



Plantas de amaranto (*A. palmeri*) cultivadas en laboratorio mediante cultivo hidropónico puro con aireación forzada bajo condiciones controladas.

## Efecto del glifosato y de diferentes intermediarios metabólicos en la regulación de la ruta del siquimato

**Ainhoa Zulet-González\*,  
Manuel Fernández-Escalada,  
Miriam Gil-Monreal,  
Ana Zabalza y  
Mercedes Royuela**

Departamento de  
Ciencias Medio Natural,  
Universidad Pública de  
Navarra, Pamplona,  
\*ainhoa.zulet@unavarra.es

Aunque el herbicida glifosato es el más utilizado a nivel mundial, todavía no se conocen las causas exactas por las que la planta muere tras aplicar el tratamiento. El glifosato actúa inhibiendo la EPSPS (5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa), enzima clave en la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos. En este estudio abordamos los mecanismos de regulación de la ruta de biosíntesis de estos aminoácidos, incubando discos de hoja de dos poblaciones de Amarantho (*Amaranthus palmeri*), una sensible y otra resistente a glifosato, con glifosato y diferentes intermediarios de la ruta metabólica. El enzima DAHPS (3-Deoxi-D-arabino-heptuloso-7-fosfato sintasa) se confirma como enzima clave en la regulación y en la respuesta al glifosato; su síntesis es inhibida por los productos finales de la ruta y por el quinato, y su regulación puede explicar la acumulación de siquimato tras la aplicación de glifosato.

Palabras clave: ruta del siquimato, EPSPS, DAHPS, siquimato, glifosato, aminoácidos aromáticos, quinato.

El glifosato es un herbicida total que actúa inhibiendo la actividad del enzima EPSPS (5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa). Este enzima es clave en la ruta del siquimato (Figura 1), ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (AAA) tirosina, fenilalanina y triptófano. Cuando el herbicida bloquea el enzima EPSPS se produce un aumento en el contenido de los metabolitos previos a dicho enzima en la ruta del siquimato (DeMaria, 2006). Aunque se trata del herbicida más utilizado a nivel mundial, todavía no están claras las causas por las que la planta muere tras ser tratada. En general, tras el bloqueo de un enzima por parte de un herbicida, la muerte de la planta puede producirse por los siguientes factores: acumulación de los sustratos del enzima bloqueado; falta de los productos generados por el enzima bloqueado; o por diferentes reacciones que se producen al intentar controlar el desajuste de la ruta (Siehd, 1997). Tradicionalmente, se ha relacionado el efecto tóxico del glifosato con la falta de los aminoácidos aromáticos, aunque no puede detectarse un descenso de los mismos debido al propio ajuste del metabolismo que realiza la planta. Además, tras la aplicación de glifosato se ven afectados tantos procesos metabólicos que pueden asociarse con la toxicidad del mismo (Gomes y col., 2014), que todavía no está del todo claro por qué las plantas mueren.

El amaranto (*Amaranthus palmeri*) es una mala hierba en la que se han descrito poblaciones resistentes por amplificación génica del gen que codifica el enzima EPSPS (mecanismo en el sitio de acción). La amplificación se debe a un aumento del número de copias del gen de EPSPS y se correlaciona positivamente con mayor contenido del enzima y mayor actividad (Gaines y col. 2010) (Figura 1). Esto sirve de esponja molecular, evitando los efectos del glifosato y permitiendo un correcto metabolismo (Powles&Yu, 2010).

El objetivo de este estudio fue profundizar en los mecanismos de regulación de la ruta del siquimato. Para ello se ha utilizado un novedoso método de aplicación de los tratamientos, mediante la incubación de discos de hoja de dos poblaciones de

