

# **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 O<sub>2</sub>

- **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 glutathiona 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode difundir livremente e penetrar membranas, os peroxissomos são importantes na destruição dos radicais livres

**catalase**



# 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 neutralizar a 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





# 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<sub>2</sub>

- O oxigênio pode aceitar um elétron vindo do transporte de elétrons fotossintético ao nível da ferredoxina ou através dos herbicidas bipyridilium para formar um ânion superóxido

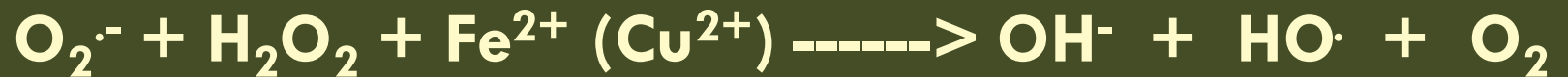


- Superóxido pode agir como um oxidante ou como um redutor; se ele reage com um outro anion superóxido, ele irá reduzir o segundo superóxido e forma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



# 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

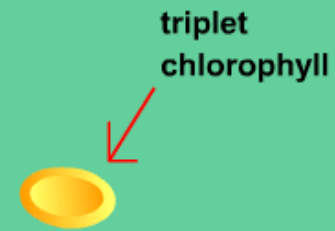
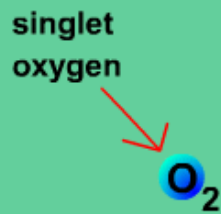
- **Radicais peroxi de lipídeos insaturados começam uma nova cadeia de reação de peroxidação**
- **Eventualmente com a clivagem da cadeia de hidrocarboneto e Produção de cadeia curta de alcanos como etano, pentano e malondialdeídos**
- **A peroxidação pode também ocorrer com proteínas, ácidos nucleicos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

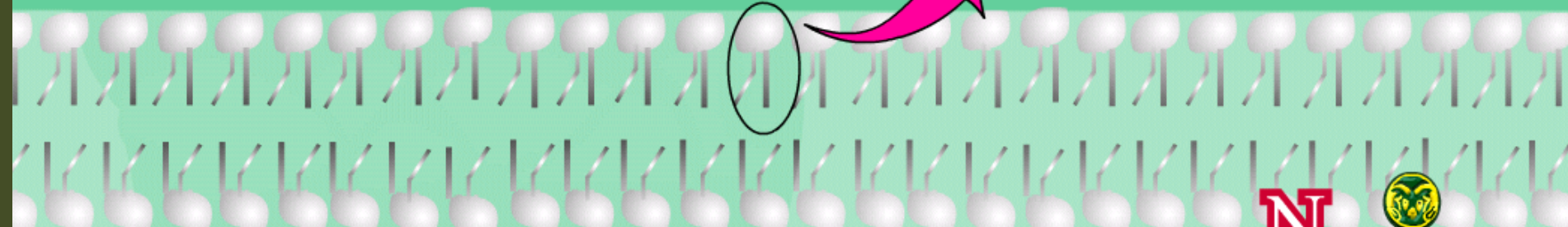
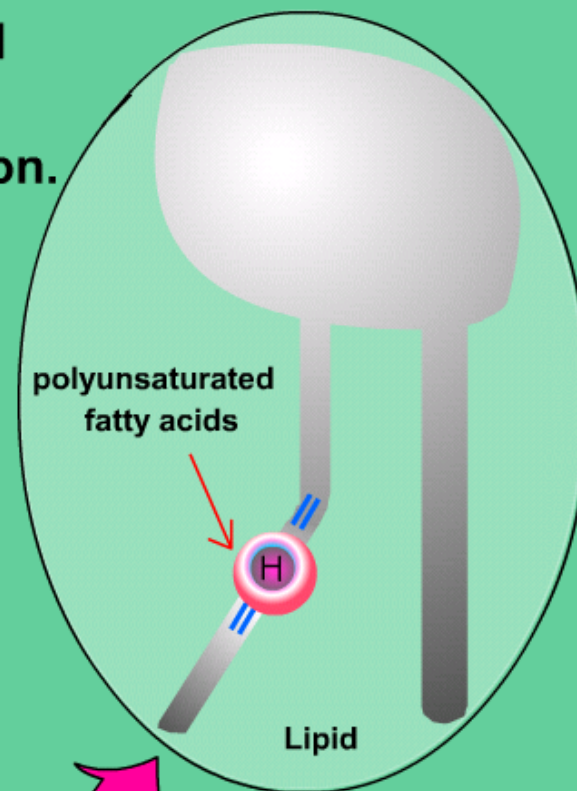


