

30
1987-2017
upna

Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**“Implicaciones fisiológicas de la aplicación conjunta de
quinato y el herbicida glifosato en el control de la mala
hierba resistente *Amaranthus palmeri*”**

Lucía González Mulero

Septiembre, 2017.

CONFORMIDAD DE LAS DIRECTORAS DEL TRATABAJO DE FIN DE MÁSTER

La **Dra. Ana Zabalza Aznárez**, Profesora Contratada Doctor y **Da. Ainhoa Zulet González**, becario predoctoral de la Universidad Pública de Navarra, del Departamento de Ciencias del Medio Natural, de la Universidad Pública de Navarra,

INFORMAN:

que el trabajo “**Implicaciones fisiológicas de la aplicación conjunta de quinato y el herbicida glifosato en el control de la mala hierba resistente *Amaranthus palmeri***” que presenta Da. Lucía González Mulero para optar al título de Máster en Agrobiología Ambiental, ha sido desarrollado bajo nuestra dirección en el laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Ciencias del Medio Natural de la Universidad Pública de Navarra.

Revisado el trabajo, consideran que reúne las condiciones necesarias para su defensa, por lo que

AUTORIZAN:

La presentación del citado Trabajo de Fin de Máster,

Pamplona/Iruña, a 20 de septiembre de 2016

Directoras:

Fdo.: Ainhoa Zulet González

Fdo.: Ana Zabalza Aznárez

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	1
PALABRAS CLAVE.....	2
KEYWORDS	2
1. INTRODUCCIÓN.	3
1.1. Generalidades sobre los herbicidas.....	3
1.1.1. Historia y situación actual.....	3
1.1.2. Clasificación de herbicidas.	5
1.1.3. Resistencia a herbicidas.	7
1.1.4. Tipos de resistencias.	8
1.2. Ruta del Siquimato.	11
1.2.1. DAHPS y EPSPS.	13
1.2.2. Quinato.....	13
1.3. Glifosato.	14
1.3.1. Contextualización.	14
1.3.2. Mecanismo y modo de acción del herbicida glifosato.....	15
1.3.3. Resistencia a glifosato.....	17
1.3.4. <i>Amaranthus palmeri</i> y su resistencia a glifosato.	17
1.4. Justificación del estudio.....	18
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
3.1. Material vegetal: <i>Amaranthus palmeri</i>	23
3.1.1. Siembra, germinación y condiciones de crecimiento.	23
3.1.2. Tratamiento.	25
3.1.3. Muestreo.	26
3.2. Determinaciones analíticas.	27
3.2.1. Electroforesis desnaturalizante e inmunodetección de DAHPS y EPSPS.....	27
3.2.2. Cuantificación de la actividad enzimática de EPSPS.	29
3.2.3. Determinación del contenido de quinato.	30
3.2.4. Determinación del contenido de siquimato.....	31

3.2.5. Determinación del contenido en aminoácidos libres.	31
3.3. Análisis estadístico.	32
4. RESULTADOS.	33
4.1. Resultados visuales y evaluación de la letalidad en las plantas tratadas.	33
4.2. Efectos del tratamiento sobre la diana del herbicida glifosato.	38
4.3. Efectos del tratamiento sobre los parámetros anteriores a la diana.	40
4.3.1. Inmunodetección de DAHPS.	40
4.3.2. Contenido en quinato.	41
4.3.3. Contenido en siquimato.	43
4.4. Efectos de los tratamientos sobre productos de la ruta del siquimato: Contenido en aminoácidos libres.	45
4.4.1. Contenido en aminoácidos aromáticos.	46
4.4.2. Contenido en aminoácidos ramificados.	48
4.4.3. Contenido en aminoácidos ácidos y aminoácidos amidas.	49
5. DISCUSIÓN.	53
5.1. Potenciadores de la toxicidad y letalidad provocada por el glifosato.	53
5.2. Efectos sobre parámetros de la ruta del siquimato.	54
5.2.1. Efectos sobre el enzima diana del herbicida glifosato: EPSPS.	54
5.2.2. Efectos sobre parámetros anteriores a la diana: DAHPS, quinato y siquimato.	55
5.3. Perfil de aminoácidos libres en respuesta a los tratamientos.	57
6. CONCLUSIONES.	61
7. BIBLIOGRAFÍA.	63

RESUMEN

El glifosato es el herbicida más empleado mundialmente para el control de malas hierbas, aunque su eficacia se está viendo mermada debido al desarrollo de poblaciones resistentes. El glifosato inhibe el enzima EPSPS (5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa) y provoca una acumulación de quinato, un metabolito secundario, que podría estar relacionado con su toxicidad. En este estudio se valoró dicha toxicidad en plantas de dos poblaciones de *Amaranthus palmeri* (sensible y resistente al herbicida) tratadas con quinato, glifosato o la combinación de ambos en diferentes momentos de aplicación: previa, simultánea o posterior de quinato respecto a glifosato.

Para ello se han comparado el contenido de siquimato, quinato, aminoácidos, el de los enzimas DAHPS (3-Deoxi-D-arabino-heptulosoato-7-fosfato sintasa) y EPSPS, además de su actividad. Los resultados obtenidos en este estudio permiten inferir que la aplicación de quinato después de glifosato es la combinación temporal que más perturbaciones metabólicas induce, siendo letal para la población sensible y alterando el patrón de la ruta del siquimato en la población resistente.

ABSTRACT

The herbicide mostly used in the chemical weed control is glyphosate, although its efficacy is being reduced due to resistant populations. Glyphosate specifically inhibits the EPSPS enzyme (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) and induces an accumulation of quinate, a secondary metabolite, which would be related to glyphosate toxicity. In this study, this possible toxicity was evaluated on two populations of the weed *Amaranthus palmeri* (one sensitive and the other resistant to glyphosate) sprayed with quinate, glyphosate, and combinations of both compounds: quinate before, simultaneously and after glyphosate.

To this aim shikimate, quinate and aminoacidic content, content of the enzymes DAHPS (3-Deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase) and EPSPS and EPSPS activity have been monitored. Results obtained in this study suggest that applying quinate after glyphosate is the combination that induces more metabolic perturbations, as it was lethal in the sensitive population and altering the shikimate pathway on the resistant one.

PALABRAS CLAVE

Aminoácidos aromáticos, 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), resistencia, ruta del siquimato.

KEYWORDS

Aromatic amino acids, 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), resistance, shikimate pathway.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Generalidades sobre los herbicidas.

1.1.1. Historia y situación actual.

Se entiende por herbicida a todo producto químico que inhibe total o parcialmente el crecimiento de plantas no deseadas denominadas malas hierbas. Estas plantas obstaculizan los propósitos del hombre afectando a los sistemas agrícolas compitiendo con los cultivos por los nutrientes del suelo y funcionando como atrayentes de otras plagas, como insectos y patógenos.

Las malas hierbas son plantas que crecen de manera predominante en terrenos altamente alterados por el hombre, por ejemplo, al implantar un monocultivo. Se trata de plantas con alta capacidad de dispersión y de competencia, lo que conlleva grandes pérdidas producidas por la competencia por agua, luz, nutrientes con los cultivos, además de la alelopatía.

Desde su descubrimiento los herbicidas se han utilizado como un método de control químico de estas malas hierbas, ya que permiten eliminar selectivamente estos vegetales no deseados y reducir así las interferencias con los cultivos de interés, así como los costes de producción, mano de obra y energía derivados.

Hasta la década de los 40, cuando se produjo el descubrimiento de los primeros productos orgánicos con capacidad herbicida, se empleaban productos inorgánicos como sal común, sulfato de cobre o sulfato de hierro para el control de malas hierbas.

En 1944 comenzó a utilizarse el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) como herbicida hormonal con efecto similar a las auxinas, aunque se sintetizó por primera vez en 1941 y se utilizó unos años con aplicación antifúngica poco exitosa.

A partir de los 50 empezaron a sintetizarse nuevos herbicidas como las triazinas y derivados de la urea ambos inhibidores de la fotosíntesis.

Una década más tarde se descubrieron los bipyridilos, herbicidas totales muy tóxicos como diquat y paraquat. Actualmente, se prohíbe su comercialización dado su elevada toxicidad y peligrosidad medioambiental y para la salud.

En 1970 se produjo un cambio en la práctica agrícola y comenzó a llevarse a cabo la siembra directa para intentar proteger el suelo desgastado por el laboreo continuo. Esto fue posible gracias a la aplicación de herbicidas como el glifosato, un inhibidor de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos.

En la década de los 90 se empezaron a desarrollar los cultivos resistentes a partir de técnicas de ingeniería genética alterando los genes implicados en la diana para disminuir su

sensibilidad por el herbicida o propiciando un metabolismo detoxificador de la molécula herbicida antes de que esta llegue a la diana. Existen genes capaces de desarrollar resistencia a la mayor parte de tipos de herbicidas existentes, pero solo los inhibidores de la síntesis de aminoácidos cumplen los requisitos para poder desarrollar plantas tolerantes a ellos, ya que inhiben una enzima crucial en cada ruta de biosíntesis de aminoácidos. La enzima una vez inhibida pierde la sensibilidad ante el herbicida, de esta manera se impide su unión y se mantiene su funcionalidad. Tras este descubrimiento se desarrollaron y comercializaron cultivos resistentes a imidazolinonas, CLEARFIELD*, glifosato Round up Ready® y glufosinato LibertyLink® (Tan et al., 2006), y ya en el año 2000 un 90% del cultivo de colza resistente a herbicidas pertenecían a alguno de estos tres tipos. El uso de cultivos resistentes a herbicidas acarreó un aumento en el uso de herbicidas propiciando una gran presión de selección sobre las malas hierbas.

A partir del año 2000, se dejaron de encontrar nuevos mecanismos de acción y se sintetizaron nuevos herbicidas con los mecanismos de acción ya conocidos, como sucede actualmente.

El aumento de la presión de selección se favorece debido a tres factores: la utilización de cultivos resistentes, la poca variedad en cuanto a materias activas y el modelo agrícola actual, que persigue un gran nivel de producción de alimentos propiciando un uso abusivo y continuado de fitosanitarios para combatir plagas y malas hierbas. Debido a este incremento, cada vez más acentuado, se ha observado con mayor frecuencia la aparición natural de más malas hierbas resistentes a los herbicidas.

