

ROGÉRIO MARCHIOSI

**EFEITOS METABÓLICOS NAS RAÍZES DE SOJA,
SUSCEPTÍVEL E RESISTENTE AO GLIFOSATO,
APÓS EXPOSIÇÃO DAS SEMENTES AO HERBICIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

MARINGÁ
Abril – 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ROGÉRIO MARCHIOSI

**EFEITOS METABÓLICOS NAS RAÍZES DE SOJA,
SUSCEPTÍVEL E RESISTENTE AO GLIFOSATO,
APÓS EXPOSIÇÃO DAS SEMENTES AO HERBICIDA**

Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho
Orientador

MARINGÁ
Abril – 2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M316e Marchiosi, Rogério
Efeitos metabólicos nas raízes de soja, susceptível e resistente ao glifosato, após exposição das sementes ao herbicida / Rogério Marchiosi. -- Maringá : [s.n.], 2008.
63 f. : il. color., figs.

Orientador : Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular), 2008.

1. Chiquimato. 2. Chiquimato desidrogenase. 3. Herbicida glifosato. 4. Soja resistente ao glifosato. 5. Soja não resistente ao glifosato. 6. Diferenciação de soja transgênica e convencional. 7. Bioquímica vegetal. 8. Metabolismo secundário. 9. Marcador bioquímico. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. II. Título.

CDD 21.ed. 632.954

BIOGRAFIA

Rogério Marchiosi nasceu em São Paulo/SP em 18/06/1983. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (2005). Tem experiência na área de Biologia Celular e Bioquímica, atuando, principalmente, nos seguintes temas relacionados à soja convencional e transgênica: Estresse salino e lignificação, Metabolismo de ácidos fenólicos sob ação do glifosato, Acúmulo de chiquimato em resposta ao glifosato e Chiquimato como marcador bioquímico para diferenciar soja convencional da transgênica. Iniciou o Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) em 2006, na Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS pela oportunidade de realização deste trabalho, e pelo constante auxílio nas horas de dificuldade.

A minha esposa Mila pela presença e carinho em todos os instantes.

Aos meus pais, Natanael Batista Marchiosi e Gladislene Todon Marchiosi pelo apoio, amizade e incentivo.

Aos meus familiares que sempre acreditaram em mim.

Aos meus orientadores pela paciência que tiveram comigo e por tudo que me ensinaram.

Aos meus companheiros de laboratório: Cidinha, Flausina, Anderson, Rita, Gisele, Franciele, Paulo, Daniele, Rogério, Grisiely, Edicléia, Ana Paula, Victor Hugo, Aline Finger e Natália.

As minhas amigas Adriana e Regina pela boa amizade e auxílio em todos os momentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa que me foi concedida.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais.
A minha irmã.
Aos meus familiares.
À minha fiel companheira, Mila.

O professor desceu em seu roupão, como sempre, para o desjejum, mas ele mal tocou em qualquer coisa. Eu pensei que alguma coisa estava errada, e perguntei-lhe o que o preocupava. “Querida”, ele disse, “tive uma idéia maravilhosa”. E depois de tomar seu café, ele foi até o piano e começou a tocar. De quando em vez ele parava, fazia algumas anotações e depois repetia, “Tive uma maravilhosa idéia, uma magnífica idéia!”.

Sra. Einstein

APRESENTAÇÃO

Esta Dissertação é composta de uma Revisão Bibliográfica e de um Artigo científico que trata dos efeitos de glifosato nas raízes de soja convencional e geneticamente modificada, tolerante a este herbicida, enfocando os aspectos relacionados com as vias do chiquimato e dos fenilpropanóides. O artigo foi redigido de acordo com as normas da revista *Pesticide Biochemistry and Physiology*.

Rogério Marchiosi, Maria de Lourdes Lucio Ferrarese, Edicléia Aparecida Bonini and Osvaldo Ferrarese-Filho. Metabolic changes in susceptible and glyphosate-resistant soybean roots exposed to glyphosate (*a ser submetido*)

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS – O Glifosato [(*N*-fosfometil)glicina], um herbicida altamente eficaz e de amplo espectro, tem um único modo de ação nas plantas, sendo essencialmente ativo em praticamente todas as plantas anuais e perenes. Ele age pela inibição específica da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) sintase, que catalisa um passo essencial na via biossintética dos aminoácidos aromáticos. A EPSP sintase catalisa a reação entre chiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato para produzir 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) e fosfato inorgânico. EPSP é um precursor para a formação de corismato, a molécula base para biossíntese de todos aminoácidos aromáticos. Desta forma, a inibição da EPSP sintase reduz a biossíntese dos aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina), que leva a vários distúrbios metabólicos, incluindo diminuição da síntese protéica, inibição da formação de compostos secundários e desregulação da via do chiquimato. Quando o glifosato inibe a EPSP sintase, chiquimato, o substrato desfosforilado da enzima, acumula-se em folhas, flores e raízes. O acúmulo de chiquimato e de alguns derivados de benzoato tem sido considerado como efeito primário do glifosato nas plantas suscetíveis.

A desregulação da via do chiquimato pode ser acompanhada por um distúrbio metabólico geral que inclui a via dos fenilpropanóides, outra importante rota metabólica, devido a sua participação na síntese de compostos fenólicos e uma ampla variedade de produtos secundários, incluindo lignina. Devido ao fato de o glifosato ser um herbicida de amplo espectro, ele não discrimina espécies cultivadas de plantas indesejáveis. Isto limita o seu uso em certas aplicações na agricultura, o que tem estimulado a busca por culturas resistentes a ele. A soja (*Glycine max* L. Merrill) resistente ao glifosato (GR), comercialmente conhecida como soja Roundup[®] Ready, não é afetada pelo herbicida devido a expressão de uma EPSP sintase glifosato resistente que possui alta atividade catalítica na presença do glifosato. A expressão da EPSP sintase, glifosato resistente, mantém os níveis normais dos aminoácidos aromáticos na soja GR, quando submetida ao herbicida. Isto também previne os distúrbios metabólicos causados pela inibição da via do chiquimato. Com base nisso, os objetivos do presente trabalho foram os de avaliar os efeitos do glifosato nas vias do chiquimato (acúmulo de chiquimato e atividade da chiquimato desidrogenase) e dos fenilpropanóides (atividade da fenilalanina amônia liase e conteúdos de compostos fenólicos e lignina) de raízes de soja susceptível e resistente ao glifosato.

MÉTODOS – Semente de soja [*Glycine max* L. Merr. cv. BRS-133 – suscetível – e BRS-245RR – GR – (Embrapa Soja, Brasil)] (200 cada) foram imersas em 300 mL de solução de glifosato 0,1, 0,2, 1,0, 2,0 e 5,0 mM, e água (controle), durante 4 horas. Em seguida as sementes foram germinadas no escuro (a 25°C), em câmara de germinação por três dias. Após a germinação os efeitos do glifosato no crescimento das raízes, atividades enzimáticas e teores de chiquimato, compostos fenólicos e lignina foram avaliados. A atividade da chiquimato desidrogenase (SDH) e teores de lignina foram determinados espectrofotometricamente. A atividade da fenilalanina amônia liase (PAL), chiquimato, ácidos hidroxibenzóicos (protocatecúico, *p*-hidroxibenzóico e vanílico) e ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico, *p*-cumárico, caféico e sinápico) foram determinados por cromatografia líquida da alta eficiência (CLAE). Os dados foram expressos como a média de 4 experimentos independentes \pm S.E. Recorrendo à análise de variância (ANOVA), as diferenças significativas entre as variáveis foram avaliadas pelo teste Scott-Knott (1974), sendo $P \leq 0,05$ foram considerados como sendo estatisticamente diferentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO – Os resultados mostraram que **1)** a média total dos comprimentos das raízes de soja suscetível foram 33,2% a 51,9% menores que o controle, após tratamentos com 0,1 a 5 mM de glifosato, respectivamente. Ao contrário, o glifosato não afetou o crescimento da soja GR – resultado esperado devido ao fato de esta cultivar ser tolerante ao herbicida. **2)** o glifosato aumentou significativamente o conteúdo de chiquimato de 27,8 para 48,7 vezes nos tratamentos com 0,1 a 5,0 mM de glifosato, nas raízes de soja suscetível. Por outro lado, nenhum acúmulo de chiquimato foi detectada nas raízes de soja GR, em resposta ao glifosato. **3)** o herbicida aumentou a atividade da SDH em 57,9%, independentemente da concentração de glifosato, nas raízes de soja suscetível, quando comparado com as condições controles. Entretanto, o glifosato não apresentou efeito na atividade da SDH de raízes de soja GR após exposição ao glifosato 0,1 a 5 mM. **4)** a 1 mM, o herbicida aumentou em 26,2% a atividade da PAL em raízes de soja suscetível, mas não afetou a atividade enzimática em soja GR. **5)** os ácidos *p*-hidroxibenzóico e vanílico foram detectados em raízes de soja suscetível expostas a 1 mM de glifosato, enquanto que nenhuma alteração foi observada em outros derivados de benzóico e cinâmico. **6)** o conteúdo de lignina aumentou em 21% após exposição de raízes de soja suscetível a 1 mM de glifosato, mas nenhuma mudança foi causada pelo herbicida na cultivar resistente ao glifosato.

Existem relatos indicando efeitos do glifosato na via do chiquimato, a maioria especificamente no acúmulo de chiquimato em diferentes tecidos e em muitas culturas diferentes tais como tomate, canola, cevada, algodão, trigo, arroz, girassol e milho. Isto também tem sido observado em tecidos (folhas, meristema apical e nódulos) de plantas de soja suscetível ao glifosato, expostas a diferentes concentrações. Mas poucos resultados ainda estão disponíveis para estudos realizados com raízes de soja susceptíveis ao glifosato expostas a este herbicida. O rápido acúmulo de chiquimato encontrada aqui representa significativa falha do controle da via por *feedback*, resultando em um dreno de energia e diminuição do crescimento das raízes. Com a inibição da EPSP sintase pelo glifosato e, decorrente do acúmulo de chiquimato, aumento da atividade da SDH tem sido também observado em raízes de soja suscetível. Este fato indica que o metabólito chiquimato tem sido reversivelmente convertido a dehidrochiquimato, pela ação da SDH. Com relação aos efeitos na via dos fenilpropanóides, os resultados revelaram aumento significativo da atividade da PAL, nas raízes de soja suscetível. A princípio, este resultado poderia ser considerado discrepante devido ao bloqueio da síntese dos aminoácidos aromáticos. Todavia, a atividade da PAL se encontra aumentada nas respostas de resistência, relacionadas aos mecanismos de defesa estrutural, e esta indução pode ser uma resposta ao estresse causado pelo glifosato. Considerando a possibilidade de que a inibição da EPSP sintase tenha sido incompleta, a PAL pode converter fenilalanina eventualmente presente nos tecidos formando cinamato e seus derivados. Neste aspecto, a quantificação de compostos fenólicos revelou que ferulato, *p*-cumarato, cafeato e sinapato não foram detectados, enquanto *p*-hidroxibenzoato a vanilato aumentaram nas raízes de soja suscetível, expostas ao glifosato. O aumento nos níveis de derivados de benzoato tais como protocatecuato, galato, vanilato e *p*-hidroxibenzoato têm sido encontrado em folhas de soja em resposta ao glifosato. Estes resultados são interpretados como uma consequência da inibição da EPSP sintase conduzindo a um acúmulo de chiquimato em altos níveis e, também, dos derivados de benzoato. Adicionalmente, nós propomos neste trabalho que os derivados de benzoato tais como vanilato e *p*-hidroxibenzoato podem ser formados a partir dos derivados de cinâmico. Se esta hipótese for verdadeira, isto pode explicar porque a produção de lignina diminuiu nas raízes de soja suscetível, expostas ao glifosato.

CONCLUSÕES – Os resultados indicam efeitos marcantes do glifosato nas vias do chiquimato (acúmulo de chiquimato e elevada atividade da SDH) e dos fenilpropanóides (aumento na atividade da PAL e derivados de benzoato seguido pela redução na produção de lignina) nas raízes de soja suscetível. Perturbações nesta via levam a produção de *p*-hidroxibenzoato e vanilato pela provável conversão de chiquimato e/ou cinamato nestes derivados de benzoato. Devido à alta expressão da EPSP sintase, as raízes de soja resistente ao glifosato não foram afetadas pelo herbicida, confirmando a resistência desta cultivar.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION AND AIMS – Glyphosate [(*N*-phosphonomethyl) glycine], a highly effective broad-spectrum herbicide, has a unique mode of action on plants and it is active on practically all annual and perennial plants. Glyphosate specifically inhibits the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase), which catalyzes an essential step in the aromatic amino acid biosynthetic pathway. EPSP synthase catalyzes the reaction of shikimate-3-phosphate and phosphoenolpyruvate to yield 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) and inorganic phosphate. EPSP is a precursor to chorismate formation, the base molecule for all aromatic amino acid formation. Then, the inhibition of EPSP synthase reduces the biosynthesis of aromatic amino acids (tryptophan, tyrosine and phenylalanine), which leads to several metabolic disturbances, including the arrest of protein production and prevention of secondary product formation and deregulation of the shikimate pathway. When glyphosate inhibits EPSP synthase, shikimate, the dephosphorylated substrate of the enzyme, accumulates in leaves, flowers and roots. Accumulation of shikimate and of some benzoate derivatives is assumed to be a primary effect of glyphosate on susceptible plant species.

The deregulation of the shikimate pathway may be accompanied by a general metabolic disruption which includes the phenylpropanoid pathway, another important metabolic route, due to its synthesis of phenolic compounds and to a wide range of secondary plant products, including lignin. Since glyphosate is a broad-spectrum herbicide, it does not discriminate between crops and weed species. This limits its use in certain agricultural applications and has stimulated the search for glyphosate-resistant crops. Glyphosate-resistant (GR) soybean (*Glycine max* L. Merrill), commercially known as Roundup[®] Ready soybean, remains unaffected when treated with the herbicide because of the expression of a glyphosate-resistant EPSP synthase with a high catalytic activity in the presence of glyphosate. Expression of the glyphosate-resistant EPSP synthase helps to maintain normal aromatic amino acids levels in herbicide-treated GR soybean. It also prevents the general metabolic disruption caused by inhibition of the shikimate pathway. Current research evaluates the effects of glyphosate on shikimate pathway (shikimate accumulation and shikimate dehydrogenase activity) and phenylpropanoid pathway (phenylalanine ammonia lyase activity, phenolic and lignin contents) of susceptible and glyphosate-resistant soybean roots.