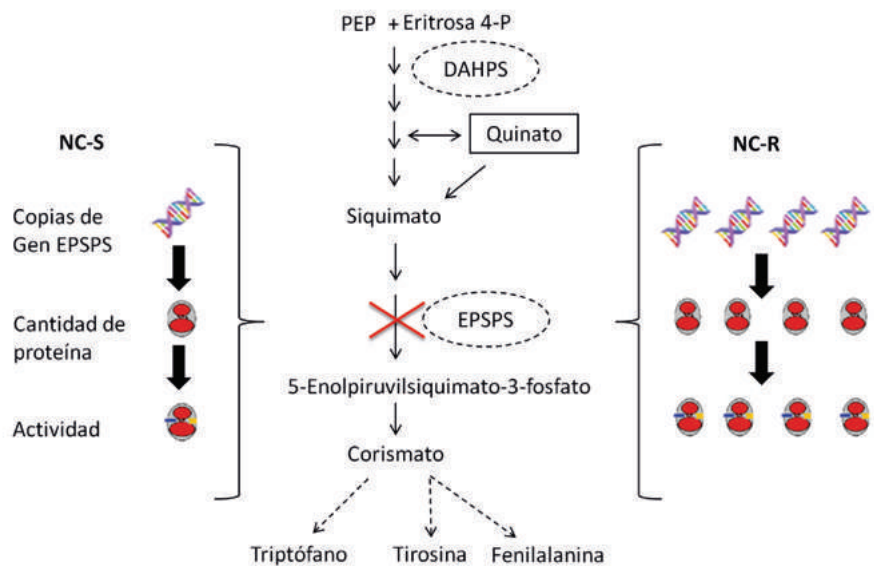


Figura 1. Esquema de la ruta del siquimato y síntesis de aminoácidos aromáticos. 3-Deoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato sintasa (DAHPS); 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) y sintetización de las características de las dos poblaciones de Amaranto, la sensible (NC-S) y la resistente (NC-R) a glifosato.

## Sistema de aplicación de los tratamientos:

### Incubación directa con los intermediarios metabólicos

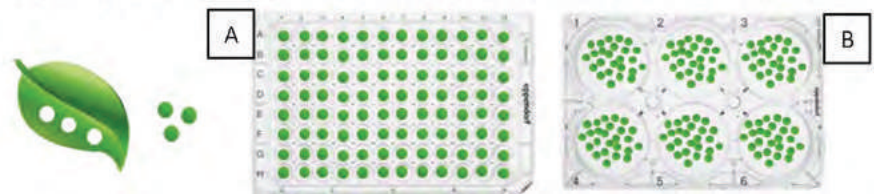


Figura 2. (A) Ensayo para la determinación de siquimato en el que se incubó un único disco por pocillo y (B) ensayo para la determinación del contenido de EPSPS y DAHPS en el que se incubaron 25 discos por pocillo.

amaranto (una sensible y otra resistente a glifosato por sobreexpresión de EPSPS). Así es posible comparar directamente el efecto del glifosato con el efecto de la aplicación exógena de diversos intermediarios de la misma ruta donde está localizada la diana del herbicida.

## Material y métodos

### Material vegetal

Las plantas de amaranto (*A. palmeri*) (facilitadas por el Dr. Todd A. Gaines; Colorado State University, Fort Collins, CO, USA) se cultivaron en cultivo hidropónico puro con aireación forzada bajo condiciones controladas mediante el método descrito por Fernández-Escalada (2016). La población resistente empleada en este ensayo presenta una amplificación génica de 47,5 veces más copias de

EPSPS (Fernández-Escalada y col., 2016).

Se recolectaron las hojas más jóvenes de cada uno de los individuos y se tomaron muestras frescas de discos de hoja de 4 mm de diámetro. Se realizaron dos experimentos: en el primero se determinó el contenido de siquimato dentro del tejido; y en el segundo se determinó el contenido de EPSPS y DAHPS mediante inmunodetección. En el primer ensayo se incubó un único disco de hoja por pocillo en microplacas de 96 pocillos con 100 µl de líquido de incubación (Figura 2A); para el segundo se incubaron 25 discos de hoja por pocillo en microplacas de 6 pocillos con 2,5 ml de líquido de incubación (Figura 2B). En ambos experimentos las condiciones de incubación fueron: 24 °C, 24 h. Los tratamientos aplicados fueron agua en el tratamiento control; siquimato 20mM;