Por estas razones, hoy en día, el cambio de esta agricultura moderna a una agricultura más ecológica y consecuente con el medio ambiente comienza a tomar mayor importancia.

En los últimos años, con la limitación de la Unión Europea en cuanto a las materias activas que pueden utilizarse como productos herbicidas se ha favorecido la práctica de utilizar herbicidas con idéntico mecanismo de acción, generando de esta manera otro factor influyente en el aumento de la presión de selección sobre las poblaciones de malas hierbas.

En este contexto, en España se redactó el Real Decreto 1311/2012 de cuya implementación surgió el Plan de Acción Nacional (PAN), por el que se establece el marco de actuación para el uso sostenible de productos fitosanitarios. Esta legislación busca fomentar la gestión integrada de los cultivos para evitar el desarrollo de resistencias en plagas, enfermedades y malas hierbas; preservando así el sector agrícola y contribuyendo positivamente al medio ambiente mediante un modelo sostenible de producción compatible con

la utilización racional de productos fitosanitarios y la aplicación de alternativas no químicas de manejo de los cultivos, como rotación de cultivos, barbecho, siembra directa, etc.

1.1.2. Clasificación de herbicidas.

Existen numerosos criterios de clasificación de los herbicidas, según su estructura química, método de aplicación, comportamiento en el suelo, uso principal, etc. Sin embargo, el más utilizado se basa en el mecanismo de acción del herbicida, ya que proporciona gran información sobre el efecto fitotóxico del herbicida, interacción herbicida-planta y, por tanto, ayuda en la elección del herbicida ideal para planificar el manejo agrícola de las rotaciones de cultivo o para el tratamiento de las malas hierbas. Uno de los sistemas más empleados para la clasificación de herbicidas es realizado por el HRAC (Herbicide-Resistance Action Committee).

Este sistema consiste en 23 grupos diferenciados por letras (Tabla 1). El último grupo, Z, se subdivide en 4 subgrupos y se compone de herbicidas con mecanismos de acción no del todo conocidos. Cada grupo actúa sobre una parte determinada del interior de la célula vegetal, como puede observarse en la Figura 1.

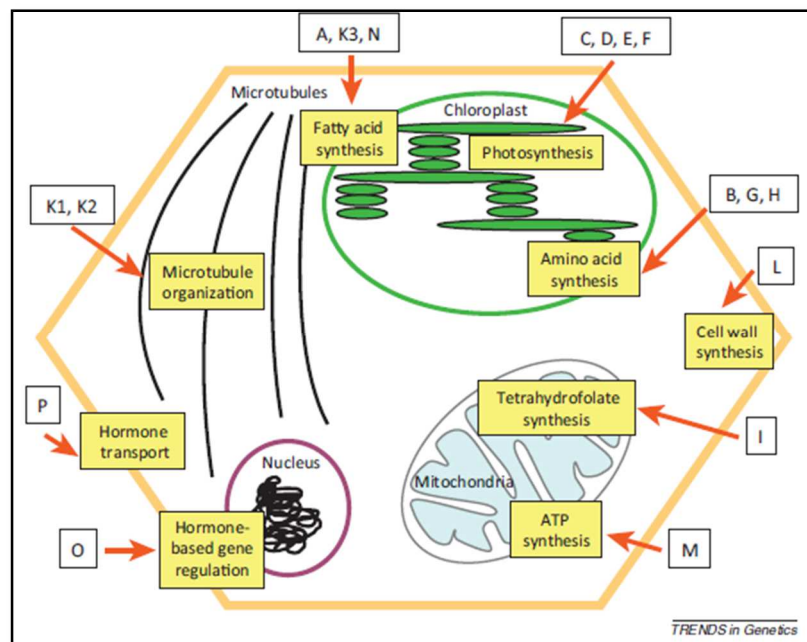


Figura 1. Diana de los distintos tipos de herbicidas, (Fuente: (Délye et al., 2013)).

GRUPO HRAC	MODO DE ACCIÓN	RUTA O PROCESO DIANA
A	Inhibición de la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACCasa)	Biosíntesis de ácidos grasos
B	Inhibición enzimática de la acetolactato sintetasa (ALS)	Biosíntesis de aminoácidos (Ile, Val, Leu)
C	Inhibición del fotosistema II proteína D1 (psbA)	Fotosíntesis (transferencia de electrones)
D	Desviación del flujo electrónico del fotosistema I	Fotosíntesis (transferencia de electrones)
E	Inhibición del protoporfirinógeno oxidasa	Fotosíntesis (Biosíntesis del grupo Hemo de la clorofila)
F	Decoloración: inhibición de la síntesis de carotenoides a nivel de la fitoeno desaturasa	Fotosíntesis (Biosíntesis de carotenoides)
G	Inhibición de la EPSPS sintasa	Biosíntesis de aminoácidos (Phe, Trp, Tyr)
H	Inhibición de la glutamino sintasa (GS)	Biosíntesis de aminoácidos (Gln)
I	Inhibición de la dihidropterato sintasa	Biosíntesis de Tetrahidrofolato
K1	Inhibición de la unión de microtúbulos en la mitosis	Polimerización de microtúbulos
K2	Inhibición de la mitosis	Polimerización de microtúbulos
K3	Inhibición de la división celular	Biosíntesis de ácidos grasos
L	Inhibición de la síntesis de la pared celular (celulosa)	Biosíntesis de pared celular
M	Desacopladores	Biosíntesis de ATP
N	Inhibición de la síntesis lipídica	Biosíntesis de ácidos grasos
O	Auxinas sintéticas	Regulación de los genes de respuesta a auxinas
P	Inhibición de AIA	Señalización hormonal de baja intensidad
Z1	Disruptores de la unión de microtúbulos durante la mitosis	
Z2	Inhibición de la elongación celular	
Z3	Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	
Z4	Efectos desconocidos	

Tabla 1. Tipos de herbicidas según su modo de acción y diana.

1.1.3. Resistencia a herbicidas.

La resistencia de una mala hierba a un herbicida se define como la capacidad heredable de un biotipo de una especie para sobrevivir y reproducirse después de un tratamiento herbicida, utilizado en un cultivo en concreto y a una determinada dosis de empleo que la hubiese controlado eficazmente. Se produce como un efecto secundario no deseado, consecuencia de un uso inadecuado y reiterado de un mismo herbicida.

El primer caso de resistencia a herbicidas, a la auxina sintética 2,4-D, se observó en 1957 pero hasta 1970 no se documentó la resistencia a triazinas como un problema de gran importancia agronómica y económica.

La resistencia de las malas hierbas a los herbicidas se debe a una respuesta adaptativa de estas plantas a la presión de selección ejercida por estos compuestos (Powles and Yu, 2010).

Dicha respuesta reflejaría la evolución de las plantas en su adaptación a nuevas condiciones de desarrollo (Powles and Yu, 2010) y dependería de la planta, del herbicida utilizado y de las técnicas de cultivo.

Actualmente, existen a nivel mundial 483 biotipos de malas hierbas resistentes a herbicidas, compuestos por 252 especies. Estas plantas han desarrollado resistencia a 23 de los 26 lugares de acción de herbicidas conocidos, y a 163 herbicidas diferentes (Heap, 2017). En las especies de malas hierbas resistentes se han encontrado resistencias sobre todo a los inhibidores de la ACCasa (grupo A), inhibidores de la ALS (grupo B) e inhibidores de la fotosíntesis (grupo C), destacando el creciente aumento de las resistencias al herbicida glifosato del grupo de las glicinas (grupo G).

El control de malas hierbas puede suponer grandes pérdidas económicas e incluso puede obligar a dejar la tierra en barbecho durante uno o varios años.

Para prevenir la aparición de resistencias se debería llevar a cabo un manejo integrado del control de las malas hierbas. Por lo que los programas de manejo de resistencias a herbicidas deben aunar los métodos de cultivo, mecánicos y herbicidas disponibles para su control, dependiendo del cultivo y la situación, conforme al código de buenas prácticas agrícolas.

Muchos de los nuevos compuestos que se comercializan en el mercado poseen una actividad residual menor, ejerciendo así una menor presión de selección sobre las plantaciones de malas hierbas.

1.1.4. Tipos de resistencias.

La fitotoxicidad ejercida por un herbicida comprende cuatro etapas (Catizone & Zanin, 2002) (Figura 2).

1. Comienza con la interceptación del herbicida por la mala hierba, quedando retenido en el exterior de la planta.
2. Pasado un tiempo es absorbido al interior de la misma.
3. Posteriormente se transporta hasta el sitio de acción (diana). Durante dicho transporte el herbicida puede ser metabolizado por la planta a un estado más activo.
4. Una vez en la diana, el herbicida ejerce su actividad fitotóxica inhibiendo la actividad de un proceso metabólico vital para la mala hierba. El efecto sobre la diana (mecanismo de acción) tendrá unos síntomas fisiológicos (modo de acción) sobre la planta que desencadenarán la muerte de la planta.

Algunas malas hierbas son capaces de desarrollar resistencias a diversos modos de acción mediante modificaciones o mecanismos específicos que anulan el efecto fitotóxico de los herbicidas (Chueca, et al., 2005). Los niveles de tolerancia de una mala hierba a un determinado herbicida se establecen según el mecanismo de resistencia desarrollado.

Es necesario conocer en detalle estos mecanismos para poder llevar a cabo planes integrados de control de malas hierbas y de esta manera prever el comportamiento de una población resistente a un herbicida ante la aplicación de las distintas herramientas químicas, físicas, culturales y/o biológicas para su manejo y control, la efectividad a corto y largo plazo de las mismas y la posible aparición de nuevas resistencias.

Las resistencias observadas hasta ahora se deben al desarrollo, por parte de las malas hierbas, de mecanismos divididos en dos grupos: alteración del sitio de acción (target-site) y alteración de los procesos relacionados con el mecanismo de acción del herbicida (interceptación, retención, absorción, transporte o metabolización) (non target-site) (Powles and Yu, 2010).