AIMS – Soybean [*Glycine max* L. Merr. cv. BRS-133 – susceptible – and BRS-245RR – GR – (Embrapa Soja, Brazil)] seeds (200 each) were immersed either in 300 ml of 0.1, 0.2, 1.0, 2.0 to 5.0 mM glyphosate solutions or in water (control) for 4 h. After this short immersion period, the seeds were dark-germinated (at 25°C) in a growth chamber for three days. Effects of glyphosate on root length, enzymatic activities, shikimate, phenolic compounds and lignin contents were then evaluated. Shikimate dehydrogenase (SDH) activity and lignin content were determined spectrophotometrically. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity, shikimate, hydroxybenzoic (protocatechuic, *p*-hydroxybenzoic and vanillic) and hydroxycinnamic (ferulic, *p*-coumaric, caffeic and sinapic) acids were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Data are expressed as means of four independent experiments \pm S.E. Whereas variance (ANOVA) tested the significance of the observed differences, the difference between parameters was evaluated by Scott-Knott (1974) test, and *P* values \leq 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION – Results showed that **1)** the mean total root lengths of susceptible soybean were 33.2% to 51.9% less than controls for 0.1 to 5 mM treatments, respectively. By contrast, glyphosate did not affect the root growth of GR soybean – an expected result because this cultivar tolerates the herbicide; **2)** the glyphosate significantly increased the shikimate content from 27.8 to 48.7-fold, after 0.1 to 5 mM glyphosate treatments, in susceptible soybean roots. On the other hand, no accumulation of shikimate was detected in GR soybean roots in response to glyphosate; **3)** the herbicide increased SDH activity around 60% regardless of glyphosate concentrations, in susceptible soybean roots, when compared to control conditions. However, glyphosate was ineffective on SDH activities of GR soybean roots after 0.1 to 5 mM exposures; **4)** at 1 mM, the herbicide increased by 26.2 % the PAL activity in susceptible soybean roots, but it did not affect the enzymatic activity in glyphosate-resistant soybean; **5)** The *p*-hydroxybenzoic and vanillic acids were detected in susceptible soybean roots exposed to 1 mM glyphosate, while no change was noted in other benzoate and cinnamate derivatives; **6)** the lignin content increased by about 21% after 1 mM glyphosate exposure of susceptible soybean roots, but it was not changed by herbicide in the glyphosate-resistant cultivar.

Some reports indicate the effects of glyphosate on shikimate pathway, more specifically on shikimate accumulation in different tissues of many agricultural crops,

such as tomato, canola, barley, cotton, wheat, rice, sunflower and corn. This has also been observed in tissues (leaves, apical meristem and nodules) of susceptible soybean plants submitted to glyphosate, at different concentrations. In roots of susceptible soybean seeds, as reported in this work, the results are scarce. The rapid accumulation of shikimate noted herein represents a significant loss of feedback control of the pathway, resulting in less energy and decrease in root growth. With glyphosate inhibition of the EPSP synthase, and as a consequence of shikimate accumulation, increase of SDH activity was also observed in susceptible soybean roots. This finding indicates that the accumulated metabolite shikimate has been reversibly converted to dehydroshikimate by SDH action in the pathway. In the case of the effects of phenylpropanoid pathway, results reveal significant increase of PAL activity in susceptible soybean roots. This result might be considered conflicting, at least in principle, due to the blockage of aromatic amino acids production. However, PAL activity commonly increases in resistance responses of plants pertaining to structural defense mechanisms, and its induction may be a response to glyphosate stress. Considering the possibility that the inhibition of EPSP synthase has been incomplete, PAL might convert phenylalanine eventually present in tissues forming cinnamate and its derivatives. In this way, quantification of compounds phenolics revealed that ferulate, *p*-coumarate, caffeate and sinapate were not detected, while *p*-hydroxybenzoate and vanillate increased in susceptible soybean seeds treated with glyphosate. Increase in the levels of benzoate derivatives, such as protocatechuate, gallate, vanillate and *p*-hydroxybenzoate, has been noted in soybean leaves in response to glyphosate. These results have been interpreted as a consequence of EPSP synthase inhibition leading to the accumulation of high levels of shikimate and, further, benzoate derivatives. In addition, it may be postulated that benzoates derivatives, such as vanillate and *p*-hydroxybenzoate, might be formed from cinnamate and its derivatives. If the above assumption is correct, it explains the reason lignin production has been reduced in susceptible soybean roots exposed to herbicide.

CONCLUSIONS – Current results indicate that markedly glyphosate affects the shikimate pathway (shikimate accumulation and enhanced SDH activity) and the phenylpropanoid pathway (increase in PAL activity and benzoate derivatives followed by reduced lignin production) in susceptible soybean roots. Disruption of these pathways leads to production of *p*-hydroxybenzoate and vanillate by a probable

conversion of shikimate and/or cinnamate or its derivatives. Due to the high expression of EPSP synthase, glyphosate-resistant soybean roots were not affected by herbicide, confirming the resistance of this cultivar.

REVISÃO DE LITERATURA

O herbicida glifosato

O termo “agrotóxico” foi primeiramente aplicado por A. Paschoal em 1975 (Francis Chaboussou, 2006). Entretanto, por volta do ano 7000 a.C. já se procedia à seleção de sementes de plantas mais resistentes às pragas agrícolas. Os estudos sobre o uso de defensivos agrícolas na agricultura iniciaram-se há pouco mais de 500 anos, sendo que o primeiro controle em larga escala com sucesso foi realizado na Europa, na década de 1840, contra o míldio, um fungo que ataca os brotos das videiras. O controle de plantas indesejáveis se faz muito importante porque estas podem diminuir a disponibilidade de nutrientes para as culturas limitando, desta forma, a fixação de nitrogênio (Núria de Maria, 2006). Em 1939, o entomologista suíço Paul Miller descobriu as propriedades inseticidas de um composto organoclorado, que passou a ser conhecido pela sigla DDT (Dicloro-difenil-tricloroetano). O uso deste composto químico teve grande repercussão no combate às doenças como o tifo, a malária e a febre amarela, durante a Segunda Guerra Mundial. Este fato marcou o início da indústria química moderna. Na década de 1940 foram introduzidos os herbicidas, para controlar as plantas invasoras que competiam com as espécies cultivadas por nutrientes, água e luz, resultando em redução do revolvimento do solo e, conseqüentemente, da erosão.

A Companhia Monsanto iniciou a produção de produtos químicos com atividade herbicida em 1952, continuando esta atividade até o momento atual. O glifosato [*N*-(fosfonometil) glicina] foi primeiramente preparado pela Monsanto, em meados de 1970. É um aminoácido branco, inodoro e cristalino de fórmula empírica $C_3H_8NO_5$ e massa molar de 169,08. A sua solubilidade na água, a 25°C, é de 1,157 peso % e, a 100°C, cerca de 6% (Franz et al., 1997). É um herbicida amplamente utilizado na agricultura para o controle de plantas indesejáveis (Franz et al., 1997; Galli e Montezuma, 2005). Ele é essencialmente não tóxico para mamíferos e pássaros, embora peixes e invertebrados sejam sensíveis (Yong Chen et al., 2007). Várias pesquisas mostram que ele pode ser degradado por microrganismos e plantas para produzir ácido aminometilfosfônico (AMPA) e sarcosina, os quais podem se degradar, na água, até dióxido de carbono e fosfato, embora uma lenta degradação do AMPA tenha sido relatada em alguns casos (Talbot et al., 1984). A degradação abiótica é também uma

importante via de dissipação do glifosato no ambiente. Por outro lado, não ocorre a sua foto-degradação direta (Rueppel et al., 1977).

Dentre os processos biológicos que determinam a persistência dos herbicidas no solo, a degradação microbiana constitui o de maior importância (Araújo, 2002). Os microrganismos são os principais responsáveis pela degradação do glifosato no solo (Rueppel et al., 1977). A taxa de decomposição é inicialmente rápida, seguida por prolongada e lenta decomposição (Moshier e Penner, 1978). Quando o produto entra em contato com a microbiota do solo, este é rapidamente inativado (Tortensson e Hamissepp, 1977) podendo ser mineralizado, produzindo água, dióxido de carbono e fosfato (Forlani, 1999).

Segundo Liu et al. (1991), existem duas vias principais de degradação microbiana do glifosato: a primeira envolve a clivagem da molécula produzindo o ácido aminometilfosfônico (AMPA); e a segunda é pela clivagem da ligação C-P do composto, por ação da enzima C-P liase, produzindo sarcosina (Fig. 1). Para Bollag e Liu (1990) e Rao et al. (1993), uma vez exposta às comunidades microbianas do solo, as moléculas de glifosato estariam sujeitas a cinco possibilidades de transformação ou inativação: a) biodegradação em que a molécula poderia servir como substrato de crescimento e energia; b) co-metabolismo, em que o herbicida é transformado por reações metabólicas, mas não serviria como fonte de energia aos microrganismos; c) polimerização ou conjugação, em que a molécula, ou seu intermediário, seria conjugado a compostos presentes, naturalmente, no solo; d) acumulação, em que a molécula seria incorporada e acumulada dentro do microrganismo e e) efeitos secundários da atividade microbiana, em que o herbicida é transformado devido a mudanças no pH, reações redox e produtos reativos, entre outros, proporcionado pelos microrganismos.

Os herbicidas, quando aplicados por muito tempo, têm sua degradação mais acelerada em relação ao produto aplicado pela primeira vez, pois os microrganismos estão mais adaptados à sua presença e pelo fato destes organismos também possuírem enzimas específicas à sua degradação (Araújo, 2002).

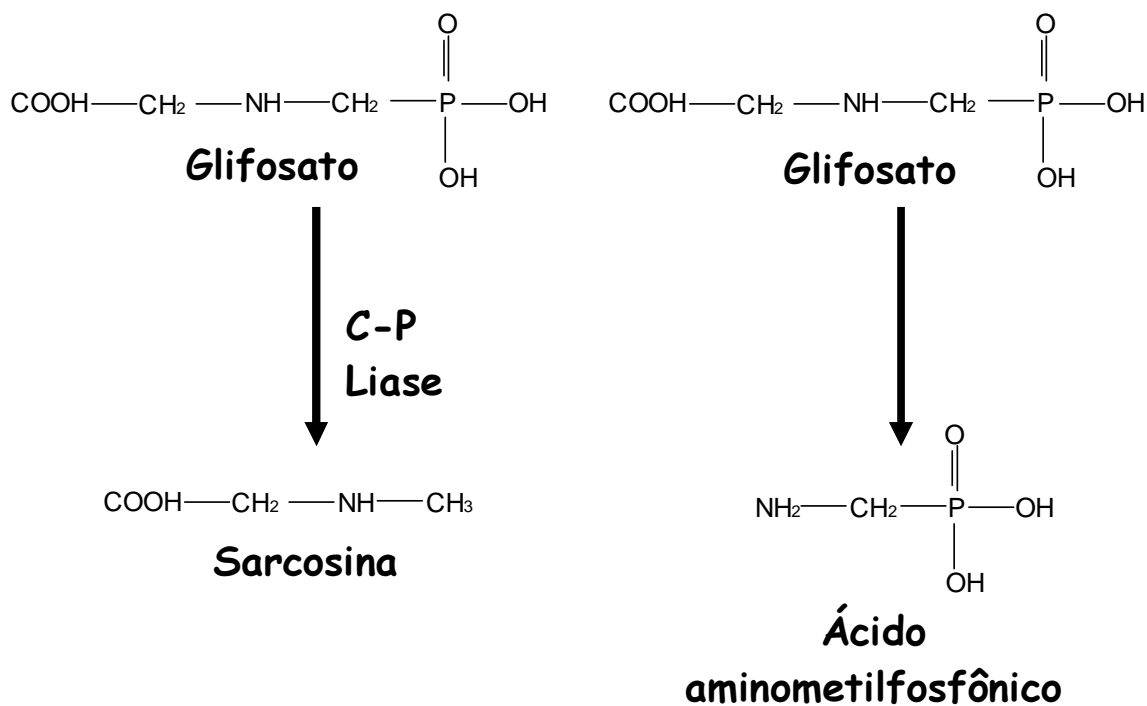


Fig. 1. Principais produtos de degradação do glifosato no solo.

Mecanismo de ação do glifosato

O glifosato foi um dos primeiros herbicidas, comercialmente relevante, em que se caracterizou a ação sobre uma única enzima, não existente em animais. Seu mecanismo de ação é bem definido já que inibe especificamente a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase, EC. 2.5.1.19), que catalisa a condensação do chiquimato-3-fosfato com fosfoenolpiruvato (Steinrucken e Amrhein, 1980). Esta etapa está inserida na via do chiquimato, que precede a via biossintética dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) e derivados como ácido indol-3-acético (AIA), vitaminas E, K e ácido fólico, ubiquinonas, antocianinas, fitoalexinas, flavonóides, fenilpropanóides e lignina (Fig. 2).

O glifosato causa inibição competitiva em relação ao fosfoenolpiruvato (PEP) e incompetitiva em relação ao chiquimato 3-fosfato (S3P), indicando a formação do complexo ternário EPSPsintase-S3P-glifosato. A formação deste complexo é um processo de equilíbrio de modo que o acúmulo do S3P, provocado pela obstrução da via, propicia a formação do complexo binário EPSPsintase-S3P, que é a forma preferencial para a ligação do glifosato, aumentando a velocidade de associação em cerca de 80.000 vezes (Franz et al., 1997).

A via do chiquimato

Esta via metabólica foi descoberta como uma rota biossintética para a síntese dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) através do estudo clássico de Bernhard Davis e David Sprinson e seus colaboradores (Hermann, 1995). A via do chiquimato consiste de uma seqüência de sete passos metabólicos que terminam com a produção de corismato, um precursor biossintético para vários compostos aromáticos. A organização das sete enzimas é marcadamente diferente nos três reinos onde elas estão presentes (reinos Fungi, Monera e Plantae). Na maioria dos procariotos, os sete passos são realizados por enzimas multifuncionais. Em fungos, os passos 2-6 são catalisados por um complexo multifuncional AROM e, em plantas, a enzima bifuncional diidroquinato desidratase-chiquimato desidrogenase catalisa os terceiro e quarto passos da via (Singh et al., 2006). Devido ao fato dos três aminoácidos aromáticos encontrados nas proteínas serem sintetizados pela via do chiquimato, esta foi assumida como sendo uma via comum de síntese para os compostos aromáticos (Herrmann, 1983). Bentley (1990) considera esta informação incorreta, pois nem todos os compostos aromáticos são originados por esta seqüência metabólica. Entretanto, a importância desta via é demonstrada pelo fato de que, em condições normais de crescimento, 20% do carbono fixado pelas plantas fluem por ela (Haslam, 1993).

A soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), espécie de grande importância econômica, tem como centro de origem o continente asiático, mais precisamente a região correspondente à China Antiga. Há referências bibliográficas, segundo as quais, essa leguminosa constituía-se em base alimentar do povo chinês há mais de 5.000 anos. No entanto, diversos pesquisadores que estudaram a sua origem, histórico e difusão geográfica, concordam ao afirmarem que a mais antiga referência à soja consta do herbário PEN TS' AO KANG MU como parte da obra "MATÉRIA MÉDICA" de autoria do Imperador SHEN NUNG, escrita em 2838 a.C. Nessa obra, foram descritas as plantas mais importantes para os chineses. Dentre elas, o arroz, o trigo, a cevada, o milho e a soja eram considerados "os cinco grãos sagrados", por serem essenciais à estabilidade da civilização chinesa (Bonato & Bonato, 1987).

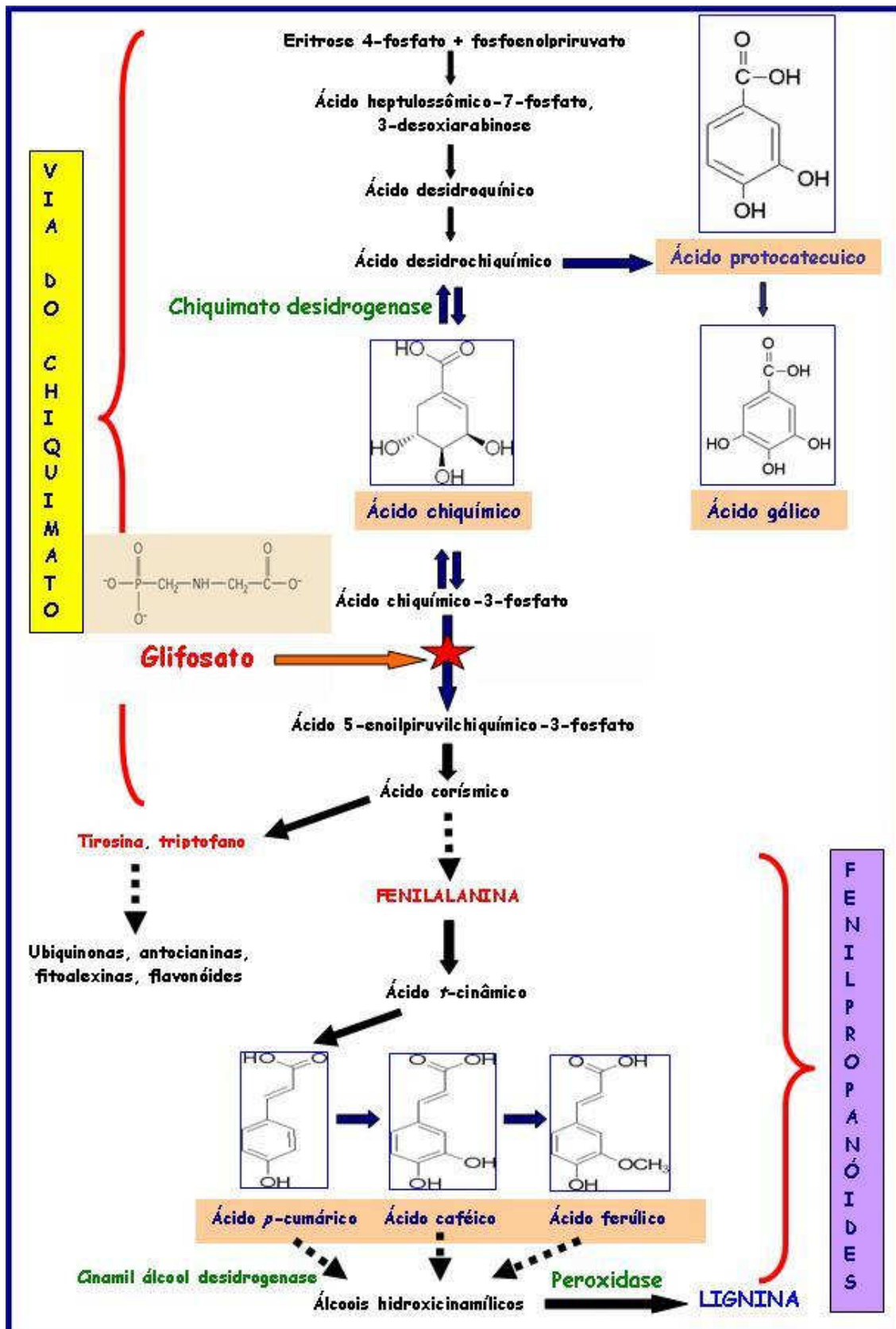


Fig. 1. Vias do ácido chiquímico e dos fenilpropanóides e a ação do glifosato nas plantas. A inibição da EPSP sintase pelo glifosato resulta no acúmulo dos ácidos hidroxibenzóicos (chiquímico, protocatecuico e gálico) e dos aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina.

Durante séculos a soja permaneceu circunscrita ao Oriente, pois inexistia o intercâmbio com as civilizações ocidentais. Hymowitz (1970) considerou que a soja foi domesticada, durante o século XI a.C., na China. Para esse autor, a região central da China constituía-se no centro primário de origem genética da soja, com a espécie ancestral *Glycine soja* que, por mutações, originou a espécie *Glycine max*, que acompanhou a migração nômade por volta de 2000 a.C. em direção a região Leste da China, antiga Manchúria, referenciada como o centro secundário de origem genética da soja.

Atualmente a soja é uma cultura de destaque na agricultura mundial. Em 2007, o Brasil foi o segundo maior produtor mundial de soja, com produção de 58,4 milhões de toneladas, sendo a área ocupada pela cultura de 20,687 milhões de hectares. Os Estados Unidos, maior produtor mundial do grão, responderam pela produção de 86,77 milhões de toneladas de soja. A produtividade média da soja brasileira é de 2823 kg por hectares, chegando a alcançar cerca de 3000 kg/ha no estado de Mato Grosso, o maior produtor brasileiro de soja (Embrapa Soja, 2007). No Paraná, a produção foi de 11,820 milhões de toneladas. Além disso, é notório o esforço concentrado pela agricultura moderna na busca de aumento da produtividade utilizando cultivares com características de interesse para o agricultor como a tolerância às doenças, insetos e herbicidas, obtidas através do melhoramento genético. Este ganho de qualidade é repassado aos agricultores por meio de sementes, insumo básico e necessário à maioria das espécies de interesse agrícola (Menezes, 2001).

A soja geneticamente modificada, tolerante ao glifosato

Algumas das características citadas anteriormente têm sido alcançadas por meio de tecnologia do DNA recombinante. É o caso da soja RR (*Roundup[®]-resistant*), tolerante ao glifosato. A soja RR da Monsanto foi a primeira planta geneticamente modificada (ou conhecida como transgênica) a ser aprovada para alimentação humana e animal (Kleba, 1998). A base da resistência ao glifosato na soja é a inserção do gene CP4-EPSPS, clonado da *Agrobacterium sp*, linhagem CP4, em seu genoma (Padgett et al., 1995; Harrison et al., 1996). Então, a soja geneticamente modificada codifica uma variante da EPSP sintase que possui baixa afinidade ao glifosato conferindo, a ela, tolerância a este herbicida (Fig. 3). A expressão do gene para a enzima EPSPS, que torna a planta tolerante ao glifosato, é uma estratégia para manter os níveis de síntese

dos aminoácidos aromáticos na soja resistente tratada com glifosato. Isto, aparentemente, também previne os distúrbios metabólicos causados pela inibição da via do chiquimato (Duke et al., 2003). Algumas cultivares, tolerantes ao glifosato, têm sido comercializadas desde meados de 1990 (Duke et al., 2002). Embora a soja geneticamente modificada seja tolerante ao glifosato, a aplicação deste herbicida pode resultar em injúrias, sob certas condições e formulações (Reddy et al., 2004).

Segundo Trigo (2003), na Argentina, 95% da soja plantada é geneticamente modificada, tolerante ao glifosato. Trata-se do maior percentual de uma cultura geneticamente modificada, em um único país. A explicação da alta percentagem está em vários fatores. O primeiro, é que a soja tolerante ao glifosato possibilita importante redução nos custos de produção da lavoura (entre US\$ 20 e US\$ 25 por hectare). O segundo aspecto é a sinergia entre essas variedades e a aplicação de sistemas de plantio direto. Além disso, a combinação das duas tecnologias também permite o plantio de soja como segundo cultivo em muitas áreas onde antes esse tipo de atividade não era possível levando, assim, a uma expansão da área disponível para a agricultura. A principal crítica às culturas tolerantes aos herbicidas está relacionada ao aumento da pressão de seleção sobre as plantas indesejáveis. Existe grande probabilidade de selecionar um biótipo de planta resistente, ou uma espécie tolerante aos herbicidas, quando culturas resistentes forem utilizadas em monocultura, devido ao uso intensivo de um mesmo herbicida ou de herbicidas com o mesmo modo de ação (Kruse et al., 2000). Com relação ao glifosato, várias espécies de plantas indesejáveis têm sido relatadas como tolerantes tais como *Ambrosia artemisiifolia* (Kapusta et al., 1994), *Sesbania exaltata*, *Ipomoea spp.* (Jordan et al., 1997; Lich et al., 1997), *Apocynum cannabinum* e *Asclepias syriaca* (Wyrill e Burside, 1976), *Commelina benghalensis* e *Richardia brasiliensis* (Monquero, 2003), entre outras. Além disso, tem sido registrada a ocorrência de biótipos glifosato-resistentes em seis países, sendo de *Lolium multiflorum*, *Lolium rigidum*, *Eleusine indica*, *Conyza bonariensis*, *Conyza canadensis* e *Plantago lanceolata* (Shaner et al., 2005). No Brasil, foi constatada a seleção de biótipos de *Lolium multiflorum* tolerantes ao glifosato em áreas cultivadas com soja Roundup Ready, no Rio Grande do Sul.

A EPSP sintase é o único alvo do herbicida glifosato (Steinrücken e Amrhein, 1980). Enzimas de plantas possuem valores de K_i para o glifosato que são aproximadamente uma ordem de magnitude menor do que os valores para enzimas de bactérias. Esta inibição é competitiva com o fosfoenolpiruvato. Este intermediário

metabólito é substrato não somente da EPSP sintase, mas também para muitas outras enzimas do metabolismo, incluindo a primeira enzima da via do chiquimato. Entretanto, nenhuma das outras vias é inibida pelo glifosato. A tolerância ao glifosato em plantas tem sido obtida pela expressão de um alelo mutante que codifica uma EPSP sintase bacteriana menos sensível (Stalker et al., 1985) ou pela sua superprodução (Smart et al., 1985; Shah et al., 1986; Goldsbrough et al., 1990).

O alto grau de especificidade do glifosato pela EPSP sintase tem sido explicado pelo fato de o herbicida se ligar à proteína somente quando em proximidade com o chiquimato-3-fosfato (Christensen e Schaefer, 1993). Entretanto, o produto da catálise enzimática, o EPSP, também facilita a ligação do glifosato muito embora a orientação espacial entre este e a enzima, no complexo ternário com chiquimato-3-fosfato ou EPSP, seja desconhecido, parte do glifosato deve se ligar próximo, mas fora do sítio ativo (Sammons et al., 1995).

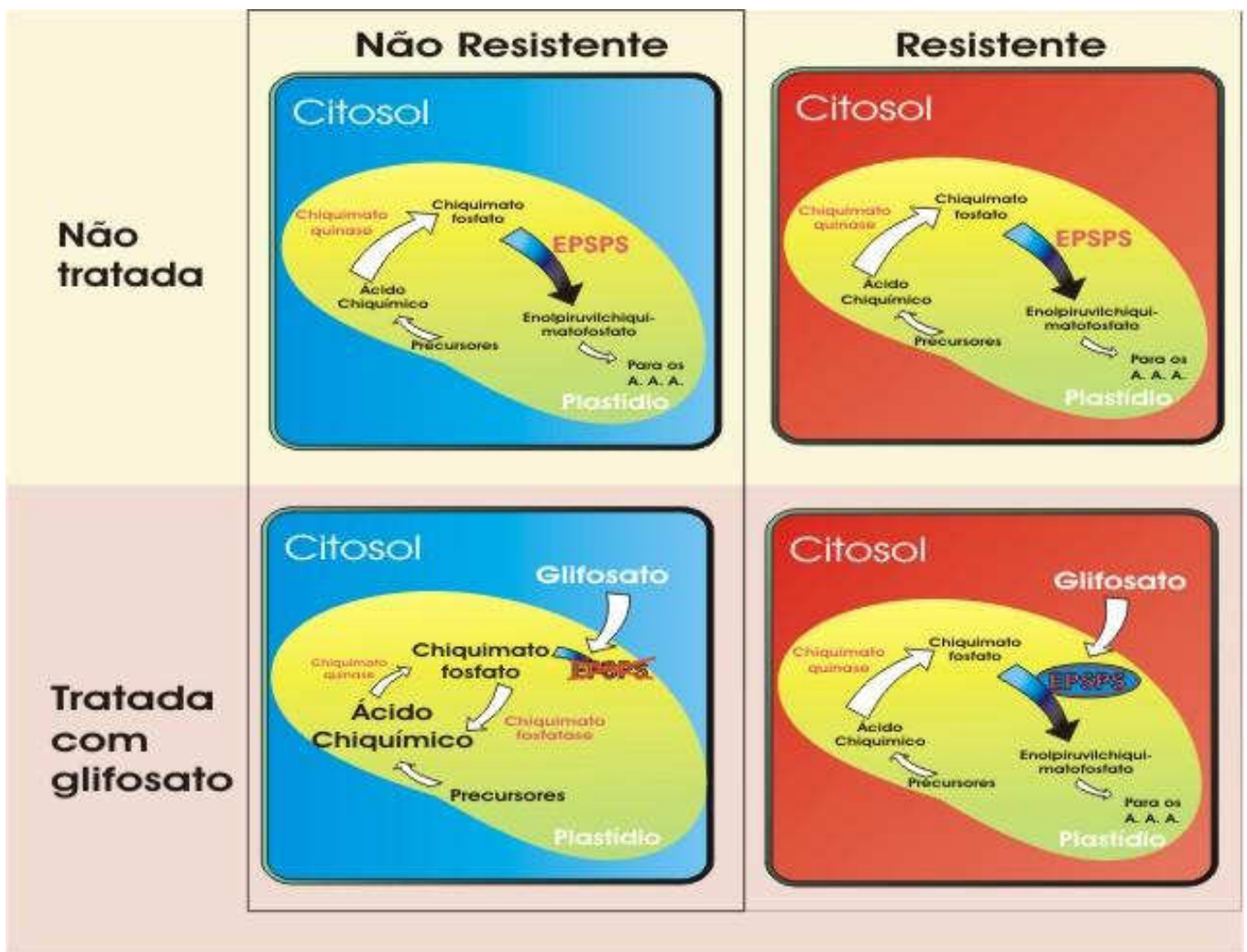


Fig 3. Ação do glifosato em plantas não-resistentes e resistentes (soja transgênica).