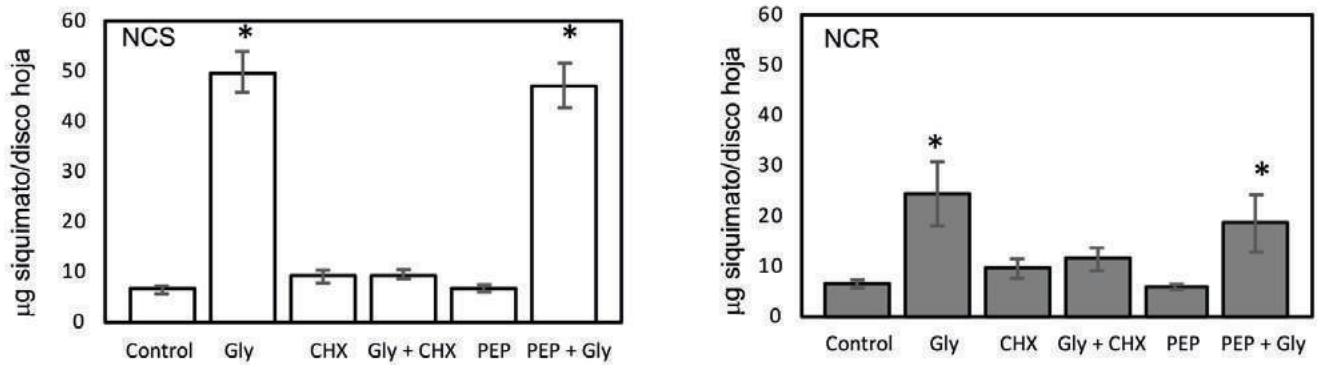


Figura 3. Contenido de siquimato en discos de hoja (Población sensible en blanco, NCS, y resistente en gris, NCR). Tratamientos: agua (control); glifosato (Gly); cicloheximida (CHX); glifosato con cicloheximida; PEP; PEP con glifosato. Media  $\pm$  ES (n=10). \* indica diferencias significativas (p<0.05) entre ese tratamiento y el control de esa población.

quinato 50mM; glifosato 2,7 mM; cicloheximida 200  $\mu$ M; glifosato con cicloheximida; PEP 10 mM; glifosato con PEP; AAA 10 mM de cada aa: fenilalanina, tirosina y triptófano; glifosato con AAA.

## Determinaciones

Transcurrido el tiempo de incubación las placas para la determinación de siquimato se congelaron a -20 °C hasta su análisis espectrofotométrico según el método descrito por Fernández-Escalada y col. (2016). En los pocillos que contenían 25 discos de hoja se retiró el medio líquido y fueron congelados en N líquido y almacenados a -80 °C hasta su análisis. Se determinó el contenido de EPSPS por inmunodetección según el método descrito por Fernández-Escalada y col. (2016) y el de DAHPS según el descrito por Zabalza y col. (2016).

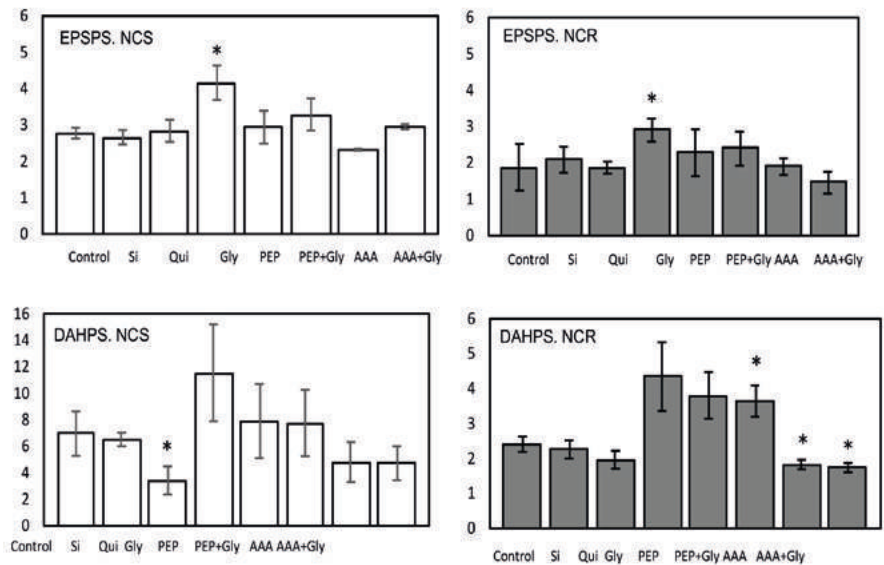


Figura 4. Efecto de los diferentes tratamientos en el contenido de los enzimas EPSPS y DAHPS (Adj. Vol. RD\*mm<sup>2</sup>) en hojas de *A. palmeri*, población Sensible (NCS) columnas blancas y Resistente (NCR) grises. La proteína cargada en la inmunodetección de EPSPS fue de 60 mg para NCS y 15 mg para NCR, en el caso de DAHPS fue igual en ambas poblaciones (40  $\mu$ g). Tratamientos: agua (control); glifosato (Gly); cicloheximida (CHX); glifosato con cicloheximida; PEP; PEP con glifosato; aminoácidos aromáticos (AAA); AAA con glifosato. Media  $\pm$  ES (n=3). \* indica diferencia significativa (p<0.05) con el control de la misma población.

## Resultados y discusión

Este método de incubación proporciona una mayor disponibilidad de los tratamientos en el interior de la hoja y permite trabajar en tiempos cortos (24h) lo que limita la degradación de estos compuestos.