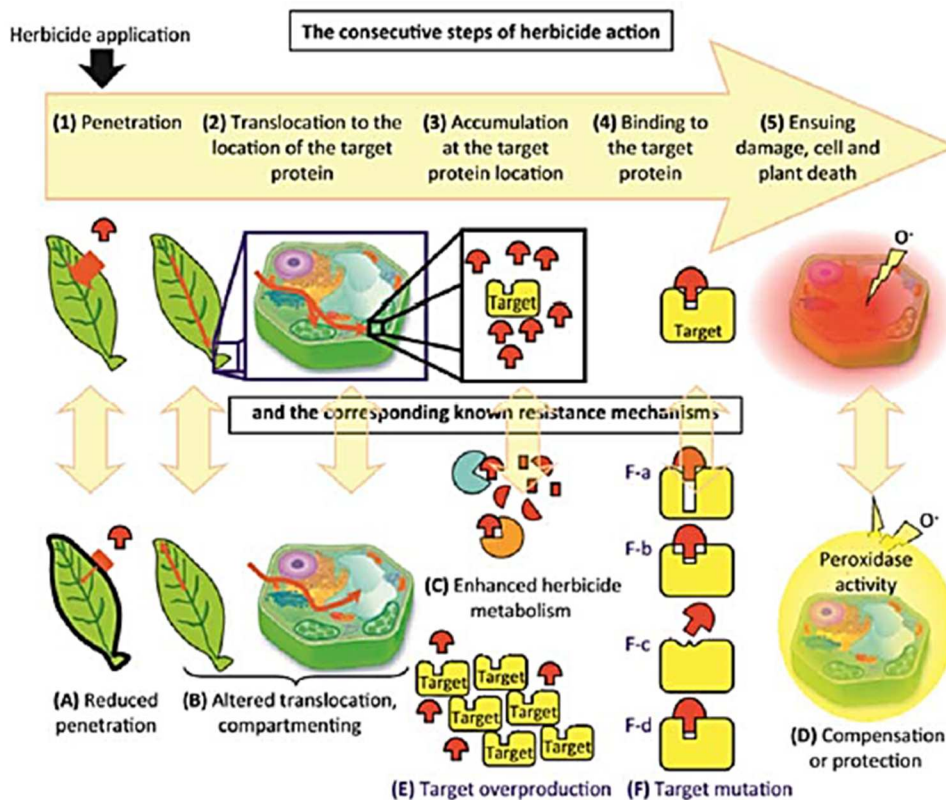


Figura 2. Esquema de los principales tipos de resistencia que presentan las plantas frente a los herbicidas, (Fuente:(Délye et al., 2013).

1.1.4.1. Resistencia por la modificación del sitio de acción (target-site).

Los herbicidas provocan la letalidad de las plantas mediante un efecto primario sobre enzimas que desencadena efectos secundarios. Una modificación en la estructura del enzima, debido a mutaciones en su secuencia aminoacídica, reduciría la afinidad por el herbicida e impediría su unión efectiva y, por tanto, su efecto derivado (Figura 2, F), otorgando así resistencia ante dicho herbicida.

Las mutaciones en la cadena de nucleótidos del enzima diana pueden producir duplicaciones génicas que conlleven una sobreexpresión de la diana que concede resistencia a un determinado herbicida (Figura 2, E).

1.1.4.2. Resistencia debida a cambios en los procesos que intervienen en la acción del herbicida (non target-site).

- **Reducción de la concentración de herbicida en el sitio de acción.**

Para garantizar la efectividad de un herbicida, este debe actuar sobre el centro de acción a una concentración suficiente para resultar letal. Si esta concentración es baja su presencia se reduce en el sitio de acción, que se mantiene activo. Estas bajas concentraciones se pueden

conseguir con una reducción en procesos como la penetración, absorción y translocación del herbicida o con el secuestro de esta molécula en orgánulos celulares metabólicamente inactivos.

– **La absorción del herbicida** depende de si la aplicación se realiza en preemergencia (absorción vía radicular) o en post-emergencia (penetración vía foliar). Cuando la resistencia a herbicidas se produce por falta de absorción por vía radicular se debe a factores morfológicos, como diferencias en la profundidad o estructura anatómica del sistema radicular, así como a factores fisiológicos. La resistencia debida a la falta de absorción por vía foliar dependerá de la cantidad de herbicida adherido a la planta (Figura 2, A). La tolerancia a tratamientos de post-emergencia se asocia a diferencias en la composición en ceras de la cutícula foliar.

– Al igual que en los procesos anteriores de absorción/penetración, la **translocación del herbicida** por el interior vegetal depende de la forma de aplicar el tratamiento herbicida: por vía radicular, el herbicida se moverá según su naturaleza química, es decir, según la acumulación del herbicida no metabolizado en la raíz que impide la translocación de la materia activa a la parte aérea; según la metabolización del herbicida a una forma no traslocable del mismo, como conjugados polares; y según la restricción del movimiento del herbicida al sistema vascular (vasos primarios y secundarios) (Figura 2, B).

Si la aplicación se realiza por vía foliar el movimiento de los herbicidas se clasifica según se transporte por el xilema o por el floema, ya que el transporte de herbicidas por vía xilemática sigue el flujo del agua hacia los márgenes foliares y los espacios intervasculares, mientras que el transporte por vía floemática dependerá del gradiente de concentración de herbicida entre las células del floema y las mesofílicas y de la capacidad del herbicida de quedar retenido en las células floemáticas durante su transporte.

– Otro mecanismo muy eficaz de resistencia a herbicidas se basa en el **secuestro o compartimentación del herbicida** llevado a cabo por la vacuola vegetal. Los casos que han sido descritos en la bibliografía se daban ante la aplicación de herbicidas con acción hormonal e/o inhibidores del PSI. Sin embargo, se desconocen los procesos subyacentes a estos mecanismos de compartimentación.

- **Metabolización a especies no tóxicas.**

Otro tipo de resistencia a herbicidas consiste en la capacidad de degradar el herbicida antes de que éste cause daños irreversibles. Esto se realiza mediante procesos de detoxificación metabólica en los cuales las moléculas fitotóxicas son transformadas en compuestos inocuos.

La velocidad de degradación enzimática depende de factores endógenos y exógenos, como el estadio de crecimiento de la planta, las condiciones climáticas, etc. (Figura 2, C).

La detoxificación metabólica pasa por tres fases: fase I (conversión), fase II (conjugación) y fase III (deposición). Esta división no constituye una regla general ya que alguna de las fases puede no estar presente en todos los procesos de detoxificación. En algunos casos, la molécula herbicida puede ser un pro-herbicida inactivo que debe activarse y, además, algunos procesos de conjugación son reversibles por lo que su efecto no modifica significativamente la cantidad de herbicida libre intracelular.

- **Fase I o conversión:** algunos herbicidas pueden ser conjugados directamente, mientras que otros deben ser convertidos en metabolitos intermedios ya que carecen de sustituyentes disponibles en sus moléculas, como grupos amonio, hidroxilo o sulfhidrilo.

- **Fase II o conjugación:** Los conjugados constituyen los metabolitos finales en los procesos de detoxificación de herbicidas.

- **Fase III o deposición:** La ruta metabólica sobre la que incide el herbicida determina el destino final de los metabolitos terminales y conjugados. Los conjugados glicosídicos se almacenan en la vacuola y los conjugados de origen aminoacídico son excretados a la pared celular y posteriormente integrados en la molécula de lignina, formando un residuo insoluble.

1.2. Ruta del Siquimato.

La ruta del siquimato abarca las reacciones principales de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp), y se compone de siete reacciones enzimáticas.

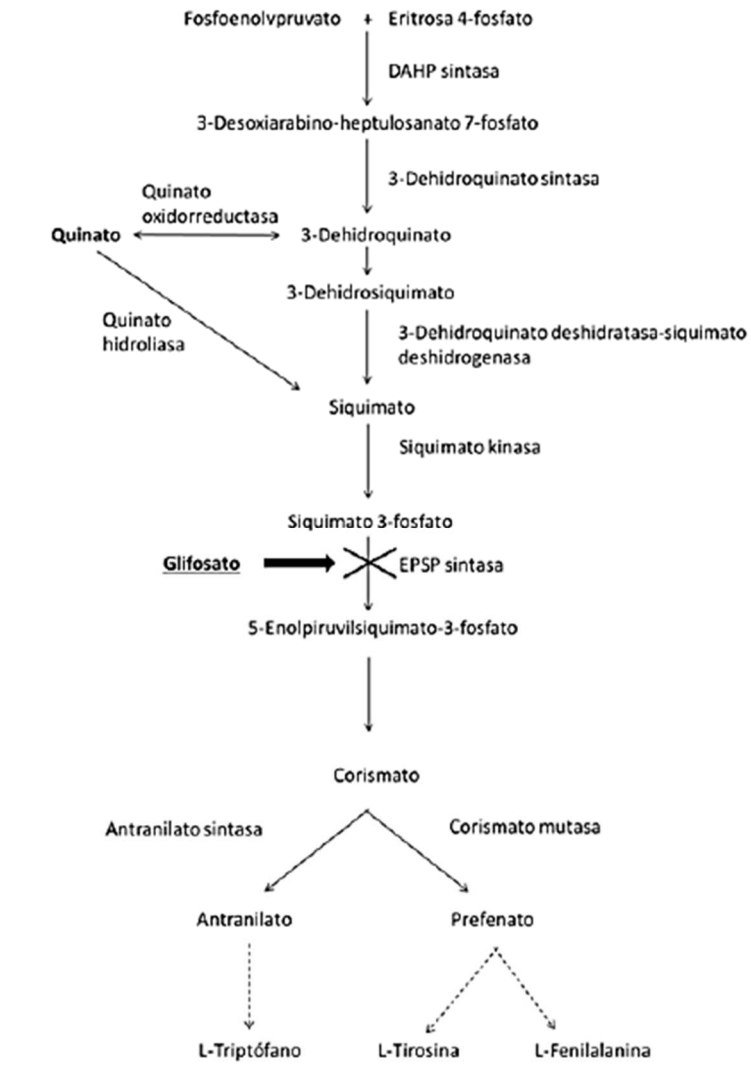


Figura 3. Pasos principales de la ruta del siquimato (Fuente:(Duke and Powles, 2008).