Lipid





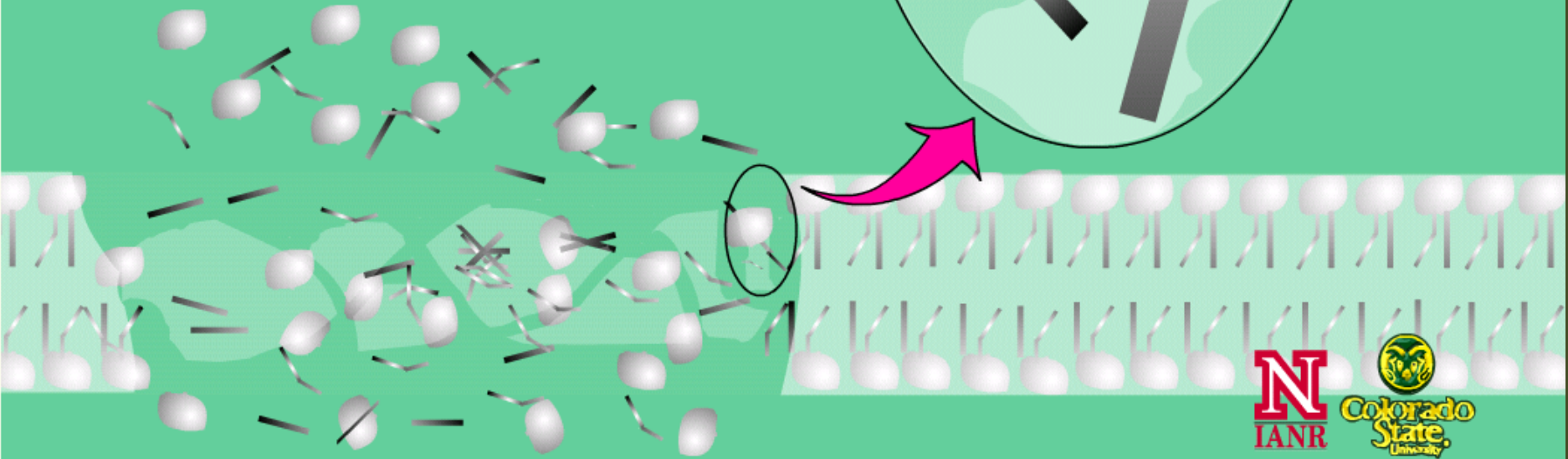
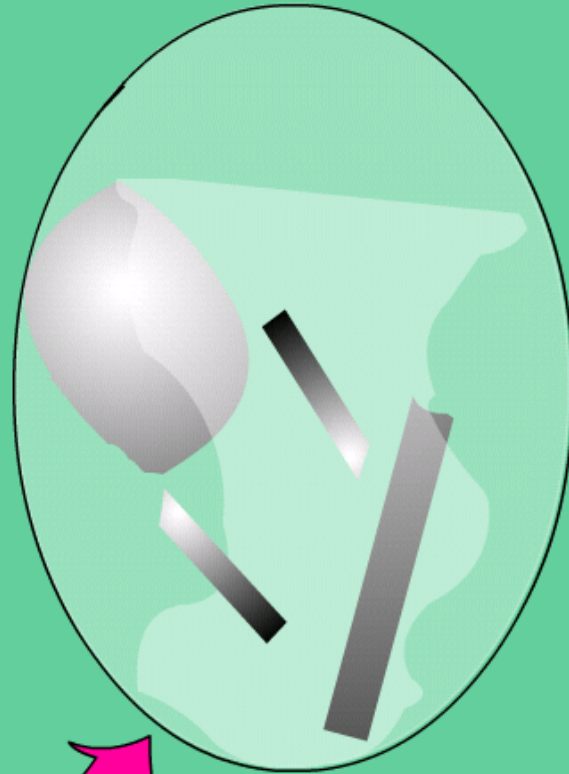
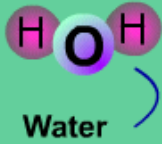
The reactive molecule is able to remove hydrogen from the lipid initiating a series of reactions leading to membrane destruction.



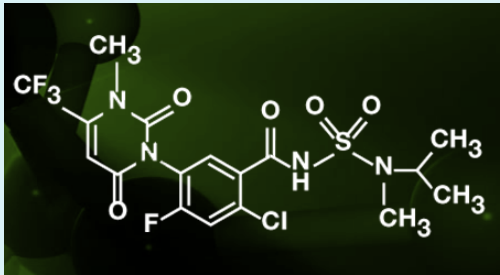
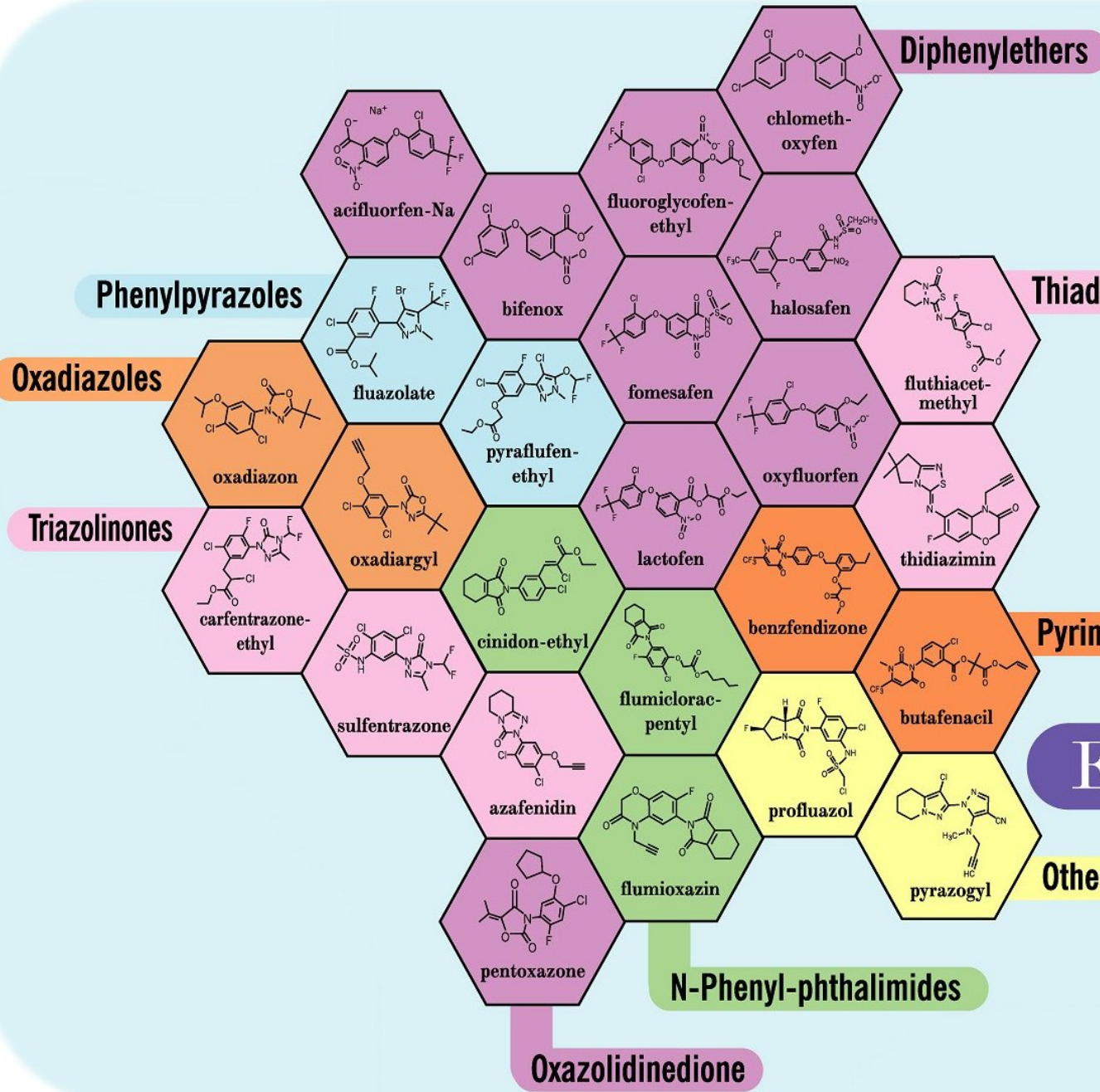