Pelo fato de se tratar de um herbicida não-seletivo, o glifosato pode afetar, também, as plantas cultivadas. Aspergido nas folhas, o glifosato possui ação sistêmica dentro da planta, sendo rapidamente translocado para as raízes (Duke, 1988). De fato, em plantas susceptíveis como a soja o glifosato não é significativamente metabolizado e, deste modo, tende a se acumular em regiões de alta atividade metabólica como os nódulos (Reddy e Zablotowicz, 2003) e os tecidos meristemáticos (Kremer et al., 2005). Translocado preferencialmente pelo floema, o glifosato se acumula nas raízes em concentrações de até 0,3 mM. Segundo Geiger e Bestman (1990) o glifosato é transportado pelo floema por uma via similar a da sacarose. Sua liberação para a rizosfera é lenta e, pelo fato de não se movimentar no solo devido à rápida e alta taxa de adsorção, sofre a ação de microrganismos que o converte em ácido aminometilfosfônico (AMPA), seu principal metabólito (Torstensson e Hamissepp, 1977; Franz et al., 1997; Araújo et al., 2003; Galli e Montezuma, 2005).

Efeitos metabólicos do glifosato

Alguns trabalhos têm relatado acúmulo de ácido chiquímico em plantas tratadas com glifosato. Singh e Shaner (1998) observaram que, na soja, o ácido chiquímico acumula após 24 horas da aplicação de uma dose sub-letal de glifosato; após 96 horas os níveis de glifosato foram menores do que aquele constatado com 24 horas. Haring et al. (1998) também relataram que o acúmulo de ácido chiquímico foi proporcional à concentração de glifosato. Buehring et al. (2007) relataram que, no milho, a exposição ao glifosato resultou em acúmulo de 297% dos teores de ácido chiquímico, 7 dias após a aplicação e de 489%, 5 dias após a aplicação, quando comparado com o controle.

Além das alterações causadas nos conteúdos de ácido chiquímico, a exposição ao glifosato afeta o metabolismo de ácidos fenólicos. Isso porque uma grande variedade de ácidos fenólicos é sintetizada a partir do produto da via do chiquimato, o corismato. Do ponto de vista estrutural, pode-se definir um composto fenólico como uma substância que possui um grupamento hidroxil ligado a um anel aromático. As plantas produzem diferentes grupos quimicamente heterogêneos destes compostos que, de acordo com sua diversidade química, desempenham inúmeras funções nas plantas. Diante do elevado número destes compostos, três grandes grupos foram estabelecidos: ácidos fenólicos, flavonóides e cumarinas. Nos últimos anos, os ácidos fenólicos simples, em especial os derivados de ácidos cinâmico e benzóico como os ácidos

clorogênico, *p*-cumárico, caféico, ferúlico, protocatecúico, *p*-hidroxibenzóico, gálico e salicílico têm sido estudados. Entre suas conhecidas atividades bioquímicas nas plantas, estão as ações antioxidantes, antifúngicas, associadas aos mecanismos de defesa, alelopatia e resistência. Além disso, os ácidos fenólicos são elementos indispensáveis nas estruturas anatômicas e morfológicas, das quais muitos constituem partes integrantes das estruturas da parede celular, principalmente em polímeros como lignina e suberinas (Strack, 1997). Elevados níveis de ácidos benzóicos derivados do ácido chiquímico tais como os ácidos protocatecúico e gálico têm sido encontrados em plantas após o tratamento com o glifosato (Becerril et al., 1989; Cañal et al., 1987; Lydon e Duke, 1988). Significantes quantidades de ácidos hidroxibenzóicos podem também acumular em algumas regiões da planta em resposta às altas concentrações de glifosato. Moorman et al., (1992) demonstraram acúmulo de ácidos hidroxibenzóicos em *Bradyrhizobium japonicum* em resposta à exposição ao glifosato. Presumivelmente, o bloqueio da EPSPS pelo glifosato causa a produção de ácido protocatecúico a partir dos ácidos chiquímico e desidrochiquímico. O ácido protocatecúico é o principal ácido hidroxibenzóico acumulado nas folhas de soja, e seus níveis aumentam após exposição ao glifosato (Hernandez et al., 1999). Segundo María et al. (2006), a inibição da EPSP sintase desregula a via do chiquimato, resultando em um descontrole no fluxo de carbono e subsequente acúmulo massivo de ácido chiquímico e ácidos hidroxibenzóicos em determinadas regiões da planta tais como folhas e nódulos.

Além disso, a introdução de cultivares resistentes ao glifosato pode ter importantes conseqüências para os microrganismos simbióticos associados com a soja. Como dito anteriormente, o glifosato é translocado prontamente para diversas regiões da planta (Honneeger et al., 1986) onde é acumulado, já que ele não é metabolizado pelas plantas. Em adição, os passos iniciais do processo de nodulação parecem envolver o reconhecimento, pelas bactérias, de compostos flavonóides produzidos pelas plantas e que são derivados da via do chiquimato. De fato, o glifosato pode alterar o crescimento de espécies de bactérias fixadoras do nitrogênio tais como *Azotobacter* sp. (Santos e Flores, 1995), *Rhizobium* (Moorman, 1986) e *Bradyrhizobium* (Moorman et al., 1992). Além disso, os ácidos chiquímico e protocatecúico podem inibir a atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) dos nódulos, diminuindo a produção de oxaloacetato e malato disponível para o metabolismo dos bacterióides, diminuindo assim a atividade da nitrogenase (María et al., 2006). Entretanto, o glifosato *per se*, induz apenas uma pequena inibição da atividade de redução do acetileno (ARA) de

bacterioides isolados de plantas de soja não tratadas, e incubadas diretamente com o herbicida (Hernández et al., 1999). Isto sugere que o efeito inibitório do glifosato sobre a nitrogenase, provavelmente, está relacionado com os distúrbios metabólicos ocasionados por ele.

Dentre as etapas metabólicas da via do ácido chiquímico, a quarta reação corresponde à redução, dependente de NADPH, do ácido desidrochiquímico formando o ácido chiquímico, catalisada pela enzima-chave chiquimato desidrogenase (EC 1.1.1.25) (Singh e Christendat, 2006). Reversivelmente, a oxidação NADP⁺-dependente do produto da reação, o ácido chiquímico, leva à formação de derivados do ácido benzóico, como os ácidos protocatecúico e gálico (Fig. 2). Nas plantas, a chiquimato desidrogenase responde aos diferentes estresses ambientais como o ataque de herbívoros, de microrganismos, concentração de íons no solo e a deficiência de nitrogênio (Diaz et al., 1997; 2001). Além disso, o chiquimato acumulado pela exposição ao glifosato pode ser usado como substrato por esta enzima podendo causar alterações em sua atividade. Este parâmetro, portanto, pode ser importante para desvendar as alterações metabólicas causadas pelo glifosato. Entretanto, pouco trabalho tem sido aplicado para determinar a atividade da chiquimato desidrogenase em plantas expostas ao glifosato.

A classe mais abundante de compostos fenólicos secundários em plantas é derivada da fenilalanina, por meio da ação da fenilalanina amônia liase (PAL), talvez a enzima mais estudada no metabolismo secundário das plantas. Ela está localizada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário, de forma que sua reação é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos. De um modo geral, o glifosato aumenta a atividade da PAL, seguido de aumentos nos teores de ácidos fenólicos na soja convencional (Hoagland, 1990). Segundo Cole et al., (1980), a promoção da atividade da PAL pode ocorrer devido a maior expressão gênica da enzima acarretada pela falta dos produtos finais da via dos fenilpropanóides. É importante destacar que não há relatos, até o momento, destes efeitos em soja transgênica.

Os fenilpropanóides são produtos naturais derivados da L-fenilalanina via deaminação pela PAL. Os exemplares mais simples, contendo apenas o esqueleto propanona, são os ácidos hidroxicinâmicos, tais como os ácidos sinápico, *p*-cumárico, caféico, ferúlico e os monolignóis, tais como coniferil álcool. Fenilpropanóides mais complexos são formados pela condensação de uma unidade fenilpropanona com uma

unidade derivada do acetato via malonil coenzima A; estes incluem os flavonóides, isoflavonóides, dentre outros (Dixon et al., 2002). A via de fenilpropanóides se notabiliza por permitir a diversificação de outras vias metabólicas que conduzem à síntese de diferentes derivados secundários, incluindo a lignina (Dixon et al., 2002; Boerjan et al., 2003). Neste contexto, é interessante pôr em destaque que, depois da celulose, o polímero mais abundante das paredes celulares é a lignina, sendo que sua incorporação na parede celular ocasiona rigidez estrutural e resistência dos tecidos das plantas (Polle et al., 1994). Isto se dá devido ao mecanismo de espessamento que diminui a extensibilidade da parede celular em decorrência da formação de pontes difenil entre polímeros da parede, por ação de peroxidases (Sánchez et al., 1996). A primeira reação da via é catalisada pela PAL, que converte L-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico. Este é o precursor imediato dos ácidos fenólicos, precursores da lignina. Estes precursores são relatados por Hahlbrock e Schell (1989) como sendo monômeros de álcoois cinâmílicos hidroxilados e metoxilados que são sintetizados em dois passos pela cinamil álcool-CoA redutase (CCR) e cinamil álcool desidrogenase (CAD). Esta última atua na síntese de álcoois cinâmílicos dos seus correspondentes cinamaldeídos e é considerada, por sua alta especificidade, como marcadora do processo de lignificação. Segundo Sharma (1986), o glifosato inibe a lignificação devido ao seu modo de ação, bloqueando a via do ácido chiquímico. Liu et al. (1997), em seus trabalhos com plântulas de feijão, encontraram que os teores de lignina aumentam com o tempo de desenvolvimento o que não ocorre em plantas tratadas com glifosato (100 µg por plântula). Deste modo, os efeitos tóxicos do glifosato podem ser atribuídos à (1) impossibilidade da planta de sintetizar os aminoácidos aromáticos e, possivelmente, os ácidos fenólicos e, mais adiante, a lignina; (2) um dreno de energia resultante de ATP e fosfoenolpiruvato gasto no acúmulo de ácido chiquímico, ácido heptulossômico-7-fosfato-3-desoxiarabinose e ácidos hidroxibenzóicos e (3) toxicidade dos intermediários acumulados na via do ácido chiquímico (Fisher et al., 1986).

Além do mais, dentre as inúmeras espécies de interesse econômico, a soja, tornou-se alvo da atenção dos cientistas no mundo por ter se tornado, nas últimas décadas, uma planta economicamente importante e com tendência para aumentar ainda mais esta importância no futuro. Portanto é de extrema importância à realização de maiores estudos a respeito da ação do glifosato sobre esta leguminosa.

Embora os dados relatados anteriormente sugiram que a soja transgênica não sofre alterações no seu rendimento em comparação com as cultivares convencionais,

outros estudos indicam que ela pode sofrer a ação fitotóxica do glifosato. Por exemplo, os efeitos do glifosato na nodulação de soja transgênica foram observados por Reddy et al. (2000) e King et al. (2001). Estes autores constataram que alguns parâmetros relacionados à nodulação, como o número e a biomassa de nódulos e os conteúdos de leghemoglobina e de nitrogênio total, foram reduzidos após aplicação de glifosato na soja transgênica. Aplicação de glifosato em soja transgênica tem causado injúrias, incluindo decréscimo nos conteúdos de clorofila (Reddy e Zablotowicz, 2003). Por outro lado, glifosato não tem significativo efeito nos teores de isoflavonas de soja transgênica (Duke et al., 2003).

Diante do que foi descrito até o momento, pode-se afirmar que estudos comparativos entre soja susceptível e glifosato-resistente são de considerada relevância, haja vista a necessidade de melhor compreensão dos distúrbios metabólicos causados pelo glifosato nas vias do chiquimato e dos fenilpropanóides dessa importante oleaginosa.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABARKELI, R.B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two brazilian soils. *Chemosphere*, v.52, p.799-804, 2003.
- ARAÚJO, A.S.F. Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solo. 2002. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba, SP, 2002.
- BECERRIL, J.M.; DUKE, S.O; LYDON, J. Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf. *Phytochemistry*, v.28, p.695–699, 1989.
- BENTLEY, R. The shikimate pathway-Ametabolic tree with many branches. *CRC Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology*, v.25, p.307-384, 1990.
- BOERJAN, W., RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, v.54, p.519-546, 2003.
- BOLLAG, J.M.; LIU, S.Y. Biological transformation processes of pesticides. In: CHENG, H.H. (ED.) *Pesticides in The Soil Environment: processes, impacts, and modeling*. Madison: Soil Science of American, p.169-211, 1990.
- BONATO, E.R., BONATO, A.L.V. A soja no Brasil: história e estatística. Londrina: EMBRAPA- CNPSo, 1987. 61p. (Documentos 21).
- BUEHRING, N.W.; MASSEY, J.H.; REYNOLDS, D.B. Shikimic acid accumulation in field-grown corn (*Zea mays*) following simulated glyphosate drift. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.819-824, 2007.
- CAÑAL, N.J.; TAMES, R.S.; FERNANDEZ, B. Effects of glyphophate on phenolic metabolism in yellow nutsedge leaves. *Physiologia Plantarum*, v.69, p.627-632, 1987.
- CHABOUSSOU, Francis. Plantas doentes pelo uso de agrotóxicos: a teoria da trofobiose. Tradução de Maria José Guazzelli. Porto Alegre: L & PM, 1997.

CHEN, Y; WU, F; LIN, Y; DENG, N; BAZHIN, N; GLEBOV, E. Photodegradation of glyphosate in the ferrioxalate system. *Journal of Hazardous Materials*, v.148, p.360-365. 2007.

CHRISTENSEN, A.M. and SCHAEFER, J. Solid-state NMR determination of intra and intermolecular ^{31}P - ^{13}C distances for shikimate 3-phosphate and [$1\text{-}^{13}\text{C}$]glyphosate bound to enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase. *Biochemistry*, v.32, p.2868-2873, 1993.

COLE, D.J.; DODGE, AD.; CASLEY, J.C. Some biochemical effects of glyphosate on plant meristems. *Journal of Experimental Botany*, v.31, p.1665-1674, 1980.

DÍAZ, J.; RÓS-BARCELÓ, A.; DE CACERES, F.M. Changes in shikimate dehydrogenase and the end products of the shikimate pathway, chlorogenic acid and lignins, during the early development of seedlings of *Capsicum annuum*, *New Phytologist*, v.136, p.183–188, 1997.

DÍAZ, J.; BERNAL, A.; POMAR, F.; MERINO, F. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification, *Plant Science*, v.161, p.179–188, 2001.

DIXON, R.A., ACHNINE, L., KOTA, P., LIU, C.J., SRINIVASA REDDY, M.S.; WANG, L. The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, v.3, p.371-390, 2002.