Como se puede observar en la Figura 3, la ruta comienza con una unión de una molécula de fosfoenolpiruvato, PEP, (intermediario en la glicolisis) y otra de eritrosa-4-fosfato (intermediario de la ruta de las pentosas fosfato) y termina al llegar al corismato (precursor de aminoácidos aromáticos).

Los aminoácidos resultantes, así como algunos intermediarios laterales de la propia ruta (Ej. quinato), se utilizan más tarde para sintetizar metabolitos secundarios en los tejidos vegetales.

1.2.1. DAHPS y EPSPS.

El primer enzima de la ruta, que constituye la entrada de carbono en la misma, es el 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-fosfato sintasa o DAHPS. Este enzima lleva a cabo la unión de PEP y Eritrosa-4-fosfato dando lugar a DAHP.

Las DAHP sintasas constituyen un grupo de metaloenzimas que contienen cationes metálicos divalentes (ej. Mg^{2+} o Co^{2+}). Todas ellas poseen en su estructura pequeños dominios periféricos relacionados con la regulación alostérica mediada por aminoácidos aromáticos (Maeda and Dudareva, 2012).

Otro de los enzimas claves en la ruta de siquimato es el Enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa, EPSPS, el cual es diana del herbicida glifosato mayoritariamente utilizado en agricultura y que inhibe este enzima ocupando el sitio de unión de su sustrato PEP.

1.2.2. Quinato.

El ácido quínico, ácido 1, 3, 4,5-tetrahydroxycyclohexanocarboxílico, (Figura 4) es un metabolito sintetizado en una ramificación lateral de la ruta biosintética del siquimato en plantas. Se trata de un compuesto estructuralmente similar al siquimato presente en células vegetales y en algún microorganismo (Boudet, 1973; Yoshida et al., 1975; Orcaray et al., 2010).

A pH fisiológico, el ácido quínico se encuentra en su forma iónica, el quinato.

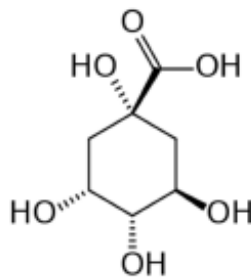


Figura 4. Estructura del ácido quínico ($C_7H_{12}O_6$).

El quinato se encuentra en elevadas concentraciones en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos de plantas herbáceas (Yoshida et al., 1975) y en tejidos jóvenes o en desarrollo de coníferas (Osipov and Aleksandrova, 1986) y frutales. La acumulación de quinato es más significativa en angiospermas, mientras que la de siquimato es característica de gimnospermas (Boudet, 1973). Curiosamente las plantas que acumulan quinato contienen unos niveles de siquimato muy bajos, y viceversa. Ambos compuestos muestran un patrón de acumulación anual con un pico durante el periodo de crecimiento máximo en primavera, debido a las grandes tasas de actividad fotosintética, y un descenso durante el verano. Este patrón bifásico junto con

su redistribución desde las hojas hacia el tronco y las raíces sugieren su papel en el sistema de almacén de carbono como reserva, que posteriormente será utilizado en la síntesis de compuestos fenólicos, como las ligninas (Hoffmann et al., 2004; A. M. Boudet, 2012).

La síntesis de quinato por parte de las plantas se realiza mediante dos enzimas, a partir del dehidroquinato por el enzima dehidroquinato sintasa o a partir del siquimato por el enzima quinato hidrolasa (Orcaray et al., 2010). Esto permite almacenar precursores alicíclicos en forma de quinato cuando el flujo de carbono en la ruta de siquimato es muy elevado.

1.3. Glifosato.

1.3.1. Contextualización.

La primera molécula de glifosato fue sintetizada por Henri Martin, de la Farmacéutica Cilag, pero no fue hasta 1970 cuando John E. Franz de Monsanto verificó su capacidad herbicida.

Desde su introducción comercial en 1974 el glifosato, N-fosfometilglicina, se ha convertido en el herbicida más utilizado a nivel mundial. Siendo la molécula de glifosato, unida a la sal de isopropilamina, la primera molécula comercializada y utilizada en tratamientos de post-emergencia como herbicida no selectivo.

En 1996, con el desarrollo e introducción de los primeros cultivos transgénicos (modificados genéticamente) de maíz, algodón y soja resistentes al glifosato en el mercado (Ej. *Roundup Ready*) se produjo un aumento considerable de este herbicida y aún más de su precio.

Los cultivos mencionados presentaban resistencia al herbicida debido a una sobreexpresión del enzima EPSPS introducida en su genoma, producida por un gen EPSPS insensible a glifosato perteneciente a una cepa A4 de *Agrobacterium*. Estos avances fueron los que permitieron el uso del glifosato en tratamientos post-emergencia para eliminar malas hierbas emergentes (Duke and Powles, 2008).

Hasta esa fecha, el uso de glifosato se utilizaba en agricultura como un remedio tradicional para eliminar de forma no selectiva todas las malas hierbas en pre-siembra o para el control de las malas hierbas en los espacios entre hileras de árboles y viñedos. Con la aparición de los cultivos resistentes al glifosato, el herbicida pasó a utilizarse de forma selectiva, in situ y post-emergente, siendo usado además en cultivos agrícolas anuales.

En la actualidad, los cultivos resistentes al glifosato ocupan más del 90% de los cultivos transgénicos utilizados en todo el mundo. Estas plantas modificadas genéticamente llevan además del gen mencionado anteriormente, un gen de *Ochrobactrum anthropi* que codifica un

enzima glifosato oxidorreductasa, GOX, y produce la degradación de la molécula herbicida en el interior celular, disminuyendo así su incidencia en la ruta diana (Tan et al., 2006).

Hoy en día, se cultivan variedades transgénicas de soja (90%), algodón (70%), colza (75%) y maíz en Estados Unidos, mientras que en España tan solo se permite el cultivo de maíz modificado genéticamente.

El brutal aumento en las últimas décadas del uso del glifosato se debe a la expiración, en el año 2000, de la patente que acotaba la comercialización del producto. El glifosato ha resultado ser menos agresivo para el medioambiente que algunas técnicas tradicionales, como el laboreo, y otros herbicidas a los que sustituye, y ha conllevado a la disminución del uso y quema de combustible fósil en los cultivos glifosato-resistentes. El principal problema del uso de cultivos transgénicos radica no solo en el incremento del uso del glifosato, sino también en el posible flujo de genes de las especies modificadas a las especies silvestres que ha desencadenado la aparición de resistencias a este y otros herbicidas de forma natural.

1.3.2. Mecanismo y modo de acción del herbicida glifosato.

El herbicida glifosato se absorbe rápidamente a través de la superficie foliar, variando las tasas de absorción dependiendo de la especie lo que permite clasificarlas según su sensibilidad. Su mecanismo de absorción principal es la difusión de la molécula de glifosato a través de las cutículas, una vez en el interior se transporta por el floema hasta los tejidos con mayores reservas metabólicas de sacarosa. Esta molécula tiene una tasa de degradación muy baja y su modo de acción lento le otorga una eficacia excelente.

El glifosato constituye el único herbicida que actúa sobre el enzima 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) (Steinrücken and Amrhein, 1980) de la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Este herbicida actúa como sustrato del EPSPS, uniéndose a la proteína de forma análoga al fosfoenolpiruvato (uno de los sustratos verdaderos del enzima). De esta forma impide la unión del enzima con su sustrato y bloquea su actividad lo que conlleva el bloqueo de la ruta y, por tanto, de la síntesis de aminoácidos. La inhibición de dicha proteína desencadena, además, un gran aumento de siquimato-3-fosfato, que se acumula en forma de siquimato en los tejidos de la planta sometida al tratamiento (Duke and Powles, 2008), como se ha podido observar en estudios con aplicación foliar de glifosato (Lydon and Duke, 1988; Becerril et al., 1989; Hernandez et al., 1999; Orcaray et al., 2010; Orcaray et al., 2012)..

Esta acumulación de siquimato puede llegar a suponer de media el 8 % del peso seco de la planta (Orcaray et al., 2010), como se ha observado en soja con un 3 % del peso seco de la

planta (Hernandez et al., 1999), o incluso llegando a alcanzar más del 16 % en otras especies de leguminosas.

A pesar de su amplio y extendido uso aún hoy en día se desconoce con exactitud la causa de la muerte de la planta tras un tratamiento con glifosato, aunque se barajan varias posibilidades como la falta de aminoácidos aromáticos que produce un descenso en la síntesis proteica o el aumento del flujo de carbono debido a la pérdida de la regulación inhibitoria de la ruta, que produce una síntesis excesiva de siquimato y su posterior acumulación (Duke and Powles, 2008).

La aplicación de herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos desencadena también una acumulación de ciertos metabolitos del metabolismo secundario. En concreto se ha podido detectar una importante acumulación de quinato en hojas tras la aplicación de glifosato a través de la solución nutritiva y aplicaciones foliares, incrementándose dicha acumulación a lo largo del estudio (Orcaray et al., 2010; Zulet et al., 2013a).

El glifosato es un herbicida móvil en el floema, por lo que se transporta por toda la planta, y tiende a acumularse en las regiones meristemáticas. Tras la aplicación de glifosato los síntomas fitotóxicos (como clorosis y posterior necrosis en las hojas, malformaciones y necrosis en los meristemas) aparecen lentamente, pudiendo pasar días e incluso semanas hasta darse la muerte de la planta (Gruys and Sikorski, 1999). Por el contrario, los efectos que produce el glifosato en ciertos procesos bioquímicos específicos se pueden observar pasadas unas horas, por ejemplo, la actividad fotosintética tiende a inhibirse de forma gradual debido principalmente a la disminución de la conductancia estomática (Fuchs et al., 2002).

Las primeras investigaciones llevadas a cabo sobre el efecto del glifosato en plantas observaron un aumento de la cantidad de Phe pasados dos días tras el tratamiento, así como, un aumento del contenido de aminoácidos libres totales y una disminución de la proteína soluble (Haderlie et al., 1977).