close window

start over



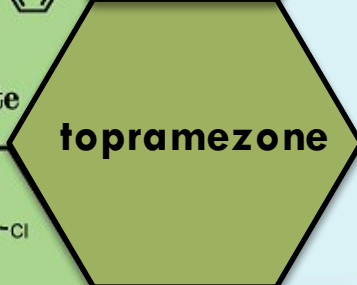
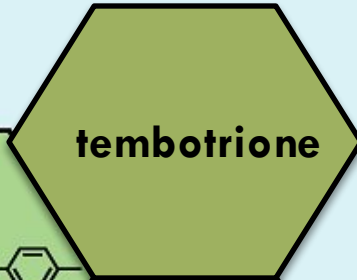
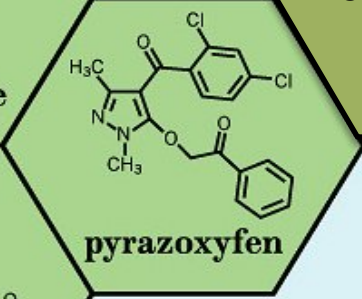
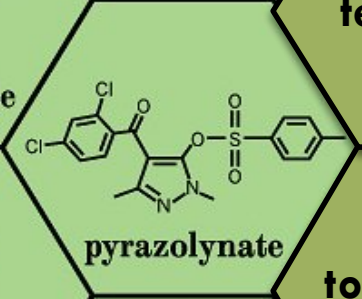
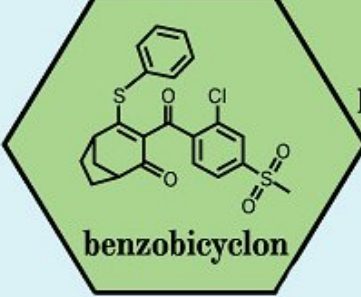
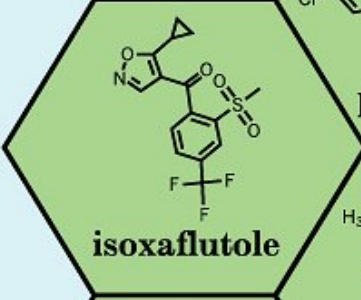
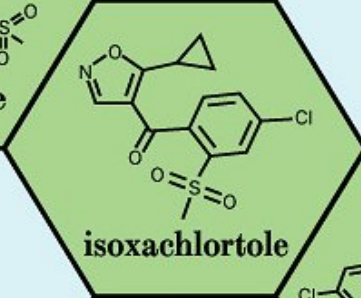
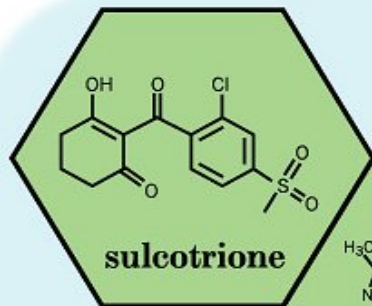




**saflufenacil**

**E** Inh. of proto-porphyrinogen oxidase

# A number of new herbicides developed for corn are HPPD inhibitors



**F<sub>2</sub>** Inh. of 4-HPPD

# Aspectos básicos do mecanismo de ação dos inibidores da HPPD

- Entre a fitoeno e licopeno existem 3 passos de desaturações intermediado pela fitoeno desaturase (PDS)
- A plastoquinona é um importante cofator da PDS
- Estes herbicidas inibem a enzima p-HidroxiPhenil Piruvate Dioxigenase (HPPD) que é critic para a Produção de plastoquinona
- Perda dos pigmentos secundários e branqueamento



# HPPD Inhibitors Injury



# Casos conhecidos de resistência ao HPPD

Família	Espécies	Herbicidas	Anor/Local
Amaranthaceae	<i>Amaranthus tuberculatus</i>	mesotrione tembotrione topramezone	2009/USA

\*\*\* Biótipos de *Amaranthus tuberculatus* têm resistência múltipla a inibidores da ALS, FSII e HPPD

# Histórico de uso de inibidores da HPPD na área com *A. tuberculatus*


Ano	Cultura	Aplicações de herbicidas (Pós)
2003	Sementes de milho	mesotrione + atrazine
2004	Sementes de milho	mesotrione + atrazine
2005	Sementes de milho	mesotrione + atrazine
2006	Sementes de milho	topramezone + atrazine
2007	Sementes de milho	topramezone + atrazine
2008	Sementes de milho	topramezone seguido mesotrione
2009	Sementes de milho	topramezone seguido mesotrione

**Mesotrione 420 g ha<sup>-1</sup>**  
**14 DAT**

06.22.2010 14:38

103



A photograph of a field with green plants, likely a cornfield, with a wooden marker in the foreground. The marker has the number '108' written on it. The plants are dense and green, with some larger leaves visible in the foreground. The background shows more of the field under bright sunlight.