DUKE, S.O. Glyphosate. p. 1–70. In P.C. Kearney and D.D. Kaufman (ed.) *Herbicides: Chemistry, degradation, and mode of action*. V.3. Marcel Dekker, New York, 1988.

DUKE, S.O; SCHEFFLER, B.E.; DAYAN, F.E.; DYER, W.E. Genetic engineering crops for improved weed management traits. *American Chemist Society Symposium Series*, v.829, p.52-66, 2002.

DUKE, S.O; RIMANDO, A.G.; PACE, P.F.; REDDY, K.N.; SMEDA, R.J. Isoflavone, glyphosate and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, p.340-344, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16. Acesso em 6 dez. de 2007.

FISHER, R.S.; BERRY, A.; GAINES, C.G. JENSEN, R.A. Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in Eubacteria. *Journal of Bacteriology*, v.168, p.1147–1154, 1986.

FORLANI, G.; MANGIACALLI, A.; NIELSEN, E. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganism. *Soil Biology and Biochemistry*, v.31, n.7, p.991-997, 1999.

FRANZ, J.E.; MAO, M.K.; SIKORSKI, J.A. Glyphosate's molecular mode of action. In: *Glyphosate. A unique global herbicide*. American Chemical Society. Monograph 189, p.521-615, 1997.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, H.C. Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. ACADCOM Editora, 67p., 2005.

GOLDSBROUGH, P.B.; HATCH, E.M. HUANG, B.; KOSINSKY, W.G.; DYER, W.E.; HERRMANN, K.M.; WELLER, S.C. Gene amplification in glyphosate tolerant tobacco cells. *Plant Science*, v.72, p.53-62, 1990.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.40, p.347-369, 1989.

HARRING, T., STREIBIG, J.C.; HUSTED, S. Accumulation of shikimic acid: A technique for screening glyphosate efficacy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.4406–4412, 1998.

HARRISON, L.A; BAILEY, M.R.; NAYLOR, M.; REAM, J.; HAMMOND, D.L. The expressed protein in synthase in glyphosate-tolerant soybeans, 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase from *Agrobacterium sp.* Strain CP4, is rapidly digested and is not toxic to mice upon acute administration. *Journal of Nutrition*, v.128, p.756-761, 1996.

HASLAM, E. Shikimic acid: Metabolism and metabolites. (Chichester: John Wiley and Sons), 1993.

HERRMANN, K.M. The common aromatic biosynthetic pathway. In amino acids: Biosynthesis and genetic regulation, K.M. Herrmann and R.L. Somerville, eds (Reading, MA: Addison-Wesley), pp.301-322.

HERRMANN, K.M. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis aromatic compounds. *The Plant Cell*, v.50, p.907–919, 1995.

HERMANN, K.M., WEAVER, L.M. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.50, p.473–503, 1999.

HERNANDEZ, A.; GARCIA-PLAZZOLA, J.I.; BECERRIL, J.M. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p.2920–2925, 1999.

HOAGLAND, R.E. Interaction of indoleacetic-acid and glyphosate on phenolic in soybeans. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.36, p. 68-75, 1990.

HONEGGER, J.L., BROOKS, J. M.; ANDERSON, E. J.; and PORTER, C. A. Glyphosate transport in plants. p.609–618, 1986. In J. Cronshaw, et al. (ed.) Phloem transport. Liss, New York.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. *Economic Botany*, v.24, p.408-421, 1970.

JORDAN, D.L.; YORK, A.C.; GRIFFIN, J.L.; CLAY, P.A.; VIDRINE, P.R.; REYNOLDS, D. B. Influence of application variables on efficacy of glifosato. *Weed Technology*, v.11, p.354-362, 1997.

KAPUSTA, G., KRAUZ, R. F.; MATTHEWS, J. L. Soybean tolerance and summer annual weed control with glufosinate and glifosato in resistant soybean. *Weed Science*, v.49, p.120-124, 1994.

KING, A.C.; PURCELL, L.C.; VORIES, E.D. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-resistant soybean in response to glyphosate application. *Agronomy Journal*, v.93, p.179-186, 2001.

KLEBA, J. Riscos e benefícios de plantas transgênicas resistentes a herbicidas: o caso da soja RR da Monsanto, *Cadernos de Ciência e Tecnologia*, Brasília, v.15, n.3, p.9-42, 1998.

KREMER, R.J.; MEANS, N.E.; KIM, S. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v.85, p.1165-1174, 2005.

KRUSE, N.D.; TRESSI, M.M.; VIDAL, R.A. Herbicidas inibidores da EPSPs: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Herbicidas*, Brasília, v.2, p.139-146, 2000.

LICH, J. M.; RENNER, K. A.; PENNER, D. Interaction of glifosato with post emergence soybeans (*Glycine max*) herbicides. *Weed Science*, Champaign, v.45, p. 12-21, 1997.

LIU, C.M.; McLEAN, P.A.; SOOKDEO, C.C. et al. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, n.6, p.1799-1804, 1991.

LIU, L.; PUNJA, K.; RAHE, J.E. Altered root exudation and suppression of induced lignification as mechanisms of predisposition by glyphosate of bean roots (*Phaseolus vulgaris* L.) to colonization by *Pythium* spp. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.51, p.111-127, 1997.

LYDON, J.; DUKE, S.O. Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.36, p.813–818, 1988.

MARIA, N.; BECERRIL, J.M.; GARCÍA-PLAZAOLA, J.I.; HERNANDEZ, A.; FELIPE, M.R.; FERNANDEZ-PASCUAL, M. New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: Role of shikimate accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, p.2621–2628, 2006.

MENEZES, N.L. Testes rápidos. *SEED News*, v.3, p.30-32, 2001.

MONQUERO, P.A. Dinâmica populacional e mecanismos de tolerância de espécies de plantas daninhas ao herbicida glifosato. Piracicaba, 2003. 99p. Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP.

MOORMAN, T.B. A review of pesticide effects on microorganisms and microbial process related to soil fertility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.2, p.14–23, 1986.

MOORMAN, T.B.; BECERRIL, J. M.; LYDON, J.; DUKE, S. O. Production of hydroxybenzoic acids by *Bradyrhizobium japonicum* strains after treatment with glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.40, p.289–293, 1992.

MOSHIER, L.J.; PENNER, D. Factors influencing microbial degradation of ¹⁴C-glyphosate to ¹⁴CO₂ in soil. *Weed Science*, v.26, n.6, p.686-691, 1978.

PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.D.; RE, B.; La VALLEE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, Y.I.; BARRY, G.F.; EICHHOLTAZ, D.A.; PESCHKE, W.M.; NIDA, D.L.; TAYLOR, N.B. Development, identification and

characterization of a glyphosate tolerant soybean line. *Crop Science*, v.35, p.1451-1461, 1995.

POLLE, A.; OTTER, T.; SEIFERT, F. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology*, v.106, p.53-60, 1994.

RAO, P.S.C.; BELLIN, C.A.; BRUSSEAU, M.L. Coupling Biodegradation of Organic Chemicals to Sorption and Transport in Soil and Aquifers: Paradigms and Paradoxes. In: LINN, D.M.; CARSKI, T.H.; BRUSSEAU, M.L. et al. (Ed.) Sorption and degradation of pesticides and organic chemicals in soil. Madison/Wisconsin, p.1-23, 1993.

REDDY, K.N.; HOAGLAND, R.E.; ZABLOTOWICZ, R.M. Effect of glyphosate on grown, chlorophyll content and nodulation in glyphosate and glyphosate-resistant soybean (*Glycine max*) varieties. *Journal of New Seeds*, v.2, p.37-52, 2000.

REDDY, K. N.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, cause injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.5139-5143, 2004.

REDDY, K.N.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated. *Science*, v.51, p.496-502, 2003.

RUEPPEL, M.L; BRIGHTWELL, B.B; SCHAEFER glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Weed, J; MARVEL, J.T. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. Journal Agricultural and Chemistry*, v.25, p.723-729, 1977.

SAMMONS, R.D.; GRUYS, K.J.; ANDERSON, K.S.; JOHNSON, K.A. AND SIKORSKI, J.A. Re-evaluating glyphosate as a transition-state inhibitor of EPSP synthase: identification of an EPSP synthase* EPSP*glyphosate ternary complex. *Biochemistry*, v.34, p.6433-6440, 1995.

SÁNCHEZ, M.; PENA, M.J.; REVILLA, G.; ZARRA, I. Changes in dehydrodiferulic acids and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell walls during growth of *Pinus pinaster* hypocotyl. *Plant Physiology*, v.111, p.941-946, 1996.

SANTOS, A.; FLORES, M. Effects of glyphosate on nitrogen fixation of free-living heterotrophic bacteria. *Letters Applied Microbiology*, v.20, p.349-352, 1995.

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

SINGH, S.A.; CHRISTENDAT, D. Structure of Arabidopsis dehydroquinase dehydratase-shikimate dehydrogenase and implications for metabolic channeling in the shikimate pathway, *Biochemistry*, v.45, p.7787-7796, 2006.

SHAH, D.M.; HORSCH, R.B.; KLEE, H.J.; KISHORE, G.M.; WINTER, J.A.; TUMER, N.E.; HIRONAKA, C.M.; SANDERS, P.R.; GASSER, C.S.; AYKENT, S.; SIEGEL, N.R.; ROGERS, S.G. FRALEY, R.T. Engineering herbicides tolerance in transgenic plants. *Science*, v.233, p.478-481, 1986.

SHANER, D.L.; HASSAR-NADLER, T.; HENRY, W.B.; KOGER, C.H. A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science*, v.53, p.769-774, 2005.

SHARMA, H.S.S. Effect of glyphosate treatment on lignification of fibers of some flax cultivars. *Tests of Agrochemicals and cultivars*, v.7, p.114-115, 1986.

SMART, C.C.; JOHÄNNING, D., MÜLLER, G.; AMRHEIN, N. Selective overproduction of 5-enolpyruvylshikimate acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate, *Journal of Biological Chemistry*, v.260, p.16338-16346, 1985.

STALKER, D.M.; HLATT, W.R.; COMAL, L. A single amino acid substitution in enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. *Journal of Biological Chemistry*, v.260, p.4724-4728, 1985.

STEINRUCKEN, H.C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl shikimic acid-2-phosphate synthetase. *Biochemistry and Biophysical Research Commun.*, v.94, p.1207–1212, 1980.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: Dey, P.M. and Harborne, J.B (eds.). *Plant Biochemistry*. Academic Press: San Diego/ London. p. 387-416, 1997.

TALBOT, H.W; JOHNSON, L.M; MUNNEECKE, D.M. Glyphosate utilization by *Pseudomonas* sp. And *Alcaligenes* sp. Isolated from environmental sources, *Current Microbiology*, v.10, p.255-260, 1984.

TORSTENSSON, N.T.L.; HAMISSEPP, A. Detoxification of glyphosate in soil. *Weed Research*, v.17, p.209–212, 1977.

TRIGO, E. Los transgenicos en la agricultura argentina. In: *Global Biotechnology Forum – Bioindustries in Development*, Brasília, p.22-25, julho de 2003.

WYRILL, J.B. III.; BURNSIDE, O.C. Absorption, translocation and metabolism of 2,4-D and glifosato in common milkweed and hemp dogbane. *Weed Science*, v.24, p.557-566, 1976.

**Metabolic changes in susceptible and glyphosate-resistant soybean
(*Glycine max* L.) roots exposed to glyphosate**

Rogério Marchiosi, Maria de Lourdes Lucio Ferrarese,
Edicléia Aparecida Bonini, Osvaldo Ferrarese-Filho

Correspondence to:

Osvaldo Ferrarese-Filho
Laboratory of Plant Biochemistry
Department of Biochemistry
University of Maringá
Av. Colombo, 5790
87020-900, Maringá, PR
BRAZIL

E-mail:oferrarese@uem.br

Metabolic changes in susceptible and glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.) roots exposed to glyphosate

Rogério Marchiosi, Maria de Lourdes Lucio Ferrarese,
Edicléia Aparecida Bonini, Osvaldo Ferrarese-Filho

*Laboratory of Plant Biochemistry, Department of Biochemistry, University of Maringá,
Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brazil*

Abstract

Glyphosate [(*N*-phosphonomethyl)glycine] blocks the shikimate pathway reducing the biosynthesis of aromatic amino acids, followed by the arrest of protein production and general metabolic disruption evolving the phenylpropanoid pathway. Glyphosate-resistance is conferred in soybean by incorporating a gene encoding a glyphosate-insensitive enzyme (CP4-EPSP synthase) which acts in the shikimate pathway. Current analysis evaluates the metabolic effects caused by this herbicide on shikimate (shikimate dehydrogenase activity and shikimate content) and phenylpropanoid (phenylalanine ammonia lyase activity, phenolic and lignin contents) pathways of BRS-133 (susceptible) and BRS-245RR (resistant) soybean roots. In general, the results showed that (1) glyphosate affects the shikimate pathway (massive shikimate accumulation and enhanced shikimate dehydrogenase activity) and the phenylpropanoid pathway (increase in PAL activity, production of benzoate derivatives and decrease of lignin) in susceptible soybean roots; 2) the metabolic disruption contributes towards the production of *p*-hydroxybenzoate and vanillate, originated probably from shikimate and/or cinnamate and its derivatives, and 3) all these analyzed parameters are not affected in the genetically-modified soybean cultivar, confirming its resistance to glyphosate.

Keywords: Benzoate and Cinnamate derivatives; Genetically-modified soybean; Phenylalanine ammonia lyase; Shikimate; Shikimate dehydrogenase.

1. Introduction

The shikimate pathway, one of the major biosynthetic pathways in higher plants, consists of seven enzymatic steps which ends with the formation of chorismate, the branch point precursor for the biosynthesis of the aromatic amino acids tyrosine, tryptophan and phenylalanine (Fig. 1). Enzymes of this pathway are localized in plastids and nongreen tissues, such as flowers and roots of living plants (Hermann and Weaver, 1999). Steps three and four of the pathway are catalyzed by the bifunctional enzyme 3-dehydroquinate dehydratase (DHD, EC 4.2.1.10)/shikimate dehydrogenase (SDH, EC 1.1.1.25), which catalyses the dehydration of 3-dehydroquinate to 3-dehydroshikimate and the reversible reduction of 3-dehydroshikimate to shikimate (Ding et al., 2007). Further, the penultimate step is the reversible formation of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP) and inorganic phosphate from shikimate 3-phosphate and phosphoenolpyruvate. The reaction is catalyzed by EPSP synthase (EC 2.5.1.19). Linked to this pathway, the phenylpropanoid biosynthetic pathway is also an important metabolic route due to its responsibility in the synthesis of phenolic compounds and a wide range of secondary plant products, including lignin (Fig. 1). Phenylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.5), which catalyzes the elimination of ammonia from phenylalanine to provide cinnamate, is located at the starting point of the phenylpropanoid pathway, interfacing with the shikimate pathway and regulating the production of phenolics compounds, the monolignol polymerization and lignin synthesis (Boerjan et al., 2003).