En otros estudios contemporáneos se obtuvo que el contenido de aminoácidos aromáticos disminuía, mientras que el contenido en aminoácidos libres totales permanecía invariable (Hollander and Amrhein, 1980). Este estudio propuso la existencia de un sistema control homeostático entre diferentes reservas de aminoácidos, autorregulado ante la falta de un aminoácido, pudiendo estimular una mayor degradación de proteínas lo que aumentaría el contenido de ese aminoácido.

En estudios más recientes realizados en plantas de guisante se observó un aumento general en el contenido total de aminoácidos libres a corto plazo así como un descenso en el

contenido de aminoácidos aromáticos (Orcaray et al., 2010; Orcaray et al., 2012; Zulet et al., 2013b).

1.3.3. Resistencia a glifosato.

El uso del glifosato de forma abusiva y sin control durante los últimos 20 años ha propiciado el desarrollo de resistencias de forma natural en diversas especies.

La resistencia a glifosato se puede deber a una amplificación génica del enzima EPSPS por duplicación de genes. Desde hace poco se conoce un nuevo mecanismo de secuestro vacuolar del herbicida, u otros efectos como una rápida necrosis de la hoja que impide se traslocación (Sammons and Gaines, 2014).

La primera variedad de mala hierba resistente a glifosato desarrollada de forma natural fue identificada en 2001, en una población de *Conyza canadensis* procedente de Georgia, Estados Unidos (Sammons and Gaines, 2014). Esta planta tuvo una rápida expansión en varios campos de soja de Estados Unidos, alcanzando los 2 millones de hectáreas infectadas al poco tiempo.

Este problema aplicado a otras malas hierbas más competitivas, como *Amaranthus palmeri*, ha llegado a suponer grandes pérdidas económicas por reducción del rendimiento de cultivos. Esto se ha podido observar en regiones productoras de algodón de Sudamérica con hasta 200.000 ha de campos infestados de *A. palmeri*, *Ambrosia artemissifolia*, *Ambrosia trifida* y *Amaranthus tuberculatus* resistentes a glifosato.

La gran presión de selección ejercida sobre las especies de malas hierbas debido al abusivo uso del herbicida glifosato junto con otros herbicidas con diferente mecanismo de acción ha propiciado el desarrollo de resistencias a otros modos de acción distintos. Este hecho supone que a medida que evoluciona la resistencia al glifosato, las plantas también podrían conservar genes que les otorguen resistencia a otros herbicidas utilizados (Sammons and Gaines, 2014) desarrollando así resistencia múltiple. La resistencia múltiple a diversos herbicidas se observó por primera vez en el año 2006, en Australia y Sudáfrica en una población de *Lolium spp* resistente a glifosato, así como en campos de algodón de Estados Unidos en *Amaranthus palmeri* resistente a glifosato (Tan et al., 2006).

1.3.4. *Amaranthus palmeri* y su resistencia a glifosato.

La especie escogida para el estudio fue *Amaranthus palmeri*. Se trata de una planta dioica anual de alto porte originaria de Sonora y Baja California (México), Arizona y California,

USA (Ehleringer, 1983). Fue descrita por primera vez en una colección de especies de San Diego, CA, por el Dr. E. Palmer (Watson, 1877).

Su amplia y rápida dispersión por el sureste de Estados Unidos ha convertido a esta especie en una de las más competitivas en los cultivos de interés comercial y económico. Su presencia afecta al crecimiento y rendimiento de muchos cultivos, como ocurre en maíz, soja y algodón.

La especie *Amaranthus palmeri* fue la primera mala hierba en la cual se describió la resistencia a glifosato por amplificación génica del gen EPSPS. Este descubrimiento se llevó a cabo en una población procedente de Georgia, USA. Posteriormente, este mismo mecanismo de resistencia se ha identificado en otras especies como *A. tuberculatus* (Lorentz et al., 2014; Chatham et al., 2015), *Lolium perenne ssp. multiflorum* (Salas et al., 2012), *Eleusine indica* (Chen et al., 2015) y *Kochia scoparia* (Wiersma et al., 2015).

La amplificación se debe al aumento del número de copias del gen de EPSPS, lo que implica un mayor nivel transcripcional de EPSPS y, por tanto, un mayor contenido proteico y una mayor actividad enzimática (Gaines et al., 2010). Este mecanismo de amplificación se ha relacionado con transposones o elementos genéticos móviles (Gaines et al., 2013).

El aumento del contenido proteico bloquea los efectos del glifosato supliendo la carencia de aminoácidos aromáticos generada por el herbicida y permitiendo que la planta mantenga su correcto metabolismo (Powles and Yu, 2010). Lo que supone que a mayor número de copias del gen se necesitan cantidades mayores de glifosato para inhibir el enzima EPSPS (Vila-Aiub et al., 2014).

Se ha podido comprobar que este mecanismo de resistencia se hereda en la descendencia (Powles and Yu, 2010) y que esta herencia se encuentra más influenciada por el progenitor femenino, a pesar de que la multiplicación de las copias se amplifica en el genoma nuclear (Ribeiro et al., 2014).

1.4. Justificación del estudio.

En estudios previos, se ha podido observar que la aplicación de herbicidas inhibidores de rutas de biosíntesis de aminoácidos produciría una acumulación de metabolitos intermedios como es el caso del quinato (Orcaray et al., 2010).

Este quinato ha sido utilizado en diversos estudios para comprobar su posible fitotoxicidad al ser aplicado exógenamente, con el objetivo de encontrar nuevos ingredientes activos de origen natural para la obtención de nuevos herbicidas y de esta manera aliviar la

presión de selección generada al abusar de herbicidas con el mismo modo de acción, preservando así el medio ambiente.

Zulet, et al., (2013) observaron que aplicando el quinato exógeno a través de la solución nutritiva por vía radicular el tratamiento resultaba letal para las plantas y, además, simulaba varios cambios fisiológicos detectados tras la aplicación de glifosato. Por el contrario, la aplicación exógena por vía foliar no produce la muerte de la planta ya que los efectos fitotóxicos observados fueron menores y afectaron mayoritariamente al crecimiento.

Una vez comprobada la limitada fitotoxicidad del quinato cuando es pulverizado sobre las hojas, se valoraron sus posibles efectos aplicado conjuntamente con el glifosato. La aplicación de quinato previamente al glifosato parecía reducir el efecto del glifosato aislado, lo que podría sugerir un efecto paliativo del efecto herbicida (Zulet-González, 2014). Resultados similares obtuvo Villanueva, (2016) con la aplicación del quinato de forma simultánea y posterior al herbicida. Sin embargo, las limitaciones en cuanto al crecimiento de las plantas no permiten extrapolar conclusiones fiables por lo que era necesario desarrollar un experimento integrador con todas las posibilidades temporales de aplicación conjunta de quinato y glifosato.

Así, en este Trabajo Fin de Master se aborda la cuestión de establecer el momento apropiado de aplicación del quinato realizando una valoración de su efecto cuando es aplicado en combinación con el glifosato en diferentes momentos de aplicación: previo al herbicida glifosato, simultáneamente y posteriormente, en dos poblaciones de la mala hierba *Amaranthus palmeri*, sensible y resistente al glifosato.

2. OBJETIVOS.

La utilización excesiva de herbicidas, como el glifosato, para el control de malas hierbas ha generado la aparición de resistencias en varias especies vegetales como *Amaranthus palmeri*, que ha desarrollado un mecanismo de resistencia basado en la amplificación génica (posee más copias de la diana EPSPS del glifosato).

Utilizando un compuesto secundario derivado de la ruta del siquimato, el quinato (que se acumula en plantas tratadas con glifosato), se pretende valorar el efecto fitotóxico de dicho compuesto en combinación con el herbicida para observar su posible efecto potenciador.

El objetivo general de este Trabajo de Fin de Máster es valorar la aplicación conjunta de quinato y glifosato en diferentes aplicaciones secuenciales, observando los efectos fitotóxicos producidos a las plantas de dos poblaciones de *Amaranthus palmeri*, una sensible y otra resistente al herbicida.

Los objetivos específicos que se plantearon fueron:

- Valorar el efecto potenciador fitotóxico del quinato sobre el glifosato dependiendo del momento de aplicación: antes, a la vez o después que el herbicida.
- Evaluar la respuesta fisiológica a los distintos tratamientos comparando ambas poblaciones (sensible y resistente) y analizando la respuesta de la regulación de la ruta del siquimato en las plantas tratadas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Material vegetal: *Amaranthus palmeri*.

El ensayo se llevó a cabo con plantas de *Amaranthus palmeri*, una especie vegetal C4 anual dioica originaria de Estados Unidos (Figura 5). Las semillas son de 1 mm de diámetro y de color oscuro.



Figura 5. Detalle de una planta adulta de *Amaranthus palmeri*.

El sistema radical de estas plantas se compone de una raíz pivotante fibrosa con múltiples raíces laterales, lo que le otorga una gran capacidad de absorción de nutrientes y agua. Esto junto con su rápido crecimiento y gran variabilidad la hace una especie muy competitiva con otras de interés comercial clasificándola como una mala hierba (Villanueva, 2016).

En este estudio se utilizaron semillas de *Amaranthus palmeri* de dos tipos, un biotipo sensible y otro resistente al herbicida glifosato, donadas por el Dr. Todd Gaines, Colorado State University, y procedentes de Carolina del Norte, USA.

3.1.1. Siembra, germinación y condiciones de crecimiento.

Previo a la siembra del material vegetal se preparó medio de cultivo agar al 0,65%, que posteriormente se repartió con una jeringuilla entre los distintos *seedholders* colocados en un soporte de plástico con agujeros.

Las semillas se esterilizaron siguiendo el método de Labhilili, et al., (1995) introduciéndolas en una solución compuesta de hipoclorito sódico (1 %, v/v) y SDS (0.01 %, p/v) durante 40 minutos y consecutivamente en otra solución de ácido clorhídrico 0.01 N durante diez minutos. Todo este proceso se realizó en agitación constante gracias a una noria giratoria.

