Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000, 1367 p.

CABANÉ, M. et al. Condensed lignins are synthesized in poplar leaves exposed to ozone. **Plant Physiology**, Rockville, v.134, p.586-594, 2004.

CARBONARI, C.A.; MESCHEDE, D.K.; VELINI, E.D. Efeito da aplicação de glyphosate no crescimento inicial de mudas de eucalipto submetidas a dois níveis de adubação fosfatada. I SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE, 1., Botucatu, 2007, **Anais...** Botucatu: FEPAF/UNESP, 2007a p.68-70.

CARBONARI, C.A.; MESCHEDE, D.K.; VELINI, E.D. Acúmulo de fósforo em plantas de eucalipto submetidas a aplicação de diferentes doses de glyphosate. I SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE, 1., Botucatu, 2007, **Anais...** Botucatu: FEPAF/UNESP, 2007b, p.68-70.

CEDERGREEN N. et al. The occurrence of hormesis in plants and algae. **Dose-Response** v.5, p.150-162, 2007. Disponível: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi.artid=2477691&blobtype=pdf>. Acesso em : 11 setembro 2008.

DENIS MH AND DELROT S (1993) Carrier-mediated uptake of glyphosate in broad bean (*Vicia faba*) via phosphate transporter. **Plant Physiology**, Washington, v. 87, p.568-575, 1993.

DUKE SO, et al. Hormesis: Is it an important factor in herbicide use and allelopathy? **Outlooks Pest Management**, New York, v.17, p. 29-33, 2006.

DUKE, S.O.; HOAGLAND, R.E.; ELMORE, C.D. Effects of Glyphosate on Metabolism of Phenolic Compounds. V. L-a-aminooxy-fl-phenylpropionic acid and glyphosate effects on phenylalanine. **Plant Physiology**, Washington. v.65, p.17-21, 1980.

FEDTKE, C.; DUKE, S.O. Herbicides. In: Hock, B. & Erich, F.E. **Plant toxicology**, New York :CRC Press, 4 ed., 2004, 662 p.

GAILLE, C.; KAST, P.; HAAS, D. Salicylate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Purification and characterization of PchB, a novel bifunctional enzyme displaying isochorismate pyruvate-lyase and chorismate mutase activities. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.277, n.24, p.21768-21775, 2002.

GITZ, D.C. et al. Effects of a PAL inhibitor on phenolic accumulation and UV-B tolerance in *Spirodela intermedia* (Koch.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, n.398, p. 919-927, 2004.

GODOY, M.C. **Efeitos do glyphosate sobre o crescimento e absorção do fósforo pela soja**. 2007. 43 p. Dissertação (Mestrado em Agrícola), Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu.

GUILLET, G. et al. Expression of tryptophan decarboxylase and tyrosine decarboxylase genes in tobacco results in altered biochemical and physiological phenotypes. **Plant Physiology**, Washington, v.122, p.933-943, 2000.

HAGERMAN, A. E. Tannin Chemistry. hagermae@muohio.edu. 2004.

HARRISON, L.A. et al. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. **Journal of Nutrition**, v.126, n.3, p.728-740. 1996.

HARTZFIELD, P.W. et al. Determination of hydrolysable tannins (Gallotannins and Ellagitannins) after reaction with potassium iodate. **Journal of Agricultural Chemistry**, v.50, p.1785-1790. 2002.

HESS, F.D. Herbicide effects on plant structure, physiology, and biochemistry. In: ALTMAN, J. **Pesticide interactions in crop production beneficial and deleterious effects**. London: CRC Press, 1993. 579 p.

KAWAMOTO, H.; NAKATSUBO, F.; MURAKAMI, K. Stoichiometric studies of tannins-protein co-precipitation. **Phytochemistry**, New York, v.41, n5, p.1427-1431, 1996.

LAITAINEN, M.L.; JULKUNEN-TIITTO, R.; ROUSI, M. Foliar phenolic composition of European white birch during bud unfolding and leaf development. **Physiology, Plantarum**, Copenhagen, v.114, p.450-460, 2002.

MAUCH, F.; et al. Manipulation of salicylate content in *Arabidopsis thaliana* by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase. **Plant Journal**, San Francisco, v.25, n.1, p.67-77, 2001.

MAUCH-MANI, B; SLUSARENKO, A.J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. **Plant Cell**, Rockville, v.8, p.203-212. 1996.

MELLAN, R. et al. The CP4 transgene provides high levels of tolerance to Roundup® herbicide in field-grown hybrid poplars. **Canadian Journal and Forest Research**, Ottawa, v.32, p.967-976, 2002.

MILLA, I.; SCALBERT, A.; Expert, D. Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogen and rots. **Phytochemistry**, New York, v.42, n.6, p.1551-1555, 1996.

MORIN, F. et al. Glyphosate uptake in *Catharanthus roseus* cells: role of a phosphate transporter. V.58, p.13-22, 1997.

MOUSDALE, D. M.; COGGINS, J. R. Amino acid synthesis. In: KIKWOOD, R.C. **Target Sites for herbicide action**. Glasgow, University of Strathclyde, 1991. p.29-56.