**atrazine 3360 g ha<sup>-1</sup>**  
**40 DAT**

06.16.2010 10:34

# Evolução inicial em casa de vegetação de *A. tuberculatus* resistente a HPPD

Mesotrione 105 g ha<sup>-1</sup>



**atrazine  
resistente**



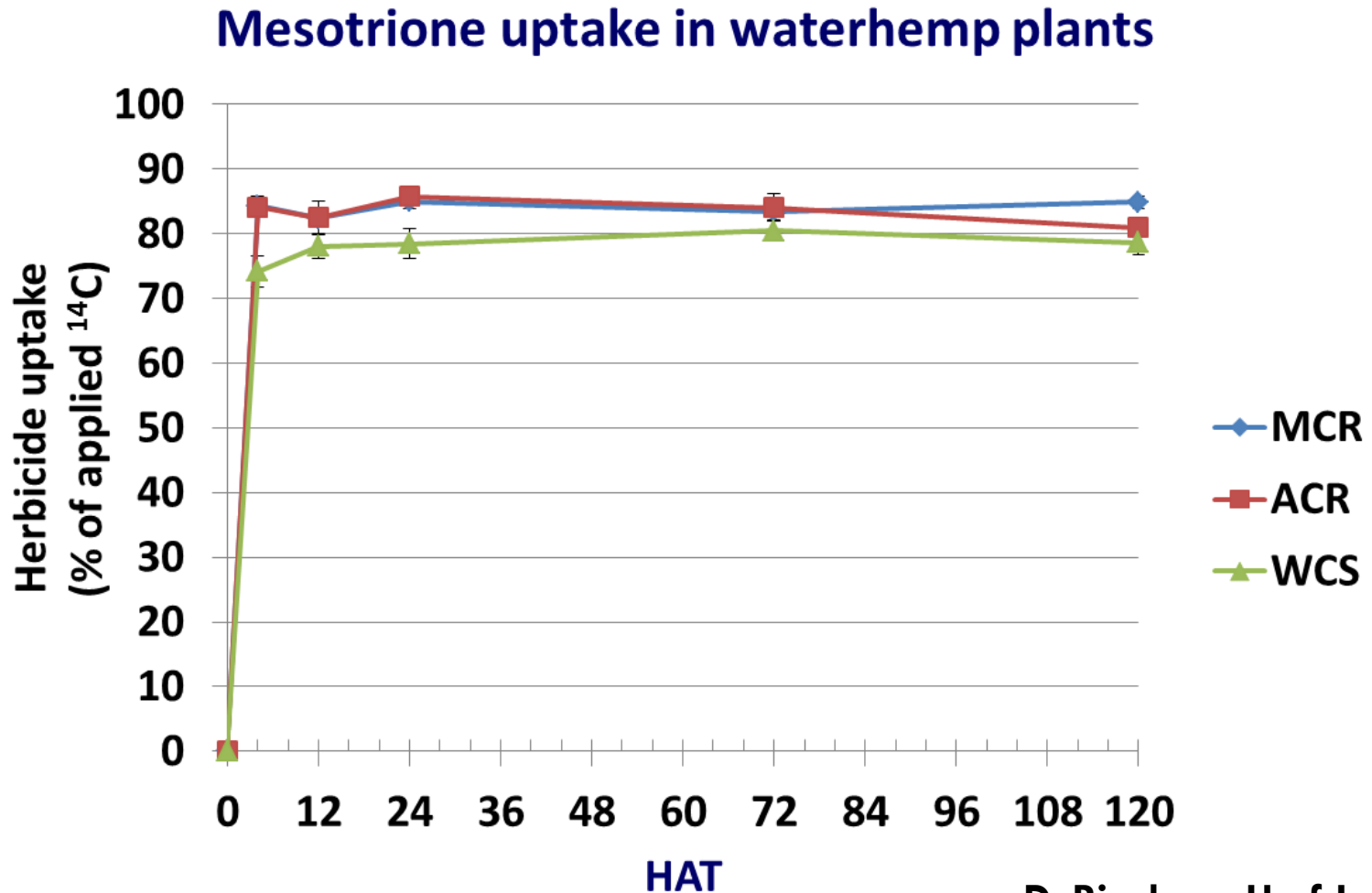
**suscetível**



**mesotrione resistente**

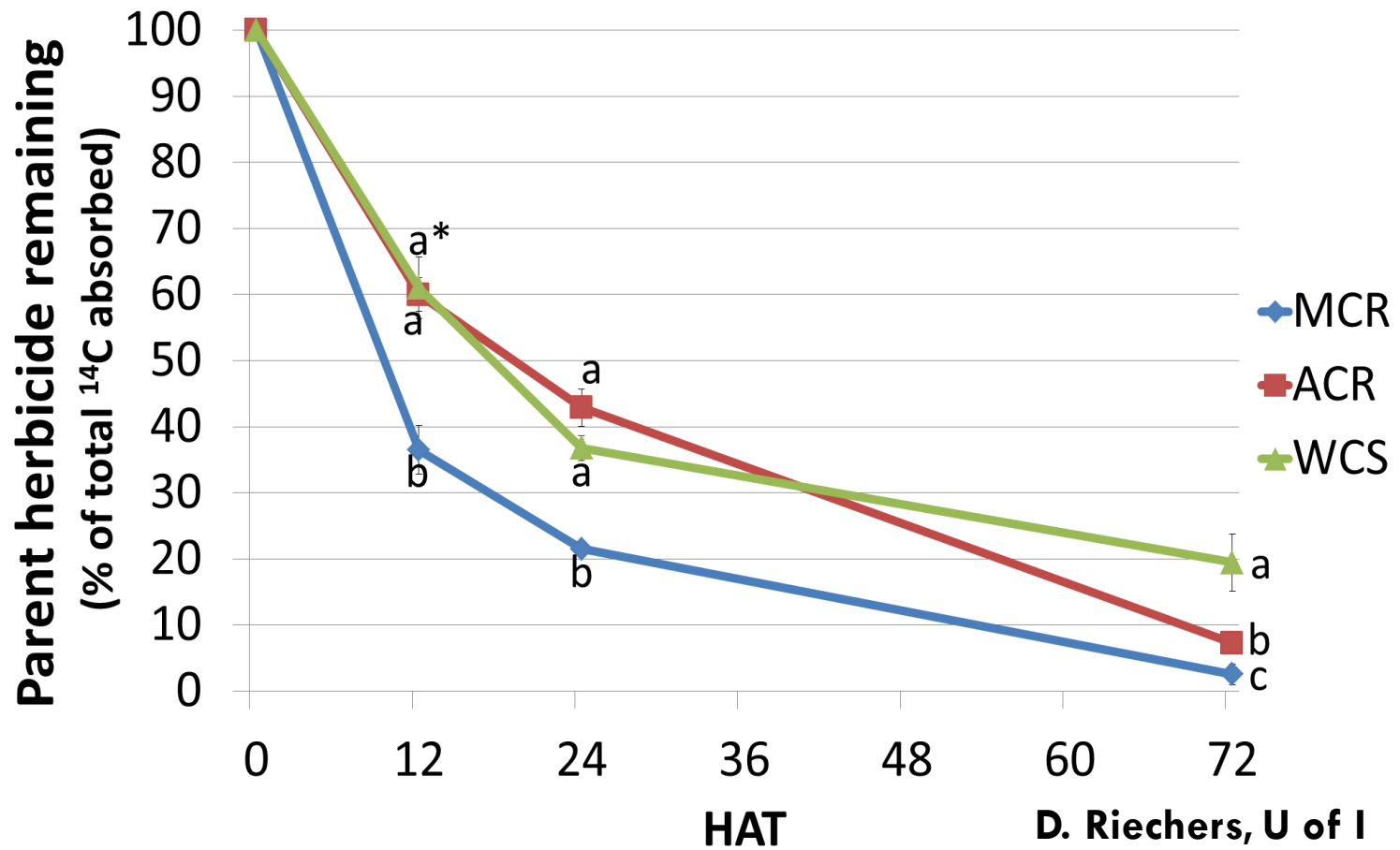


# Absorção de mesotrione por *A. tuberculatus*

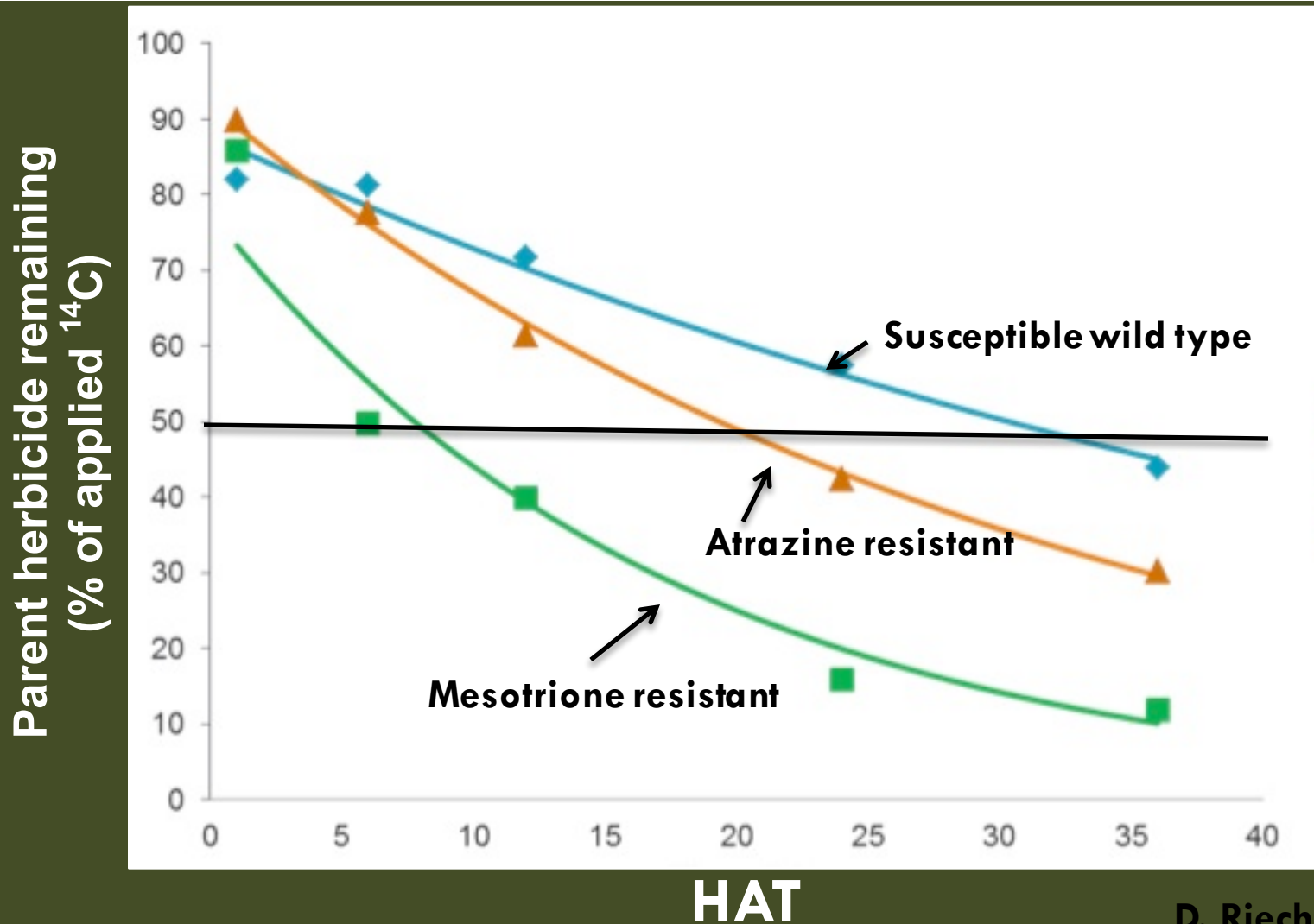