Una vez el agar hubo solidificado, se lavaron las semillas con agua desionizada y se colocó una semilla en cada *seedholder*. Posteriormente, se cubrió el recipiente con papel de aluminio y se guardó en una cámara fría, manteniéndose a 4°C y en oscuridad durante cuatro días.

Pasados estos cuatro días se trasladaron los recipientes a un germinador con un fotoperiodo de 18 horas de luz a 30°C y 6 horas de oscuridad a 18°C durante tres días.

Finalizado el periodo de germinación se colocaron las plantas con agua destilada en un fitotrón, con un fotoperiodo de 18 horas luz / 6 horas de oscuridad, temperatura 22°C / 18°C, humedad relativa 60% / 70%, respectivamente, y una PAR de 600 $\mu\text{mol}/\text{m s}$. Al cabo de una semana se sustituyó el agua por solución nutritiva Hoagland, previamente preparada, y burbujeo por aireación forzada gracias a una bomba de aireación de 1,85 W con flujo de 750 cc/ min, (Figura 6A).

La solución nutritiva utilizada en el cultivo hidropónico se corresponde a la utilizada en el ensayo de Hoagland and Arnon, (1950) enriquecida con KNO_3 15 mM..

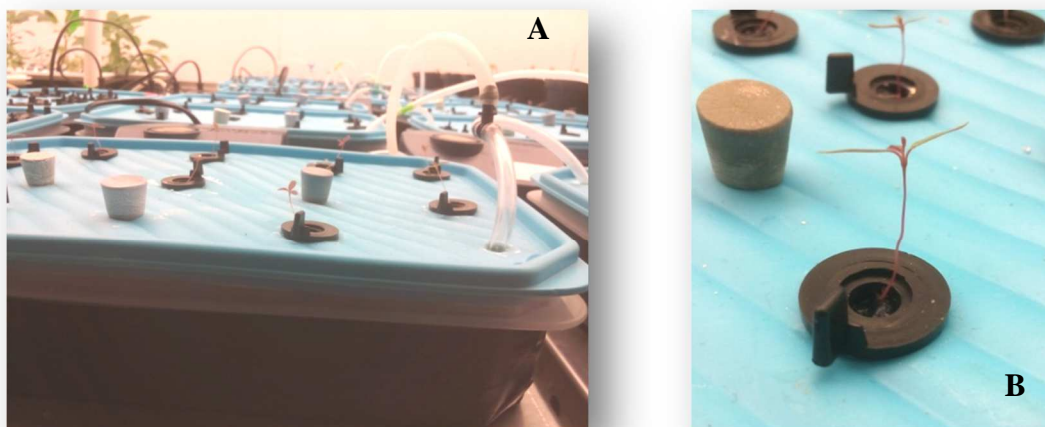


Figura 6. A. Vista de los recipientes con aireación forzada por una bomba colocados en fitotrón.

B. Detalle de un *seedholder* con plántula.

Los recipientes, en donde crecieron las plantas en los *seedholders* (Figura 6B), se componían de un cierre hermético y un recubrimiento de una capa negra fotoaislante para

mantener las raíces en oscuridad y a su vez tratar de impedir el crecimiento de organismos no deseados como algas.

Se colocaron unas 8-9 plántulas por recipiente, cubriendo el resto de agujeros con tapones de corcho como se puede observar en la Figura 6 (A y B), y se rellenaron cada uno por completo con solución nutritiva.

3.1.2. Tratamiento.

Las plántulas se mantuvieron 14 días en el fitotrón con aireación forzada. A los 20 días de edad se procedió a aplicar los distintos tratamientos.

Los tratamientos se aplicaron mediante pulverizado de un volumen de 2.52 ml por cada contenedor, que supuso un volumen de aplicación de (500 L/ha), con ayuda de un aerógrafo conectado a un compresor (Modelo Wetherone, Brevettato, 60W; 10 L/m; 2.5 bar).

Los tratamientos utilizados fueron: “Control”, “Quinato” y “Glifosato” como tratamientos simples y otros tres más combinando glifosato y quinato variando el momento de aplicación, primero el quinato y 24 horas después el glifosato “G+Q Antes”; a la vez “G+Q Simultáneo”; o primero glifosato y 24 horas después quinato “G+Q Después”. Todos los tratamientos constaban de dos recipientes, con unas 7-8 plántulas cada uno.

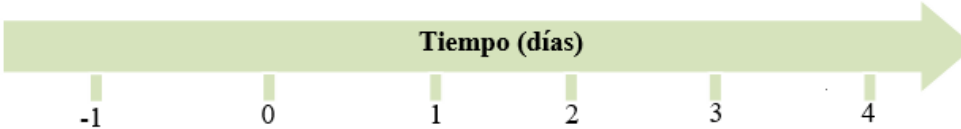
En el caso del tratamiento “Control” se utilizó una solución de Biopower 27.65% (p/v) (Bayer CropScience, Valencia, España) diluido en agua desionizada.

Para los tratamientos con quinato se preparó una solución de quinato 400 mM (76.8 g/L) y para facilitar su absorción se añadió el surfactante Biopower. En estudios previos se ha comprobado el posible efecto fitotóxico temporal de esta dosis de quinato en guisante (Zulet et al., 2013b), por lo que se decidió utilizar la misma.

Las aplicaciones de glifosato se realizaron a partir de una solución comercial con una dosis del herbicida del 36% (p/v) (Bayer Garden Glyfos, Bayer Cropscience, Valencia, España), que no resulta letal para las plantas, para así poder apreciar los posibles efectos potenciadores del quinato. La dosis recomendada en campo es de 0.84 Kg/ha (1.6 g/L) para plantas de más de 46 cm de altura (Culpepper et al., 2006). En este caso se aplicó un cuarto de la dosis para la población sensible 0.21 Kg/ ha y la mitad, 0.42 Kg/ ha, para la población resistente, ya que en estudios realizados anteriormente se pudo observar que a estas a dosis se producía acumulación de siquimato en hojas de plantas sensibles (Fernández-Escalada et al., 2016).

El esquema de aplicación (Tabla 2) que se siguió en ambas poblaciones, sensible y resistente, se estableció en seis días (día -1, día 0, día 1, día 2, día 3 y día 4) de los cuales en los

tres primeros se realizó la pulverización de los tratamientos y en los dos últimos se llevó a cabo un muestreo foliar.



Tratamientos		Tiempo (días)				
Control	-	Biopower	Muestre o	Muestre o	Muestre o	-
Quinato	-	Quinato	Muestre o	Muestre o	Muestre o	Muestre o
Glifosato	-	Glifosato	-	-	Muestre o	-
G + Q Antes	Quinat o	Glifosato	-	-	Muestre o	-
G + Q Simultáneo	-	Glifosato y Quinato	-	-	Muestre o	-
G + Q después	-	Glifosato	Quinato	-	Muestre o	-

Tabla 2. Esquema del momento de aplicación de cada tratamiento y contenido de cada compuesto.

3.1.3. Muestreo.

El día 3, se procedió al muestreo de cada tratamiento de discos de hoja de 4 mm de diámetro obtenidos mediante el uso de un microperforador (Health uni-core, Bucks, UK), introduciendo tres discos por eppendorf, y de hojas enteras preservadas en viales.

Las muestras recolectadas se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C para preservar lo mejor posible el tejido vegetal.

Además, se determinaron los pesos frescos de unas tres hojas por planta y tratamiento. Los pesos secos se obtuvieron tras secar las muestras en estufa de aire recirculado a 75 °C durante 48 horas. Ambos se utilizaron para cálculos necesarios posteriormente en las determinaciones analíticas.

Se mantuvieron plantas de cada tratamiento para poder observar su evolución en los días posteriores y valorar su respuesta a la dosis de herbicida aplicada.

De los viales con las muestras congeladas algunos se mantuvieron intactos para las pruebas destinadas a la determinación de la actividad del enzima EPSPS y el resto se macharon aún congeladas utilizando un microdesmembrador MM200 Retsch. Una vez la muestra adquirió una textura de polvo, se dividieron los viales en alícuotas de 0.1 g para las determinaciones analíticas posteriores.

3.2. Determinaciones analíticas.

3.2.1. Electroforesis desnaturalizante e inmunodetección de DAHPS y EPSPS.

Para la determinación de la cantidad de DAHPS y EPSPS se realizó la técnica de inmunodetección descrita por Hoagland et al., (2013). Se utilizaron las alícuotas de 0.1 g congeladas a -80°C.

El protocolo a seguir se realizó en dos días consecutivos:

- El primer día, se llevó a cabo la extracción con un volumen cuatro veces el peso fresco de cada muestra. Se añadió una solución compuesta de tampón de extracción previamente preparado (MOPS 100 mM, EDTA 5mM, Tritón x 100 1%, Glicerina 10% KCl 50 mM, Benzamidina 1 mM y Iodoacetamida 100 µM), al cual se le añadió en fresco PMSF 1mM y PVPP 1% (p/v).

Tras agitar bien con ayuda de un vórtex, se dejaron reposar las muestras en hielo durante 10 minutos y luego se centrifugaron a 4°C y 18.000 g durante 30 minutos.

El sobrenadante de cada muestra se recogió en un nuevo eppendorf. A partir de la muestra diluida se determinó el contenido de proteína en un lector de microplacas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

Para la electroforesis se utilizó un sistema Mini protean 3, geles homogéneos de poliacrilamida SDS al 12.5% (1mm) y tampón de electroforesis (tris 25mM, glicina 192 mM y SDS al 10% (w/v)). Se mantuvo la electroforesis 15 minutos a 120 V y posteriormente se subió el voltaje a 150 V hasta el final, alrededor de hora y media. Como marcador molecular se utilizó ColorBlust C1992, (Sigma).

La transferencia de proteínas se realizó poniendo cada gel en contacto directo con una membrana PVDF de 0,45 µm, previamente activada con metanol, sumergidos en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20% (v/v)) y sometidos a una corriente continua de 100 V durante 75 minutos.

Una vez finalizada la transferencia, para bloquear las membranas se colocaron en un recipiente con leche en polvo desnatada diluida en TTBS 5% (p/v) y se mantuvieron en agitación hasta el día siguiente.