In plants, shikimate pathway enzymes respond to different environmental stresses such as heavy metal (Díaz et al., 2001), herbivore and microbial attack, wounding, or nitrogen and amino acid starvation (Weaver and Hermann, 1997). The shikimate pathway has thus been an attractive target for the design of herbicidal agents. For example, EPSP synthase is the only cellular target for the *N*-(phosphonomethyl)glycine, the active ingredient of the most extensively used foliar-applied, broad-spectrum, non-selective herbicide glyphosate, which is especially active on all annual and perennial plants (Franz et al., 1997). The inhibition of EPSP synthase by glyphosate reduces the biosynthesis of aromatic amino acids, which leads to several metabolic disturbances, including the arrest of protein production, prevention of secondary product formation and general metabolic disruption followed by the plant's death (Franz et al., 1997). With the inhibition of EPSP synthase, shikimate, the metabolite upstream of this

enzyme in the pathway, cannot be converted into EPSP. The blockage of the shikimate pathway consequently results in the accumulation of high levels of shikimate (Pline et al., 2002; Buehring et al., 2007; Henry et al., 2007). Since accumulation is a direct result of herbicide inhibition of EPSP synthase, the biochemical effect has increased the interest for using shikimate as a biomarker for glyphosate exposure (Harring et al., 1998; Escorial et al., 2001; Pline et al., 2002; Shaner et al., 2005; Buehring et al., 2007).

Glyphosate is readily translocated continuously from leaves to the roots, rhizomes, and apical tissues of treated plants. Its metabolic degradation is very slow and it concentrates on metabolic sinks such as young roots and developing and mature nodules. In fact, a single foliar application of 0.5 kg ha⁻¹ of glyphosate caused accumulation of ≤ 0.3 mM in root tissues of susceptible plants (Franz et al., 1997). Since glyphosate is a broad-spectrum herbicide, it does not discriminate between crops and weed species. Its use in certain agricultural applications is thus limited, stimulating the search for glyphosate-resistant crops. Glyphosate resistance is conferred to soybean (*Glycine max* L. Merr.) by incorporating a gene which encodes a glyphosate-insensitive EPSPS enzyme (CP4-EPSP synthase). This enzyme, when expressed, allows the soybean to bypass glyphosate-inhibited native EPSP synthase in the shikimate pathway, preventing starvation for aromatic amino acids and deregulation of this metabolic route which follow glyphosate inhibition in susceptible plants. Thereby, the glyphosate-resistant (GR) transgenic soybean remains unaffected when treated with the herbicide (Padgett et al., 1995; Pline et al., 2002). If this herbicide inhibits EPSP synthase in susceptible (non-glyphosate-resistant) soybean, but not in the GR soybean line, possible changes in the shikimate and phenylpropanoid pathways might occur after glyphosate exposure. Thus, the present work evaluates the metabolic effects caused by this herbicide on the shikimate (SDH activity and shikimate content) and phenylpropanoid (PAL activity and phenolic and lignin contents) pathways of BRS-133 (susceptible) and BRS-245RR (GR) soybean roots. Seed germination was chosen for this short-term exposure with glyphosate for the above investigation.

2. Materials and methods

2.1. General procedures

Soybean [*Glycine max* L. Merr. cv. BRS-133 – susceptible – and BRS-245RR – GR – (Embrapa Soja, Brazil)] seeds (200 each) were immersed either in 300 ml of 0.1 to 5 mM glyphosate solutions or in water (control) for 4 h. After this short immersion period, the seeds were dark-germinated (at 25°C) on three sheets of filter paper totally moistened with water. Three days thence, the roots were excised and analyzed. When indicated, the fresh root weight was determined immediately after germination and the dry weight was estimated after oven-drying at 80°C until a constant weight was reached. *N*-(phosphonomethyl) glycine (glyphosate) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA), and all other reagents used were of the purest grade available or of chromatographic grade.

2.2. Enzymatic assays

Shikimate dehydrogenase (SHD, EC 1.1.1.25) was extracted as described by Díaz et al. (1997). Fresh roots (0.5 g) were ground at 4°C in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 2 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 8 mM β -mercaptoethanol and 0.05 g of polyvinylpyrrolidone (PVP). Homogenates were centrifuged (2200 g, 10 min) and the supernatant was used as the enzyme preparation. Enzyme activity was determined with shikimate as substrate by quantifying the production of NADPH spectrophotometrically at 340 nm ($\epsilon = 6.22 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The reaction mixture (4 mM shikimic acid in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 9.0, and a suitable amount of enzyme extract in a final volume of 900 μ l) was incubated at room temperature. The reaction was started by adding 100 μ l of 20 mM NADP and its reduction was monitored during 3 min. The results were expressed as nmol NADPH $\text{min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ fresh weight.

Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) was extracted as described by Ferrarese et al. (2000). Fresh roots (2 g) were ground at 4°C in 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.8). Homogenates were centrifuged (2200 g, 15 min) and the supernatant was used as the enzyme preparation. The reaction mixture (100 μ moles sodium borate buffer pH 8.7 and a suitable amount of enzyme extract in a final volume of 1.5 ml) was incubated at 40°C for 5 min for the PAL activity assay. Fifteen μ moles of L-phenylalanine were added to

start the reaction, which was stopped after 1 h of incubation by the addition of 50 μl of 5 N HCl. Samples were filtered through a 0.45 μm disposable syringe filter and analyzed (20 μl) with a Shimadzu[®] Liquid Chromatograph (Tokyo, Japan) equipped with a LC-10AD pump, a Rheodine[®] injector, a SPD-10A UV detector, a CBM-101 Communications Bus Module and a Class-CR10 workstation system. A reversed-phase Shimpack[®] CLC-ODS (M) column (150 \times 4.6 mm, 5 μm) was used at room temperature, with an equivalent pre-column (10 \times 4.6 mm). The mobile phase was methanol:water (70%:30%) with a flow rate of 0.5 ml min⁻¹. Absorption was measured at 275 nm. Data collection and integration were performed with Class-CR10 software (Shimadzu[®], Tokyo, Japan). *t*-Cinnamate, the product of PAL, was identified by comparing its retention time with standard values. Parallel controls without L-phenylalanine or with *t*-cinnamate (added as an internal standard in the reaction mixture) were performed as described elsewhere (Ferrarese et al., 2000). PAL activity was expressed as $\mu\text{mol } t\text{-cinnamate h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ fresh weight.

2.3. Shikimate quantification

Fresh roots (0.5 g) were ground in 0.25 N HCl. Homogenates were centrifuged (4°C, 1200 g, 10 min) and the supernatant was used to determine the shikimate content. Samples were filtered through a 0.45 μm disposable syringe filter and analyzed (20 μl) with a high performance liquid chromatography (HPLC) system (Shimadzu[®], Tokyo, Japan), as described above. The mobile phase was 3.5 mM phosphoric acid with a flow rate of 0.8 ml min⁻¹. Shikimate was identified, at 220 nm, by comparing its retention time with standard value (Pline et al., 2002). Results were expressed as $\mu\text{g shikimate g}^{-1}$ fresh weight.

2.4. Phenolic compound quantification

Hydroxybenzoic (protocatechuic, *p*-hydroxybenzoic and vanillic) and hydroxycinnamic (ferulic, *p*-coumaric, caffeic and sinapic) acids were determined by HPLC. Dry root (0.25 g) was boiled for 30 min in 5 ml of 2 N HCl. After cooling, the homogenate was filtered through a 0.45 μm disposable syringe filter and analyzed (20 μl) chromatographically. The mobile phase was methanol:acetic acid (30%:4%) with a

flow rate of 0.8 ml min⁻¹. The compounds were identified, at 254 nm, by comparing their retention times with standard values. Results were expressed as mg g⁻¹ dry weight.

2.5. Lignin quantification

After the germination period, dry roots (0.3 g) were homogenized in 50 mM potassium phosphate buffer (7 ml, pH 7.0) with a mortar and pestle and transferred into a centrifuge tube (Ferrarese et al., 2002). The pellet was centrifuged (1400 g, 4 min) and washed by successive stirring and centrifugation as follows: twice with phosphate buffer pH 7.0 (7 ml); 3 × with 1% (v/v) Triton[®] X-100 in pH 7.0 buffer (7 ml); 2 × with 1 M NaCl in pH 7.0 buffer (7 ml); 2 × with distilled water (7 ml); and 2 × with acetone (5 ml). The pellet was dried in an oven (60°C, 24 h) and cooled down in a vacuum desiccator. The dry matter obtained was defined as a protein-free cell wall fraction. Further, all dry protein-free tissue was placed into a screw-cap centrifuge tube containing the reaction mixture (1.2 ml of thioglycolic acid plus 6 ml of 2 M HCl) and heated (95°C, 4 h). After cooling at room temperature, the sample was centrifuged (1400 g, 5 min) and the supernatant was discarded. The pellet, containing the complex lignin-thioglycolic acid (LTGA), was washed 3 × with distilled water (7 ml) and the LTGA extracted by shaking (30°C, 18 h, 115 oscillations min⁻¹) in 0.5 M NaOH (6 ml). After centrifugation (1400 g, 5 min), the supernatant was stored. The pellet was washed again with 0.5 M NaOH (3 ml) and mixed with the supernatant obtained earlier. The combined alkali extracts were acidified with concentrated HCl (1.8 ml). After precipitation (0°C, 4 h), LTGA was recovered by centrifugation (1400 g, 5 min) and washed 2 × with distilled water (7 ml). The pellet was dried at 60°C, dissolved in 0.5 M NaOH, and diluted to yield an appropriate absorbance for spectrophotometric determination at 280 nm. Lignin was expressed as mg LTGA g⁻¹ dry weight.

2.6. Statistical design

The experimental design was completely randomized, and each experiment was represented by one glass container with twenty-five seedlings. Data are expressed as the mean of four independent experiments ± S.E. Significant differences were verified by one-way variance analysis with *Sisvar* package (Version 4.6, UFPA, Brazil).

Differences among means were tested according to Scott-Knott (1974) test and comparisons were performed at 5% significance.

3. Results and discussion

3.1. Effects of glyphosate on root length

To evaluate the effects of glyphosate on susceptible (BRS-133) and GR (BRS-245RR) soybean, seeds were germinated during short-term exposure (three days) after immersion in 0.1 to 5 mM glyphosate solutions for 4 h. Root lengths decreased in susceptible soybean with increasing concentrations of glyphosate (Fig. 2). The herbicide inhibited root lengths from 33.2% to 51.9% after 0.1 to 5 mM exposures when compared to control roots. Effects of glyphosate on plant growth have been reported by some authors. Haderlie et al. (1978) demonstrated that seedling axes elongation of germinated susceptible soybean was inhibited by 10 mM glyphosate. At 0.5 mM, glyphosate reduced hypocotyl length of dark-drown soybean seedlings in hydroponic conditions (Duke et al., 1979; Hoagland et al., 1979; Hoagland, 1990). In similar conditions, glyphosate reduced root growth (length and weight) of susceptible soybean (Suzuki et al., 2008). Consistent with the cited reports, glyphosate also reduced the root length of susceptible soybean seedlings (Fig. 2). Contrastingly, glyphosate did not affect the root growth of GR soybean – an expected result because this cultivar tolerates the herbicide. However, since glyphosate residues and its metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) were found in GR soybean seeds treated with glyphosate (Duke et al., 2003), reduced growth and yield cannot be neglected. Glyphosate reduced root growth of GR soybean in greenhouse studies (Reddy et al., 2000) but did not affect soybean growth in field experiments (Elmore et al., 2001). At least for the short-term experimental conditions reported in this work, the root length of GR soybean was unaffected by herbicide.

3.2. Effects of glyphosate on shikimate pathway

Glyphosate not only reduced the root length of susceptible (BRS-133) soybean, but also increased significantly the shikimate accumulation (Fig. 3). As a consequence of

herbicide exposure, shikimate increased from 27.8 to 48.7-fold after 0.1 to 5 mM glyphosate treatments.

Several examples in the literature indicate shikimate accumulation in different tissues of many agricultural crops such as tomato (Kim and Armheim, 1995), canola (Harring et al., 1998), barley (Escorial et al., 2001), cotton (Pline et al., 2002), wheat (Bresnahan et al., 2003), rice (Koger et al., 2005), sunflower (Henry et al., 2007) and corn (Buehring et al., 2007). In glyphosate-treated soybean, similar trends have been reported in leaves (Shaner et al., 2005; Nandula et al., 2007) and apical meristem (Singh and Shanner, 1998). Moreover, Hernandez et al. (1999) showed that glyphosate, foliarly applied on nodulated soybean plants, is translocated to nodules, blocking the shikimate pathway and leading to a massive accumulation of shikimate. In general, shikimate accumulation was found to be directly proportional to glyphosate application rates on tissue samples tested. Consistent with the above-quoted reports, glyphosate (0.1 to 5 mM) also accumulated shikimate in BRS-133 soybean roots (Fig. 3), reinforcing susceptibility of this cultivar to the herbicide. Since glyphosate inhibits the enzyme EPSP synthase in susceptible plant species, this rapid accumulation of shikimate represents a significant loss of feedback control of the pathway, resulting in less energy and decrease in root growth (Fig. 2). In addition, shikimate may be further converted to dehydroshikimate by SDH action (Fig. 1).

In contrast to susceptible soybean, no accumulation of shikimate was detected in GR (BRS-245RR) soybean roots in response to glyphosate (Fig. 3). Accordingly, Duke et al. (2003) observed that shikimate contents in GR soybean seeds were unaffected by commonly used glyphosate treatments in soybean production. Also Reddy et al. (2004) reported that glyphosate did not cause shikimate accumulation in GR soybean leaves. In a subsequent study, Shaner et al. (2005) observed that leaf discs excised from GR soybean did not accumulate shikimate when treated with 0.5 mM glyphosate. The results herein are consistent with previous research, and indicate that the possible reason for the lack of accumulation of shikimate is the resistance of this transgenic cultivar to glyphosate owing to an enhanced activity of insensitive EPSP synthase (Franz et al., 1997). Consequently, Duke et al. (2003) related that the absence of shikimate indicate that the EPSP synthase was not inhibited by glyphosate and that it utilized all or most of the metabolite eventually accumulated from the inhibition of the native EPSP synthase.