D. Riechers, U of I

# Metabolismo a nível de planta de mesotrione em *A. tuberculatus*



# Metabolismo de mesotrione em folhas isoladas de *A. tuberculatus*

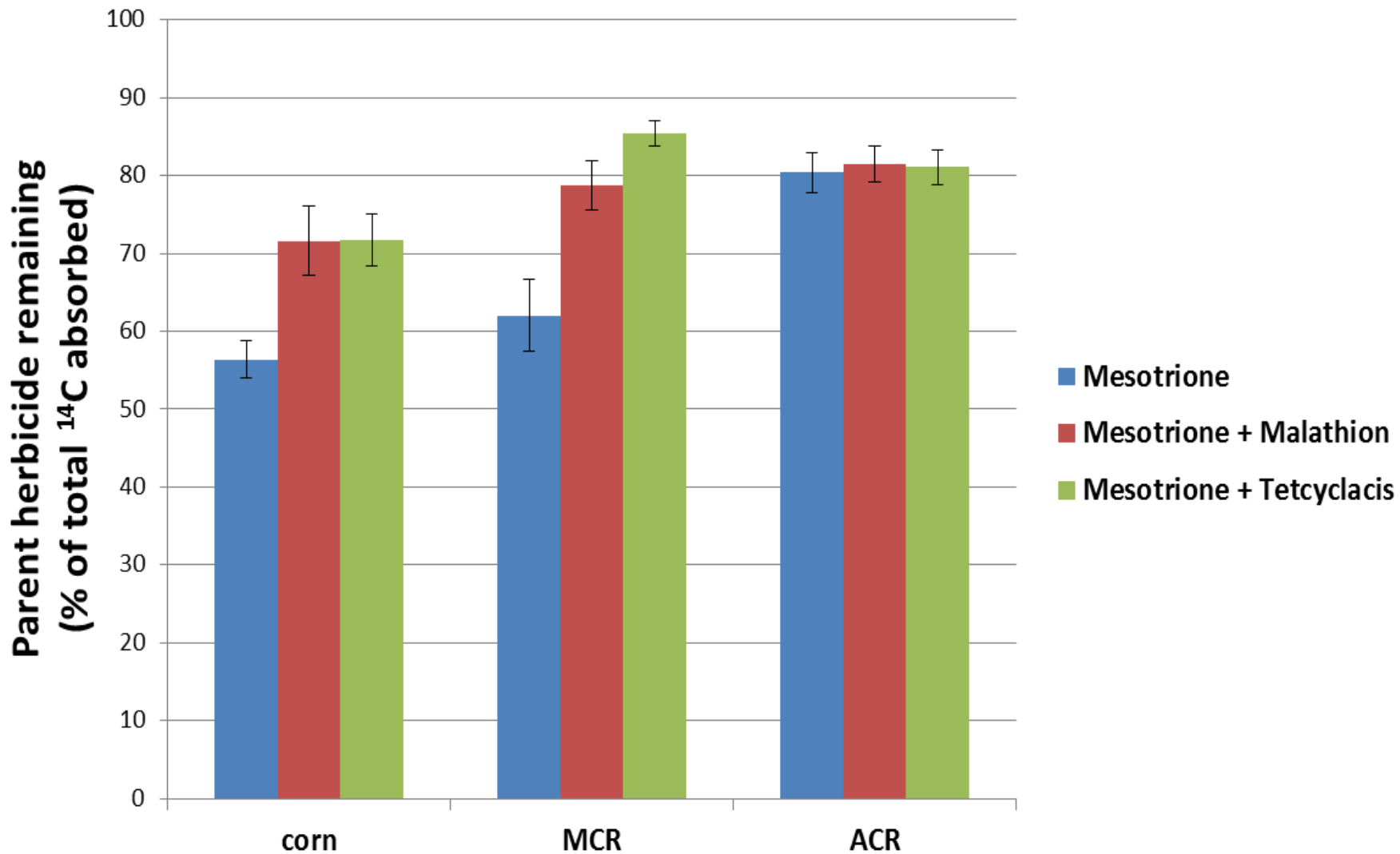


# Meia via calculada de mesotrione em folhas isoladas de *A. tuberculatus*

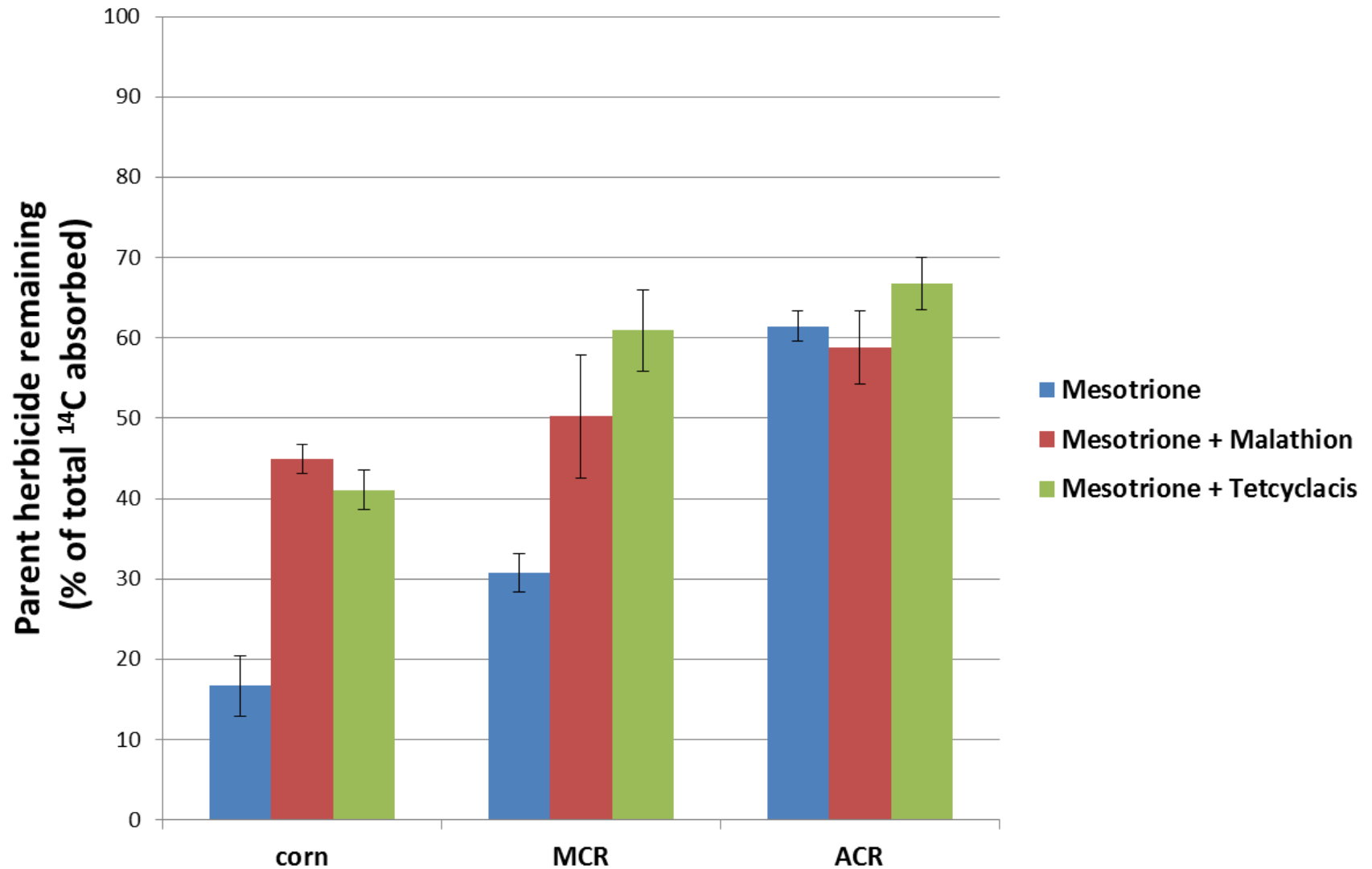
	Milho	Mesotrione Resistente	Atrazine Resistente	Suscetível
Meia-vida (horas)	11,4	14,6a	28,4b	46,2c

D. Riechers, U of I

## Mesotrione metabolism with and without P450 inhibitors in excised leaves – 6 HAT



## Mesotrione metabolism with and without P450 inhibitors in excised leaves - 24 HAT





# Sumário – *A. tuberculatus* resistente ao HPPD

- ❑ **A absorção de mesotrione foi semelhante em todos os biótipos**
- ❑ **O metabolismo do mesotrione foi maior nos biótipos resistentes baseado tanto no método de plantas inteiras quanto no método de folhas isoladas**
- ❑ **Inibidores do citocromo P450 (malathion e tetcyclacis) reduziram o metabolismo do mesotrione milho e biótipos resistentes**
- ❑ **Esses dados indicam que incremento no metabolismo poderia ser o responsável pela resistência do mesotrione**