El gel sometido a la transferencia se colocó en una placa de petri de cristal y se tiñó con azul de Coomassie (GelCode™ Blue Safe Protein, Thermo Scientific, USA).

- El segundo día, se retiró el azul de Coomassie del gel y se realizaron varios lavados con agua destilada hasta eliminar el tinte por completo.

Tras extraer las membranas de la leche, se realizaron tres lavados consecutivos de 15 minutos cada uno con TTBS 1X (TTBS 10%, v/v; Tween-20 0,05%).

La inmunodetección se realizó incubando las membranas con anticuerpo primario. En el caso de la DAHPS, en los geles se cargaron 40 µg de proteína en ambas poblaciones y el anticuerpo primario se utilizó a una dilución 1:1000 durante 1 hora (Orcaray et al., 2011). El anticuerpo primario fue producido por la empresa Biogenes (Berlin, Alemania) a partir de una secuencia de aminoácidos de DAHPS de alfalfa mediante un programa de predicción de epítomos específicos. Este programa predice bucles o zonas de giro con aminoácidos hidrofílicos y aminoácidos que rompen la estructura beta-plegada o alfa-hélice y que suelen estar expuestos al disolvente en la estructura terciaria y pueden proporcionar excelentes epítomos. El anticuerpo se realizó frente a los siguientes péptidos sintéticos: **AAA93479 C-QFAKPRSDSFEEKN**.

Para la inmunodetección de EPSPS, en los geles se cargaron 15 µg de proteína para las muestras de la población resistente y 80 µg para las de la población sensible. El anticuerpo primario utilizado fue antiEPSPS con una dilución 1:2000, producido por la empresa Agrisera AB (Vännäs, Suecia) a partir de secuencias de aminoácidos (193-206) de EPSPS de *A. palmeri* (Gen Bank accession no. FJ861242).

Pasado el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados consecutivos de 15 minutos cada uno con TTBS 1X.

La segunda incubación se realizó con anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución 1:20000 durante una hora. Tras realizar los últimos tres lavados se procedió a revelar las bandas proteicas de la membrana con un Kit de revelado (Kit Biotin; Biorad) con nitro bluetetrazolium y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT/bCIP) como sustratos, manteniéndolo en oscuridad y agitación.

Una vez las bandas se hicieron visibles, se escanearon las membranas y se cuantificó la cantidad de proteína en cada banda con un densitómetro GS 800 (Bio-Rad Laboratories).

3.2.2. Cuantificación de la actividad enzimática de EPSPS.

La cuantificación de la actividad enzimática de EPSPS se realizó con el método de Gaines et al., (2010) con algunas modificaciones.

A los viales recogidos en el muestreo y congelados a -80°C con las muestras intactas sin machacar se les añadió tampón de extracción (MOPS 100 mM, EDTA 5 mM, KCl 5 mM, Glicerol 10% (v/v), Benzamidina 0.5 mM, Pepstatina 7.3 μM , Leupeptina 4.2 μM , Inhibidor tpsina 2.5 mg), al cual se le hubo adicionado en fresco PVPP 1% (p/v) y Mercaptoetanol 7% (manejado en campana de extracción de gases).

Tras machacar y homogeneizar las muestras con el mortero, previamente enfriado en el frigorífico, se filtraron con papel Miracloth y se centrifugaron 40 minutos a 4°C y 7.500 g. El sobrenadante resultante se utilizó para realizar dos precipitaciones consecutivas con sulfato amónico, del 0 al 45% y del 45 al 70%.

En la primera precipitación, 0-45%, se añadieron los gramos de sulfato amónico calculados en función del volumen de cada muestra y posteriormente se centrifugaron a 10 000 g y 4°C durante 30 minutos. De la misma forma, se recogió el sobrenadante y se realizó la segunda precipitación con sulfato amónico, 45-75%. En este caso, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en tampón de resuspensión (MMOPS 10 mM, EDTA 0.5 mM y Glicerol 5 % (v/v)).

En el siguiente paso del protocolo, se realizó el desalado mediante la centrifugación de las muestras en columnas Zeba Spin Desalting Columns and Devices, 7 K MWCO (Thermo Scientific; Pierce) a 1000 g y 4°C durante 2 minutos.

Una vez obtenido el extracto desalado, se obtuvo la cantidad de proteína soluble mediante el método Bradford (Bradford, 1976) y posteriormente se midió la actividad EPSPS determinando la liberación de fosfato mediante una lectura enzimática en un lector de microplacas, acoplando la reacción EPSPS a un kit de detección de fosfato (Enz Check Phosphate Assay kit E-6646; Molecular Probes). En cada pocillo se añadieron tampón de reacción (MOPS 100 mM, Mg_2Cl 10 mM, Glicerol 10 % (v/v), $\text{Na}\square\text{MoO}_4$ 2 mM y NaF 200 μM), MESG (2-amino-6-mercapto-7-metil-purinariboside) 1 mM, PNP (purine-nucleosidephosphorylase) 100 Units/mL, un volumen de agua miliQ hasta alcanzar los 250 μL por pocillo, PEP (fosfoenolpiruvato) 50 mM, y los μL de proteína determinados tras el desalado de las muestras en función de la concentración de proteína de cada muestra. En la población sensible se necesitaban 12.5 μg de proteína EPSPS por pocillo, mientras que en las resistentes tan solo 1.25 μg .

Tras preparar la microplaca, se midió la absorbancia a 360 nm de forma continua durante 10 minutos, en un lector de microplacas a 25°C. Cuando se obtuvieron los datos sin sustrato se añadió siquimato-3-fosfato (S3P, 10 mM) a cada pocillo y se realizó la medida con sustrato durante 5 minutos.

3.2.3. Determinación del contenido de quinato.

Al realizar el muestreo de las hojas tratadas con quinato aislado, se procedió a eliminar el quinato residual que no fue absorbido por la superficie foliar con un paño mojado. De esta forma se podrán apreciar las diferencias de quinato producido en la ruta tras los distintos tratamientos, evaluando su contenido en las hojas mediante su comparación con las plantas control.

La determinación del contenido de quinato se realizó a partir de alícuotas de 0.1 gramos, congeladas previamente a -80°C.

En primer lugar, se preparó TCA al 5% que posteriormente se añadió a cada eppendorf con las muestras y, tras agitar con un vórtex, se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 2500g (Orcaray et al., 2010).

El sobrenadante resultante se recogió en un tubo de plástico y se lavó tres veces sucesivas con dietiléter saturado con agua (proceso realizado en la campana de extracción de gases). En cada lavado se añadió dietiléter saturado a cada tubo y se agitó con un vórtex, tras lo cual se recogió el éter que quedaba en la parte superior con una pipeta pasteur.

Al finalizar el tercer lavado se burbujeó la muestra con Helio durante 2 minutos para eliminar el éter residual que pudiera quedar y se vertió el contenido limpio en eppendorfs que fueron congelados a -20 °C para su posterior medida.

El contenido de quinato se determinó por cromatografía iónica empleando un METROHM 940 Professional IC Vario con detector de conductividad. Se empleó una columna supresora Metrosep A supp 16 150/4'0 y otra columna MetrosepA supp 16 Guard 4'0.

El flujo fue de 1 ml/min y se emplearon distintos eluyentes: agua ultrapura (A), NaOH 60 mM (B) en gradiente: 90 % B en A del minuto 0 al 10; 0 % C en A del minuto 18 al 26, y 90 % de A del minuto 28 al 40; 10 % B del minuto 0 al 10; 100 % B en A del minuto 18 al 26, y 10% de nuevo de B del minuto 28 al 40. La concentración de quinato se expresó como µg de quinato/ g PF

3.2.4. Determinación del contenido de siquimato.

Los extractos utilizados para la determinación del contenido de siquimato se obtuvieron a partir de las muestras de discos de hoja recogidas y congeladas.

La extracción de siquimato se realizó según el método de Shaner, et al., (2005) con muestras congeladas en eppendorfs a los cuales se les añadió HCl 0,25 N a cada uno. Tras agitar los eppendorfs con ayuda de un vórtex, se colocaron en la noria giratoria durante una hora y treinta minutos y posteriormente se congelaron a -20°C.

Para el análisis de la concentración por determinación espectrofotométrica se siguió el protocolo descrito por Cromartie and Polge, (2000) tomándose alícuotas de cada extracto e introduciéndolas en los pocillos de una placa de microplacas. Posteriormente, se añadió una disolución de ácido periódico:metaperiodato (0.25%/0.25%, p/v) a cada pocillo y se mantuvo la placa en oscuridad durante una hora.

Pasado este tiempo, se añadió hidróxido de sodio (NaOH): sulfito de sodio (0.6M /0.22M) en cada pocillo y se midió la absorbancia a 380 nm en un lector de microplacas.

Para poder extrapolar las concentraciones de siquimato se realizó una recta patrón estándar a distintas concentraciones: 0, 5, 10, 20, 40, 80 y 160 mM de ácido siquímico y se expresaron en unidades de µg de siquimato por disco de hoja.

3.2.5. Determinación del contenido en aminoácidos libres.

La determinación del contenido de aminoácidos libres se realizó mediante la toma de muestras, previamente reducidas a polvo y alicuotadas, con 0.1 g almacenados a -80 °C. Dichas muestras fueron homogeneizadas en un volumen de 1.5 ml de HCl 1 M, vertiendo el contenido en un tubo donde se dejó reposar 10 minutos en hielo. A continuación, se procedió a centrifugar las muestras a 20.000 g durante 10 minutos a 4 °C.

El sobrenadante se recogió en un eppendorf y fue neutralizado hasta un pH de 7-8 con NaOH (1M y 0,5M) y HCl (1M.). Tras apuntar el volumen final de cada extracto, se conservaron a -20 °C hasta su utilización en la determinación de aminoácidos libres.