Glyphosate-affected SDH activities in susceptible soybean roots were significantly different from controls (Fig. 4). Enzymatic activities increased around 60% regardless

of glyphosate concentrations, when compared to control conditions. Shikimate pathway enzymes respond to different environmental stress such as herbivore, microbial attack, wounding, nitrogen starvation and heavy metal (Weaver and Hermann, 1997; Díaz et al., 2001). As reported earlier, SDH catalyzes the reversible reduction of 3-dehydroshikimate to shikimate (Fig. 1). Consequently, increases in SDH activities are probably due to the available level of its substrate shikimate in susceptible soybean roots, which responded as expected to glyphosate stress (Fig. 3). Circumstantial evidence in support of such finding is provided by the fact that no significant changes were observed in SDH activities of GR soybean roots after 0.1 to 5 mM glyphosate exposures (Fig. 4). This fact reinforces the resistance of this soybean cultivar to the herbicide.

3.3. Effects of glyphosate on phenylpropanoid pathway

Subsequent experiments were carried out to evaluate the effects of 1 mM glyphosate on PAL activity and phenolic and lignin contents (Figs. 5 to 7). This concentration was chosen because the earlier findings (Figs. 2 to 4) revealed that the herbicide did not affect root growth, shikimate accumulation and SDH activity in GR cultivar, but significantly affected these same variables in susceptible soybean. Fig. 5 shows that the two cultivars displayed different PAL activities. In susceptible soybean roots, the glyphosate-affected PAL activity was significantly different from control – an increase of 26.2%.

In susceptible soybean, the induction of PAL activity has been observed as a result of glyphosate treatment (Duke and Hoagland, 1978; Duke et al., 1979; Hoagland and Duke, 1983; Hoagland, 1990). At 0.1 to 1 mM, the herbicide markedly increased PAL activity while reducing free phenylalanine and soluble phenolic compound contents. In general, these authors concluded that the observed PAL induction may cause the growth effects observed after glyphosate application. In addition, glyphosate could exert its effect through either induction of PAL activity and/or inhibition of aromatic amino acid synthesis. However, these findings were not in accordance with those reported for other plant species. Glyphosate markedly inhibited PAL activity in *Perilla* cell suspension culture (Ishikura and Takeshima, 1984), yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*) and rapeseed leaves (Cañal et al., 1987; Harring et al., 1998). Holländer and Amrhein (1980) have thus suggested that increased PAL activity should be considered a secondary

consequence of reduced synthesis of certain phenolic compounds that regulate PAL activity. In this scenario, it is relevant to note that PAL regulates the flux of phenylalanine to the biosynthesis of phenolic compounds. These compounds may be utilized for protein synthesis or converted to secondary metabolites (lignin and phenolic compounds). Moreover, PAL activity is commonly observed in resistance responses of plants pertaining to structural defense mechanisms, and its induction may be a response to various biotic and abiotic stresses (Boerjan et al., 2003). In association with increased PAL activity (Fig. 5), an accumulation of shikimate (Fig. 3) occurred due to EPSP synthase inhibition, resulting in a probable reduction in the pool of aromatic amino acids. Increase of PAL activity may be consequently interpreted as a supposed side-effect probably related with a stressful metabolic disturbance caused by the herbicide. No significant changes were in fact reported in PAL activities of GR soybean roots after glyphosate exposure (Fig. 5).

As reported earlier, PAL is involved in the production of phenolic compounds which are originally derived by enzymatic deamination of phenylalanine via nitrogen-free skeletons of cinnamate. This compound is converted, within the phenylpropanoid metabolism, into a broad range of secondary metabolites such as *p*-coumarate, caffeate, ferulate, sinapate and, eventually, lignin (Boerjan et al., 2003). These metabolites were determined in both susceptible and GR soybean roots for the verification of a supposed influence of glyphosate on phenolic compounds (Fig. 6). The HPLC quantification of cinnamate derivatives in soybean seeds treated with glyphosate revealed that the ferulate, *p*-coumarate, caffeate and sinapate were not detected in the two cultivars. By contrast, benzoate derivatives were detected in roots after herbicide exposures. In susceptible soybean, the *p*-hydroxybenzoate and vanillate increased in comparison to control conditions. Protocatechuate, another benzoate derivative, was not affected by the herbicide. In contrast, no significant changes in the benzoate derivatives of GR soybean roots exposed to herbicide were recorded.

Other workers have reported effect of glyphosate on phenolic compounds in susceptible plant species. Increase in the levels of benzoate derivatives such as protocatechuate, gallate, vanillate and *p*-hydroxybenzoate were observed in young leaves (Nandula et al., 2007) and in leaves of nodulated and nitrate-watered soybean plants (Hernandez et al., 1999) exposed to 10 mM glyphosate. More recently, María et al. (2006) reported that lupine (*Lupinus albus*) plants sprayed with 2.5 and 5 mM glyphosate accumulated protocatechuate in leaves and nodules. According for the above

cited authors, glyphosate blocks synthesis of cinnamate derivatives by inhibiting EPSP synthase. Inhibition of this enzyme consequently leads to the accumulation of high levels of shikimate and, further, benzoate derivatives (Fig. 1).

In the present work, only two benzoate derivatives significantly increased in soybean roots – *p*-hydroxybenzoate and vanillate, while cinnamate derivatives were not detected (Fig. 6). It is acknowledged that plants may effectively modify their metabolism, development and growth in response to glyphosate stress. Two factors probably contribute towards an increase of benzoate derivatives. First, shikimate may be transformed into dehydroshikimate by the SDH reaction and, further, into protocatechuate → *p*-hydroxybenzoate → vanillate (Holländer-Czytko and Amrhein, 1983). If this possibility is true, shikimate accumulation (Fig. 3) and the enhanced SDH activity (Fig. 4) are explained. Second, although the exact mechanism for biosynthesis of benzoates from cinnamate derivatives has not been established, it is well accepted in plants. Cinnamate, as a PAL product, may be converted sequentially in *p*-coumarate → caffeate → ferulate, the main metabolites of the phenylpropanoid pathway (Fig. 1, dotted lines). Further, *p*-coumarate, caffeate and ferulate may then be transformed into *p*-hydroxybenzoate, protocatechuate and vanillate, respectively (Löscher and Heide, 1994). In addition, since Funk et al. (1990) suggest that cinnamate itself also is a precursor of vanillate and if this second possibility is true, it explains why cinnamate derivatives were not detected in susceptible soybean roots (Fig. 6). Evidence supports this explanation. Cañal et al. (1987) verified that glyphosate caused significant increases of *p*-hydroxybenzoate and vanillate in leaves of yellow nutsedge. Since these increases were associated to low levels of cinnamate derivatives, the authors propose that an alternative pathway to PAL in phenolic biosynthesis should yield benzoate derivatives (Fig. 1).

The results herein show that cinnamate derivatives were not detected in susceptible soybean roots and a decreased production of lignin might be expected. In fact, the lignin content in susceptible soybean roots decreased following 1 mM glyphosate treatment by about 21% when compared to control (Fig. 7). Glyphosate has been reported to reduce lignification in plant tissues due to its mode of action via the shikimate pathway (Sharma, 1986; Saltveit, 1988). Current results are thus consistent with the fact that glyphosate may inhibit lignin synthesis due to the reduced supply of cinnamate precursors derived from phenylpropanoid pathway. As an end product of this pathway, lignin synthesis is associated with mechanical support and improved plant defence mechanisms (Boerjan et al., 2003). Consequently, the inability to synthesize cinnamate

derivatives in the presence of glyphosate may explain the latter effect on lignin production. Taking into account that cinnamate derivatives are not available, the subsequent lignin production was probably not enough to prevent damage associated with reduced growth of soybean roots. Finally, a striking similarity has been noted between the effects of glyphosate on PAL activity, phenolic compounds contents and lignin production in GR soybean roots. The lignin content was not affected by herbicide in GR soybean roots, when compared to the control experiment (Fig. 7).

Summarizing, the results of the present research indicate that: 1) due its inhibitory effect on EPSP synthase, glyphosate affects the shikimate pathway (shikimate accumulation and enhanced SDH activity) and the phenylpropanoid pathway (increase in PAL activity and benzoate derivatives followed by reduced lignin production) in susceptible soybean roots; 2) the production of *p*-hydroxybenzoate and vanillate may occur concurrently by the conversion of shikimate and/or cinnamate or its derivatives. These findings are probably due to disruptions of metabolic pathways caused by the herbicide and 3) the glyphosate did not affect the related variables in GR soybean roots, which confirmed the resistance of this cultivar to the herbicide.

Acknowledgments

Research was financially supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by the Araucaria Foundation (PR). O. Ferrarese-Filho and M.L.L. Ferrarese are research fellows of CNPq. R. Marchiosi is the recipient of a CNPq fellowship. The authors kindly thank Aparecida M.D. Ramos and Gisele A. Bubna for their technical assistance.

References

Boerjan, W., Ralph, J. and Baucher, M. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54: 519-546, 2003.

Bresnahan, G. A., Manthey, F. A., Howatt, K. A., and Chakraborty, M. Glyphosate applied preharvest induces shikimic acid accumulation in hard red spring wheat

(*Triticum aestivum*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 4004-4007, 2003.

Buehring, N. W., Massey, J. H., and Reynolds, D. B. Shikimic acid accumulation in field-grown corn (*Zea mays*) following simulated glyphosate drift. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 819-824, 2007.

Cañal, N. J., Tames, R. S., and Fernandez, B. Effects of glyphophate on phenolic metabolism in yellow nutsedge leaves. Physiologia Plantarum 69: 627-632, 1987.

Díaz, J., Rós-Barceló, A., and de Caceres, F.M. Changes in shikimate dehydrogenase and the end products of the shikimate pathway, chlorogenic acid and lignins, during the early development of seedlings of *Capsicum annuum*. New Phytologist 136: 183-188, 1997.

Díaz, J., Bernal, A., Pomar, F., and Merino, F. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. Plant Science 161: 179-188, 2001.

Ding, L., Hofius, D., Hajirezaei, M. R., Fernie, A. R., Börnke, F., and Sonnewald, U. Functional analysis of the essential bifunctional tobacco enzyme 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase in transgenic tobacco plants. Journal of Experimental Botany 58: 2053-2067, 2007.

Duke, S. O., and Hoagland, R. E. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds. 1. Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in dark-grown maize roots. Plant Science Letters 11: 185-190, 1978.

Duke, S. O., Hoagland, R. E., and Elmore, C. D. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds. IV. Phenylalanine ammonia-lyase activity, free amino acids, and soluble hydroxyphenolic compounds in axes of light-grown soybeans. Physiologia Plantarum 46: 307-317, 1979.

Duke, S. O., Rimando, A. M., Pace, P. F., Reddy, K. N., and Smeda, R. J. Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated,

glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 340-344, 2003.

Elmore, R. W., Roeth, F. W., Klein, R. N., Kenezovic, S. Z., Mertin, A., Nelson, L.A., and Shapiro, C.A. Glyphosate-resistant soybean cultivar response to glyphosate. *Agronomy Journal* 93: 404-407, 2001.

Escorial, M. C., Sixto, H., Gracia-Baudin, J. M., and Chueca, M. C. A rapid method to determine cereal plant response to glyphosate. *Weed Technology* 15: 697-702, 2001.

Ferrarese, M. L. L., Rodrigues, J. D., and Ferrarese-Filho, O. Phenylalanine ammonia-lyase activity in soybean roots extract measured by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Plant Biology* 2: 152-153, 2000.

Ferrarese, M. L. L., Zottis, A., and Ferrarese-Filho, O. Protein-free lignin quantitation in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) roots. *Biologia, Section Botany* 57: 541-543, 2002.

Franz, J. E., Mao, M. K., and Sikorski, J. A. Glyphosate's molecular mode of action. In: *Glyphosate. A unique global herbicide*. American Chemical Society. Monograph 189: 521-615, 1997.

Funk, C., and Brodelius, P.E. Phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia* andr.: II. Effects of precursor feeding and metabolic inhibitors. *Plant Physiology* 94: 95-101, 1990.

Haderlie, L. C., Slife, F. W., and Butler, H. S. ¹⁴C-Glyphosate absorption and translocation in germinating maize (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*) seeds and in soybean plants. *Weed Research* 18: 269-273, 1978.

Harring, T., Streibig, J. C., and Husted, S. Accumulation of shikimic acid: A technique for screening glyphosate efficiency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4406-4412, 1998.

Henry, W. B., Shaner, D. L., and West, M. S. Shikimate accumulation in sunflower, wheat, and proso millet after glyphosate application. *Weed Science* 55: 1-5, 2007.

Hermann, K. M., and Weaver, L. M. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 473–503, 1999.

Hernandez, A., Garcia-Plazzola, J. I., and Becerril, J. M. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2920–2925, 1999.

Hoagland, R. E., Duke, S. O., and Elmore, D. C. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds. III. Phenylalanine ammonia-lyase activity, free amino acids, soluble proteins and hydroxyphenolic compounds in axes of dark-grown soybeans. *Physiologia Plantarum* 46: 357-366, 1979.

Hoagland, R. E., and Duke, S. O. Relationships between phenylalanine ammonia-lyase activity and physiological-responses of soybean (*Glycine max*) seedlings to herbicides. *Weed Science* 31: 845-852, 1983.

Hoagland, R. E. Interaction of indoleacetic acid and glyphosate on phenolic metabolism in soybean. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 36: 68-75, 1990.

Holländer-Czytko, H., and Amrhein, N. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. I. Inhibition by glyphosate of phenylpropanoid synthesis in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Plant Physiology* 66: 823-829, 1980.

Holländer-Czytko, H., and Amrhein, N. Subcellular compartmentation of shikimic acid and phenylalanine in buckwheat cell suspension cultures grown in the presence of shikimate pathway inhibitors. *Plant Science Letters* 29: 89-96, 1983.

Ishikura, N., and Takeshima, Y. Effects of glyphosate on caffeic acid metabolism in *Perilla* cell suspensions cultures. *Plant and Cell Physiology* 25: 185-189, 1984.

Kim, T. W., and Armheim, N. Glyphosate toxicity: Long-term analysis of shikimic acid accumulation and chlorophyll degradation in tomato plants. *Korean Journal of Weed Science* 15: 141-147, 1995.

Koger, C. H., Shaner, D. L., Krutz, L. J., Walker, T. W., Buehring, N., Henry, W. B., Thomas, W. E., and Wilcut, J. W. Rice (*Oryza sativa*) response to drift rates of glyphosate. *Pesticide Management Science* 61: 1161-1167, 2005.

Löscher, R., and Heide, L. Biosynthesis of *p*-hydroxybenzoate from *p*-coumarate and *p*-coumaryl-coenzyme A in cell-free extracts of *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Plant Physiology* 106: 271-279, 1994.

María, N., Becerril, J. M., García-Plazaola, J. I., Hernández, A., Felipe, M. R., and Fernández-Pascual, M. New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: Role of shikimate accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 2621-2628.

Nandula, V. K., Reddy, K. N., Rimando, A. M., Duke, S. O., and Poston, D. H. Glyphosate-resistant and susceptible soybean (*Glycine max*) and canola (*Brassica napus*) dose response and metabolism relationships with glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 3540-3545, 2007.