# 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

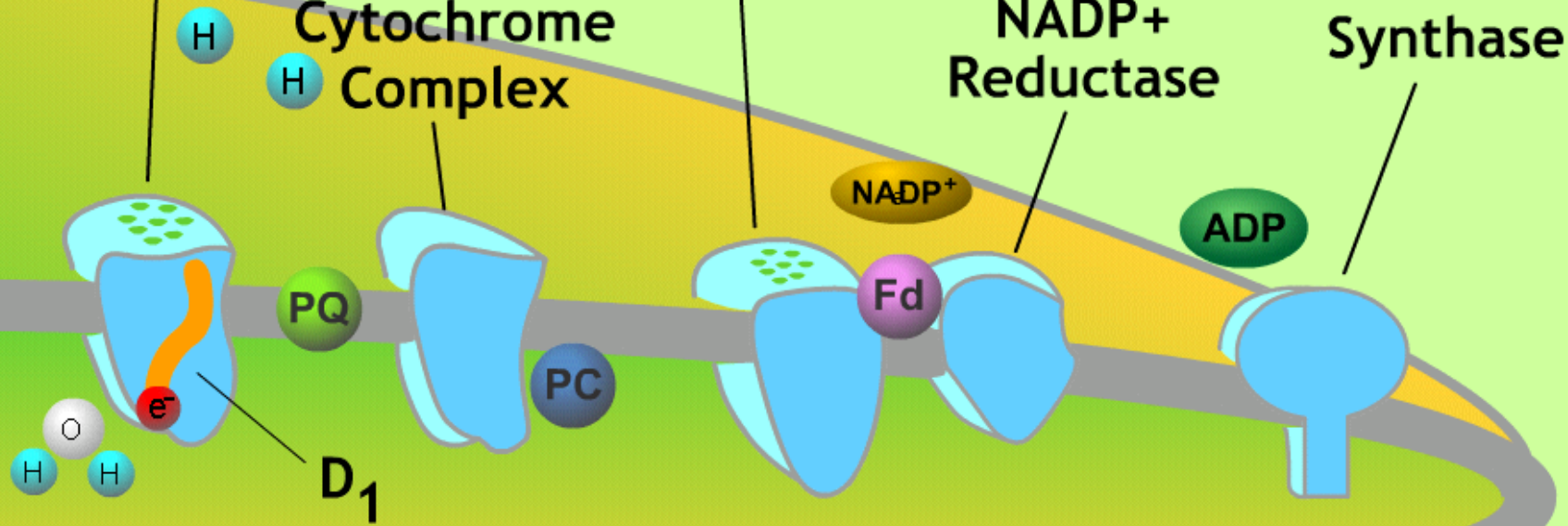
Photosystem 2  
(P-680)

Photosystem 1  
(P-700)

Cytochrome  
Complex

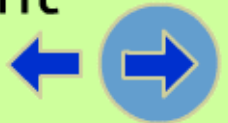
NADP+  
Reductase

ATP  
Synthase



Thylakoid  
Membrane

Embedded within the thylakoid membranes, we find a network of protein structures. Take a moment to familiarize yourself with the protein names.



# 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  $Q^A$  para o  $Q^B$
- ❑ 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  $\text{O}_2$ .
  - $\text{PQ} + \text{e}^- \longrightarrow \text{PQ}^\cdot$
  - $\text{PQ}^\cdot + \text{O}_2 \longrightarrow \text{PQ} + \text{O}_2^{\cdot-}$
- 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<sub>2</sub> 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.**

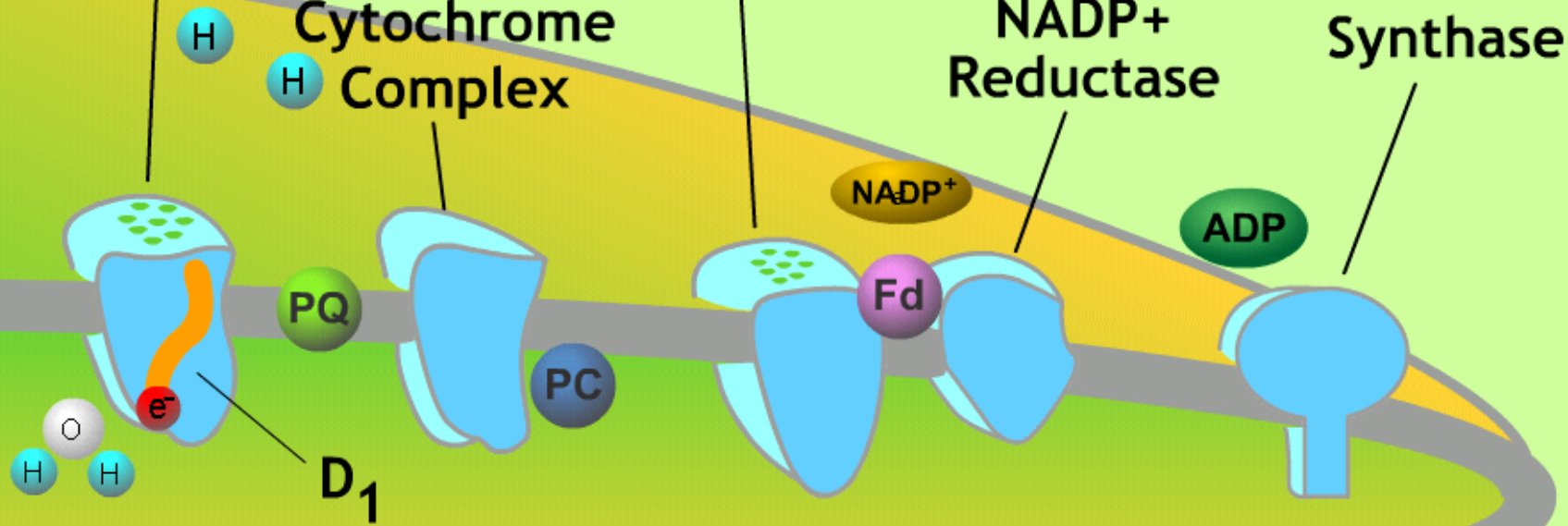
Photosystem 2  
(P-680)

Photosystem 1  
(P-700)

Cytochrome  
Complex

NADP+  
Reductase

ATP  
Synthase



Thylakoid  
Membrane

Embedded within the thylakoid membranes, we find a network of protein structures. Take a moment to familiarize yourself with the protein names.