OSSIPOV, V. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway. **Biochemistry. Systematic and Ecology**, Oxford, v.31, p.3-16, 2003.

PETERSON, M.L., et al. New simplified inhibitors of EPSP synthase: The importance of ring size for recognition at the shikimate 3-phosphate site. **Bioorganic. & Medicinal Chemistry Letters**, New York, v.6, n.23, p.2853-58. 1996.

POLYA, G.M.; WANG, B.H.; FOO, L.Y. Inhibition of signal-regulated protein kinases by plant-derived hydrolysable tannins. **Phytochemistry**, New York, v.38, p.307-314, 1995.

POPOVA, L.; PANCHEVA, T.; UZUNOVA, A. Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. **Bulgarian Journal Plant Physiology**, Sofia, v.23, n.1-2, p.85-93, 1997.

RAES, J. et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Washington, v.133, p.1051-1071, 2003.

REAM, J.E. et al. EPSP synthase: binding studies using isothermal titration microcalorimetry and equilibrium dialysis and their implications for ligand recognition and kinetic mechanism. **Biochemistry**, 34:5528-5534, 1992.

RIPPERT, P.; SCIMEMI, C.; DUBALD, M.; MATRINGE, M. Engineering plant Shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. **Plant Physiology**, Washington, v.134, p.92-100, 2004.

RUUHOLA, T.; JULKINEN-TIITTO, R. Trade-off between synthesis of salicylicates and growth of micropropagated *Salix pentandra*. **Journal Chemistry Ecology**, New York, v.29, n.7, p.1565-1588, 2003.

RYALS, J.A.; Neuenschwander, U.H.; Willits, M.G.; Molina, A.; Steiner, H.Y. Systemic Acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, p.1809-1819, 1996.

SALMINEN, J.P. et al. Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens*. **Phytochemistry**, New York, v.57, p.15-22, 2001.

SALMINEN, J.P.; OSSIPOV, V.; PIHLAJA, K. Distribution of hydrolysable tannins in the foliage of Finnish birch species. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tubingen, v.57, p.248-256, 2002.

SCHABENBERGER, O.; KELLS, J.J.; PENNER, D. Statistical tests for hormesis and effective dosage in herbicide dose-response. **Agronomy Journal**, Madison, v.91, p.713-721, 1999.

SCHULTZ, A. et al Glyphosate transport and early effects on shikimate metabolism and its compartmentation in sink leaves of tomato and spinach plants. **Zeitschrift Fur Naturforschung**, Tubingen, v. 45, p. 529-534, 1990.

SHAH, J. The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biology*, Stuttgart v.6, p.365-371, 2003.

SHANER, D.; BRIDGES, D. Inhibitors of aromatic amino acid biosynthesis (Glyphosate). In: **Herbicide action course**, Purdue University, West Lafayette, 2002, p. 500-513.

SHARON, A.; AMSELLEM, Z.; GRESSEL, J. Glyphosate Suppression of an Elicited Defense Response. Increased Susceptibility of *Cassia obtusifolia* to a Mycoherbicide. **Plant Physiology**, Washington, v.98, p. 654-659, 1992.

SINGH, B. K.; SHANER, D. L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, Champaign, v. 12, n. 3, p. 527-30. 1998.

STAUFFER, M. E. et al. Chemical shift mapping of shikimate-3-phosphate binding to the isolated N-terminal domain of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Federation of European Biochemistry Societe**, Oxford, v. 499, p. 182-86. 2001.

STREIBIG JC, Models for curve-fitting herbicide dose response data. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Stockholm, v.30, p.59-64, 1980.

TANNER, G.J. et al. Proanthocyanidin biosynthesis in plants: Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. **Journal of Biology Chemistry**, Bethesda, v.278, n.34, p.31647-31656, 2003.

TEGELEN VAN, L.J.P. et al. Purification and cDNA cloning of isochorismate synthase from elicited cell cultures of *Catharanthus roseus*. **Plant Physiology**, Washington, v.119, p.705-712, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 719 p.

VELINI, E.D. et al. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. **Pest Management Science**, Sussex, v.64, n. 4, p.489-496, 2008.

VELINI, E.D., et al. Sub-doses de glyphosate estimulam o crescimento de plantas daninhas e cultivadas. In: XXV CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 25, Brasília: **Anais**...Brasília: Sociedade brasileira das Plantas Daninhas, 2006.

WAGNER R, KOGAN, M.; PARADA, A.M. Phytotoxic activity of root absorbed glyphosate in corn seedlings (*Zea mays* L.). **Weed Biology and Management**, Kyoto, v.3, p.228-232, 2003.

WARD, E.R. et al. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v.3, p.1085-1094, 1991.

WILDERMUTH, M.C.; et al. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. **Nature**, London, v.44, p.562-571, 2001.

YOSHIDA, T. et al. Oligomeric hydrolysable tannins from *Tibouchina multiflora*. **Phytochemistry**, New York, v.52, p.1661-1666, 1999.

YUAN, C.; CHANG, M.Y.; CHEN, Y.M. Triple mechanisms of glyphosate-resistance in a naturally occurring glyphosate-resistant plant *Dicliptera chinensis*. **Plant Science**, Limerick, v.163, p.543-554, 2002.