Padgett, S. R., Kolacz, K. H., Delannay, X. D., Re, B., La Vallee, B. J., Tinius, C. N., Rhodes, W. K., Otero, Y. I., Barry, G. F., Eichholtz, D. A., Peschke, W. M., Nida, D. L. and Taylor, N. B. Development, identification and characterization of a glyphosate tolerant soybean line. *Crop Science* 35: 1451-1461, 1995.

Pline, W.A., Wilcut, J.W., Duke, S.O., Edmisten, K.L., and Wells, R. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and non-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 506-512, 2002.

Reddy, K. N., and Whiting, K. Weed control and economic comparisons of glyphosate-resistant, sulfonyleurea-tolerant, and conventional soybean (*Glycine max*) systems. *Weed Technology* 14: 204-211, 2000.

Reddy, K. N., Rimando, A. M., and Duke, S. O. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, cause injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5139-5143, 2004.

Saltveit, M. E. Postharvest glyphosate application reduces toughening, fiber content, and lignification of stored asparagus spears. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 113: 569-572, 1988.

Shaner, D.L., Hassar-Nadler, T., Henry, W.B., and Koger, C.H. A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science* 53: 769-774, 2005.

Sharma, H. S. S. Effect of glyphosate treatment on lignification of fibers of some flax cultivars. *Annals of Applied Biology* 108: 114-115, 1986.

Singh, B. K., Shaner, D. L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technology* 12: 527-530, 1998.

Suzuki, L. S., Zonetti, P. C., Ferrarese, M. L. L., and Ferrarese-Filho, O. Effects of ferulic acid on growth and lignification of conventional and glyphosate-resistant soybean. *Allelopathy Journal* 21: 155-163, 2008.

Weaver, L. M., and Herrmann, K. M. Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends in Plant Science* 2: 346-351, 1997.

Fig. 1. Simplified diagram of the shikimate and phenylpropanoid pathways. SDH, shikimate dehydrogenase; EPSPS, 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase and PAL, phenylalanine ammonia lyase; PEP, phosphoenolpyruvate; Dotted lines indicate the conversion of cinnamate and its derivatives to benzoate derivatives.

Fig. 2. Effects of glyphosate on root length of susceptible (BRS-133) and glyphosate-resistant (BRS-245RR) soybean. Mean \pm SE values ($N = 20$) followed by different letters are significantly different according to the Scott–Knott test ($P \leq 0.05$).

Fig. 3. Effects of glyphosate on shikimate contents in susceptible (BRS-133) and glyphosate-resistant (BRS-245RR) soybean roots. Mean \pm SE values ($N = 4$) followed by different letters are significantly different according to the Scott–Knott test ($P \leq 0.05$).

Fig. 4. Effects of glyphosate on shikimate dehydrogenase (SDH) of susceptible (BRS-133) and glyphosate-resistant (BRS-245RR) soybean roots. Mean \pm SE values ($N = 4$) followed by different letters are significantly different according to the Scott–Knott test ($P \leq 0.05$).

Fig. 5. Effects of glyphosate on phenylalanine ammonia lyase (PAL) activities in susceptible (BRS-133) and glyphosate-resistant (BRS-245RR) soybean roots. Mean \pm SE values ($N = 4$) followed by different letters are significantly different according to the Scott–Knott test ($P \leq 0.05$).

Fig. 6. Effects of glyphosate on phenolic compound content in susceptible (BRS-133) and glyphosate-resistant (BRS-245RR) soybean roots. Protochatechuic (PRO), *p*-hydroxybenzoic (*p*-HD), vanilic (VAN), ferulic (FER), *p*-coumaric (*p*-COU), caffeic (CAF), sinapic (SIN) acids. Mean \pm SE values ($N = 4$) followed by different letters are significantly different according to the Scott–Knott test ($P \leq 0.05$).

Fig. 7. Effects of glyphosate on lignin contents in susceptible (BRS-133) and glyphosate-resistant (BRS-245RR) soybean roots. Mean \pm SE values ($N = 4$) followed by different letters are significantly different according to the Scott–Knott test ($P \leq 0.05$).

Fig. 1

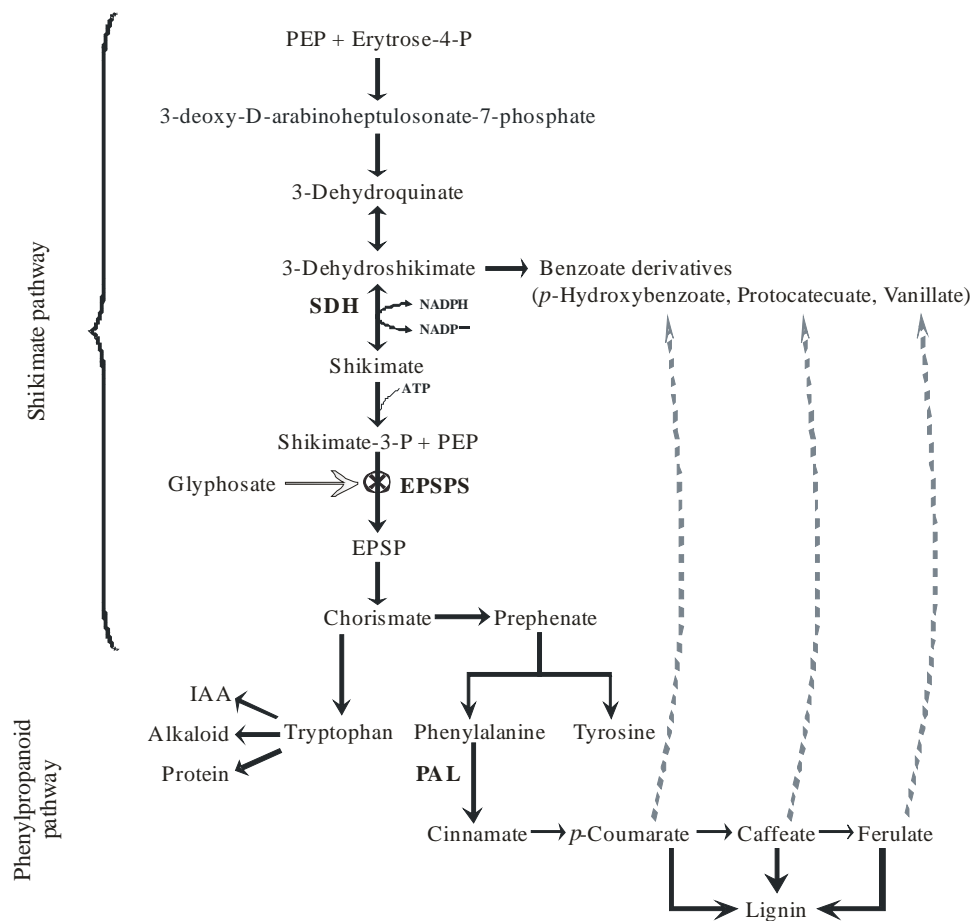


Fig. 2

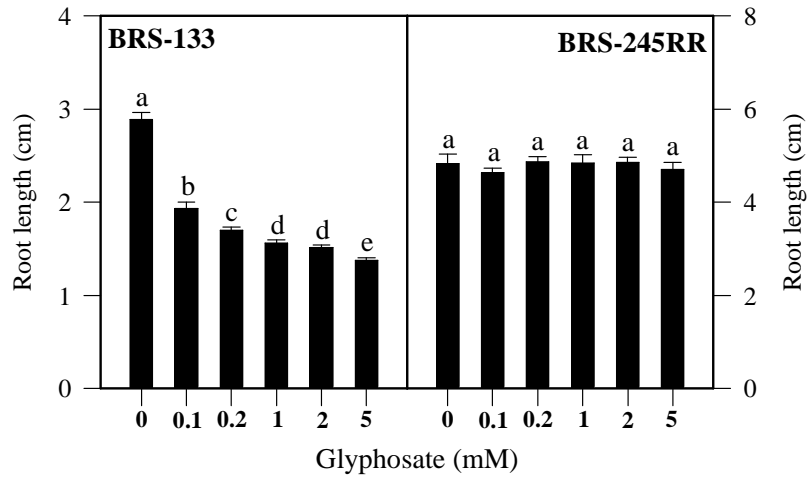


Fig. 3

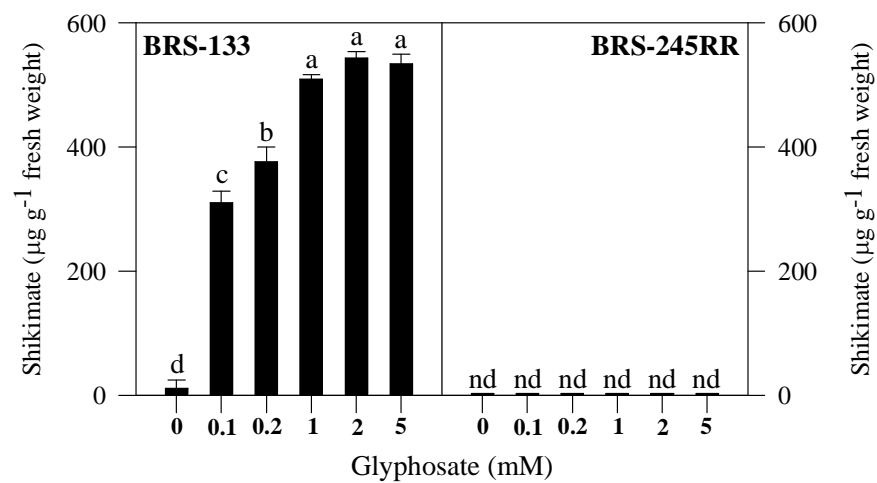


Fig. 4

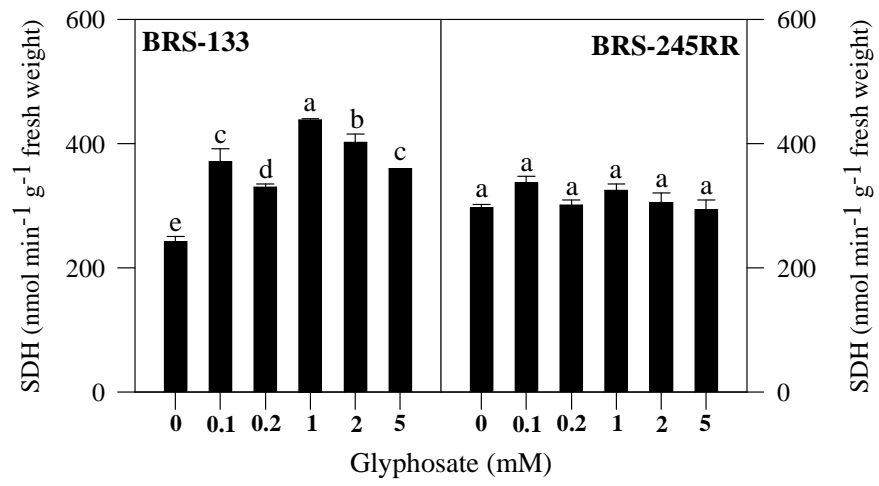


Fig. 5

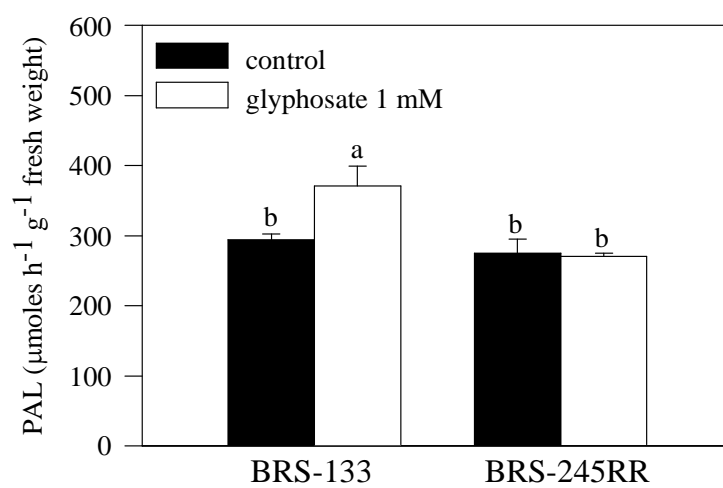


Fig. 6

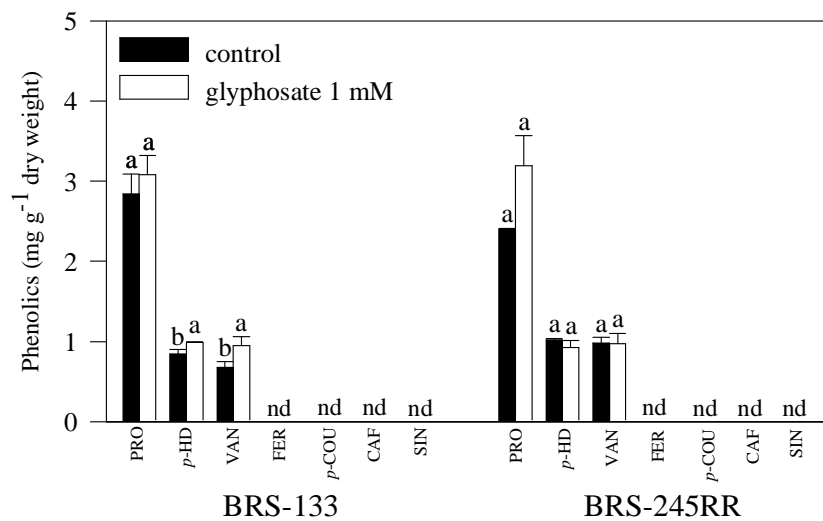
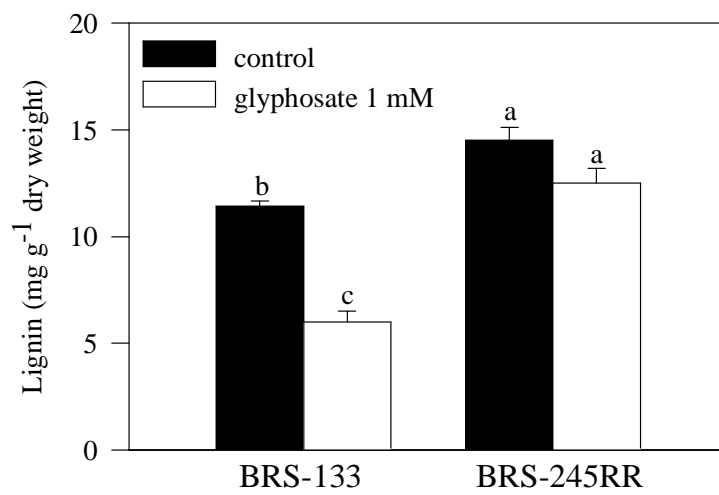


Fig. 7



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)