La inhibición del enzima EPSPS por el herbicida glifosato provoca una gran acumulación de siquimato en hojas (Lydon y Duke 1988; Becerril y col., 1989; Hernández y col., 1999; Orcaray y col., 2010, 2012). En este ensayo se observa una acumulación de este compuesto en el tratamiento con glifosato en ambas poblaciones (Figura 3), siendo menor en la población resistente (NCR) que en la población sensible (NCS), comprobando

así la resistencia de la población al herbicida (Shaner y col., 2005).

El nivel de proteína EPSPS basal es muy diferente en ambas poblaciones; hay más proteína en la población resistente, lo que hace que la inmunodetección se realice partiendo de distintas concentraciones de proteína. Este mayor contenido de proteína EPSPS en poblaciones con resistencia debido a amplificación génica ya se había descrito para *A. palmeri* (Gaines y col., 2010; Gaines y col., 2011; Ribeiro y col., 2014; Fernández-Escalada y col., 2016) y para otras especies (Wiersma y col., 2015). Tras la aplicación de glifosato se produce

un aumento significativo de la cantidad de EPSPS en ambas poblaciones (Figura 4, Fernández-Escalada y col., 2016). Ambas poblaciones mostraron un incremento no significativo de la cantidad de enzima DAHPS tras el tratamiento con glifosato (Figura 4; Pinto y col., 1988; Zabalza y col., 2016). El hecho de haber detectado los efectos ya conocidos del glifosato (acumulación de siquimato, mayor cantidad de proteína EPSPS y DAHPS) en los discos de hojas tratadas valida este método de ensayo para poder analizar el efecto directo de diferentes intermediarios metabólicos sobre dichos parámetros.

Si la acumulación de siquimato fuera la señal que hace que aumente la expresión de DAHPS y EPSPS, debería haberse observado una mayor cantidad de las mismas tras el tratamiento con siquimato. Sin embargo, no se produce ese aumento en ninguna de las dos poblaciones (Figura 4). Por otra parte, la acumulación de siquimato provocada por el glifosato fue suprimida en las plantas que fueron incubadas en presencia del herbicida y cicloheximida (Figura 3), un inhibidor de la traducción proteica del citosol. Este resultado sugiere que únicamente se puede llegar a acumular siquimato con glifosato si se produce la síntesis simultánea de alguna proteína, que podría ser la DAHPS, al tratarse del enzima de inicio de la vía de biosíntesis de aminoácidos, donde se sintetiza siquimato y cuya síntesis aumenta en presencia de glifosato (Figura 4).

La aplicación exógena de quinato, un metabolito formado a partir de una ramificación de la ruta del siquimato y cuya concentración aumenta con glifosato, no modificó la cantidad del enzima EPSPS pero sí disminuyó la cantidad de DAHPS en la población sensible (Figura 4), tal y como describieron Zabalza y col (2016) en guisante. A pesar de que se había propuesto que una hipotética mayor disponibilidad de PEP como efecto de la inhibición de EPSPS por el herbicida podría ser un factor que exa-

cerbaría la acumulación de siquimato que provoca el herbicida (DeMaría y col., 2006), el tratamiento conjunto de PEP con glifosato provocó una acumulación de siquimato similar a la que se produce con el herbicida aplicado de forma aislada (Figura 3). Los AAA aplicados de forma aislada o con glifosato produjeron (Figura 4) una disminución del contenido de la proteína DAHPS en ambas poblaciones (significativa solo en la población resistente). Estos resultados sugieren que la mayor disponibilidad de productos finales, independientemente de la presencia de glifosato, regularían la cantidad de enzima DAHPS, puerta de entrada hacia la ruta del siquimato.

Este trabajo ha permitido profundizar en los mecanismos de regulación de la ruta del siquimato, comprobándose que la sobreexpresión del enzima EPSPS no modifica la regulación de la vía y se propone la importancia del incremento de flujo de entrada en la vía como el principal responsable de la respuesta al herbicida.

## Agradecimientos

Este proyecto ha sido financiado por el Ministerio Español de Economía y Competitividad (AGL-2013-40567R). M.F-E, A. Z-G y M.G-M, han sido becarios predoctorales de la Universidad Pública de Navarra. Agradecemos a Gustavo Garijo por su asistencia técnica y al Dr. Todd A.

Gaines (Colorado State University, Fort Collins, CO, USA) por las facilidades para realizar este trabajo.

## Abstract

Although glyphosate is the most-used herbicide worldwide, the precise mechanisms by which glyphosate kills plants remains unclear. Glyphosate inhibits EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) from the shikimate pathway, responsible for the synthesis of aromatic amino acids. This study is an approach to the mechanisms of regulation of the shikimate pathway incubating leaf discs of two populations of *Amaranthus palmeri* (one sensitive and another glyphosate-resistant) with glyphosate or several intermediates of the shikimate pathway. DAHPS (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase) is confirmed to be a key enzyme in the regulation of the shikimate pathway and in the physiological response to glyphosate, as its synthesis is inhibited by aromatic amino acids and quininate and seems to be involved in the elicited shikimate accumulation after glyphosate treatment.

Keywords: Shikimate pathway, EPSPS, DAHPS, shikimate, glyphosate, aromatic amino acids, quininate.

## Bibliografía



- Becerril, J.M., Duke, S.O. and Lydon, J. (1989) Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf. *Phytochemistry*, 28, 695-699.
- DeMaría, N., Becerril J., García-Plazaola, J., Hernández, A., DeFelipe, MR. and Fernández-Pascual, M. (2006). New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: Role of shikimate accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2621-2628.
- Fernández-Escalada, M., Gil-Monreal, M., Zabalza, A. and Royuela, M. (2016). Characterization of the *Amaranthus palmeri* Physiological Response to Glyphosate in Susceptible and Resistant Populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 95-106.
- Gaines, T.A., Shaner, D.L., Ward, S.M., Leach, J.E., Preston, C. and Westra, P. (2011) Mechanism of resistance of evolved glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5886-5889.
- Gaines, T.A., Zhang, W., Wang, D., Bukun, B., Chisholm, S.T., Shaner, D.L., Nissen, S.J., Patzoldt, W.L., Tranel, P.J., Culpepper, A.S., Grey, T.L., Webster, T.M., Vencill, W.K., Sammons, R.D., Jiang, J., Preston, C., Leach, J.E. and Westra, P. (2010) Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 1029-1034.
- Gomes, MP, Smedbol, E., Chalifour, A., Häänault-Ethier, L., Labrecque, M., Lepage, L., Lucotte, M. and Juneau, P. (2014). Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: An overview. *Journal of Experimental Botany*, 65, 4691-4703.

- Hernández, A., García-Plazaola, J.I. and Becerril, J.M. (1999) Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2920-2925.
- Lydon, J. & Duke, S.O. (1988) Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 813-818.
- Orcaray, L., Igal, M., Marino, D., Zabalza, A. and Royuela, M. (2010). The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. *Pest Management Science*, 66, 262-269.
- Orcaray, L. Zulet, A., Zabalza, A. and Royuela, M. (2012). Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. *Journal of Plant Physiology*, 169, 27-33.
- Pinto, J E., Dyer, W E., Weller, S C. and Herrmann, K M. (1988). Glyphosate induces 3-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in potato (*Solanum tuberosum* L.) Cells grown in suspension culture. *Plant Physiology*, 87, 891-893.
- Powles, S.B. & Yu, Q. (2010) Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Reviews in Plant Biology*, 61, 317-347.
- Ribeiro, D.N., Pan, Z., Duke, S.O., Nandula, V.K., Baldwin, B.S., Shaw, D.R. and Dayan, F.E. (2014) Involvement of facultative apomixis in inheritance of EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant *Amaranthus palmeri*. *Planta*, 239, 199-212.
- Shaner, DL, Nadler-Hassa, T, Henry, WB and Koger, CH (2005) A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science*, 53, 769-774.
- Siehd D. (1997). Inhibitors. Herbicide activity: Toxicology, biochemistry and molecular biology. Roe R., Burton J., Kuhr R.. Amsterdam. 37-67.
- Wiersma, AT, Gaines, TA, Preston, C, Hamilton, JP, Giacomini, D, Robin Buell, C, Leach, JE and Westra, P (2015). Gene amplification of 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-resistant *Kochia scoparia*. *Planta*, 241, 463-474.
- Zabalza A., Orcaray L., Fernández-Escalada M., Zulet-González, A. and Royuela, M. (2016). The pattern of shikimate pathway and phenylpropanoids after inhibition by glyphosate or quinate feeding in pea roots. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. DOI: 10.1016/j.pestbp.2016.12.005

## Equilibrium®



### Bioestimulante de acción sinérgica para un cuajado equilibrado



- ✓ Mejor regulación fitohormonal de la planta.
- ✓ Optimización de los procesos de división celular y movilización de reservas.
- ✓ Mantiene su equilibrio fisiológico actuando en los órganos en crecimiento.
- ✓ Producto natural y ecológico.