En la determinación del contenido en aminoácidos libres de los extractos se utilizó un equipo de electroforesis capilar BeckmanCoulter PA-800 (Beckman Coulter Inc., CA, USA) compuesto por un capilar de sílice fundida de 50 µm de diámetro y de longitud 43/53.2 cm. El método fue descrito por Arlt et al. (2001). Se utilizó un tampón compuesto por una solución de bórax 50 mM y α-ciclodextrina 45 mM, pH 9.2 y las condiciones de análisis se dieron a un

voltaje de 30 kV y 20 °C. El contenido de aminoácidos se expresó como $\mu\text{mol aminoácido/ g PS}$.

3.3. Análisis estadístico.

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa Statistix 8.

Los resultados obtenidos en cada prueba se evaluaron aplicando un análisis de varianza (ANOVA) simple a cada población por separado utilizando como variable el tratamiento, para los resultados significativamente diferentes para una $P \leq 0.05$ se indicaron en gráficas con letras diferentes para cada tratamiento, mientras que la comparación de medias se realizó con la prueba del Test de Tukey HSD.

La comparación de medias se realizó mediante un test T de Student para muestras independientes considerando varianzas iguales.

4. RESULTADOS.

El ensayo se llevó a cabo con plantas de dos poblaciones de *Amaranthus palmeri*, una sensible y otra resistente, a las cuales se les aplicó un tratamiento con el herbicida glifosato y un ácido orgánico, el quinato, de forma conjunta y aislada para observar el comportamiento de esta especie ante dichos tratamientos y valorar el efecto del quinato como posible potenciador de la toxicidad del herbicida.

Tres días después de aplicar los tratamientos, se evaluaron los efectos macroscópicos producidos debido a la aplicación de quinato y glifosato, de forma aislada y conjunta (24 horas antes, simultáneamente ó 24 horas después) como pueden observarse en la Tabla 3.

Cada población de estudio, ambas *Amaranthus palmeri*, resistente o sensible recibió una dosis de glifosato diferente, y que fue superior en el caso de la población resistente, elegida según estudios previos para causar una toxicidad suficiente no letal que permitiera observar si el efecto del quinato potencia el del glifosato (Zulet-González, 2014; Villanueva, 2016).

4.1. Resultados visuales y evaluación de la letalidad en las plantas tratadas.

La alteración del crecimiento y/o desarrollo vegetal de las plantas debido al tratamiento resultó ser difícil de evaluar debido a la alta heterogeneidad de *A. palmeri* que, al ser una hierba silvestre no cultivada, presenta un crecimiento desigual y muy heterogéneo en cada plántula bajo las mismas condiciones.

En la Tabla 3 puede observarse el estado de las plantas de cada población habiendo sido sometidos a tratamientos simples de “Control”, “Quinato” y “Glifosato”. El estado de las plantas tratadas con los tratamientos combinados de quinato y glifosato se muestra en la Tabla 4. En las dos tablas se puede comprobar que ambas poblaciones no se mostraban significativamente afectadas por ninguno de los tratamientos aplicados debido principalmente a que la evaluación se realizó en un tiempo relativamente breve de solo tres días y las dosis aplicadas de glifosato eran bajas.







	Población	
Tratamientos simples	Sensible	Resistente
Control		
Quinato		
Glifosato		

Tabla 3. Aspecto macroscópico de los tratamientos simples en las dos poblaciones, sensible y resistente, de *Amaranthus palmeri* pasados tres días desde la aplicación.

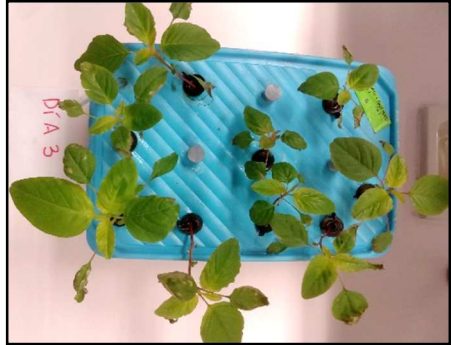





	Población	
Tratamientos combinados	Sensible	Resistente
Glifosato + Quinato antes		
Glifosato + Quinato simultáneo		
Glifosato + Quinato después		

Tabla 4. Aspecto macroscópico de los tratamientos combinados en las dos poblaciones, sensible y resistente, de *Amaranthus palmeri* pasados tres días de la aplicación.

Tanto en la población sensible como en la población resistente se pudo observar que las hojas de las plantas del tratamiento “Control” aparecen con franjas grisáceas cenicientas como quemadas (Tabla 5) que serían efecto del propio surfactante.




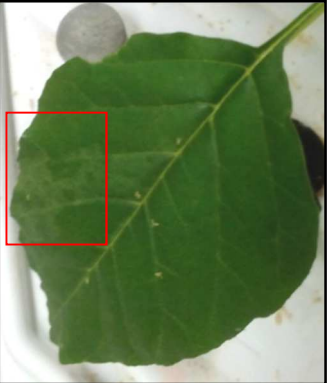

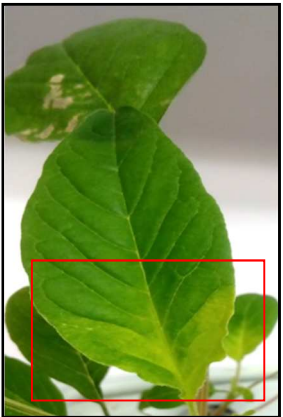
Tratamiento	Población	
	Sensible	Resistente
Control		
Quinato		
Glifosato		

Tabla 5. Detalle de hojas de ambas poblaciones sometidas a los distintos tratamientos aislados: “Control”, “Quinato” y “Glifosato”.

En cuanto al tratamiento con quinato, en la población sensible mostró unas quemaduras similares, pero más grandes que en el tratamiento “Control” y con enrollamiento del ápice de hoja; mientras que en la población resistente tan solo en la superficie foliar aparece una mancha con un color menos intenso (recuadro rojo, Tabla 5).


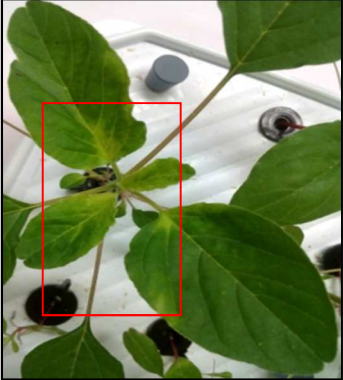

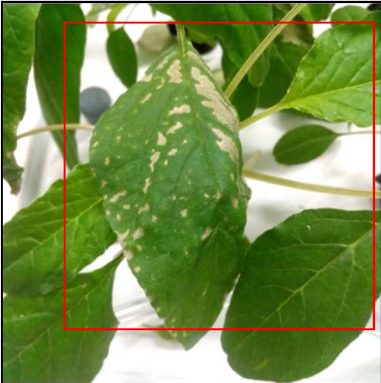
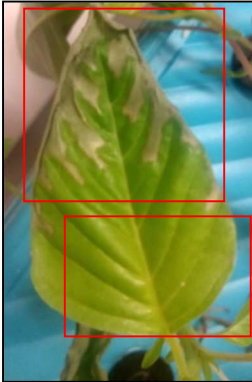

Tratamiento	Población	
	Sensible	Resistente
G+Q Antes	 <p>Close-up of a leaf from the sensitive population before G+Q treatment. A red box highlights a large, yellowish-brown necrotic area on the leaf surface.</p>	 <p>Close-up of a leaf from the resistant population before G+Q treatment. A red box highlights a small, dark spot on the leaf surface.</p>
G+Q Simultáneo	 <p>Close-up of a leaf from the sensitive population during simultaneous G+Q treatment. A red box highlights a large, irregular necrotic area.</p>	 <p>Close-up of a leaf from the resistant population during simultaneous G+Q treatment. A red box highlights a large, irregular necrotic area.</p>
G+Q Después	 <p>Close-up of a leaf from the sensitive population after G+Q treatment. Two red boxes highlight large, irregular necrotic areas.</p>	 <p>Close-up of a leaf from the resistant population after G+Q treatment. Two red boxes highlight large, irregular necrotic areas.</p>

Tabla 6. Detalle de hojas de ambas poblaciones sometidas a los distintos tratamientos combinados: “G+Q Antes”, “G+Q Simultáneo” y “G+Q Después”.

Los tratamientos con glifosato, tanto aplicado de forma aislada como combinado con quinato, produjeron cierta clorosis en ambas poblaciones aunque más acentuada en aquellas plantas pertenecientes a la población sensible (síntomatología propia del herbicida utilizado), como se puede observar señalado en los cuadros rojos en la Tabla 5 para el tratamiento “Glifosato” y en la Tabla 6 para los tratamientos combinados. A simple vista el tratamiento que mayor efecto macroscópico tuvo fue “G+Q Después”, aplicando quinato posteriormente al glifosato (Tabla 6).

De todos los tratamientos se mantuvieron unos cuantos individuos para valorar los efectos a largo plazo de los tratamientos y comprobar si alguno resultaba letal.

Se pudo apreciar que la población resistente recuperaba su tasa de crecimiento habitual unos días tras el tratamiento y no se podían apreciar efectos en el estado de las plantas. Por el contrario, en la población sensible se observó que, mientras que las plantas de los tratamientos “Glifosato” y G+Q Simultáneo” sobrevivían, los tratamientos “G+Q Antes” y “G+Q Después” resultaron letales (recuadro rojo Figura 7).



Figura 7. Estado de las plantas pertenecientes a la población sensible pasados 15 días tras el fin del muestreo (de izquierda de derecha: “G+Q Simultáneo”, “G+Q Antes”, “G+Q Después” y “Glifosato”). El cuadro rojo señala los tratamientos “G+Q Antes” y “G+Q Después”, respectivamente, que resultaron letales.

4.2. Efectos del tratamiento sobre la diana del herbicida glifosato.

Para valorar los efectos de los tratamientos sobre la diana del herbicida se determinó por un lado la cantidad de proteína EPSPS por inmunodetección y por otro la actividad in vitro por espectrofotometría.

En la Figura 8 se puede observar el contenido en proteína EPSPS obtenido tras la inmunodetección.

En la población sensible la medida de la cantidad de EPSPS obtuvo una tendencia ligera al aumento de la proteína tras el tratamiento con glifosato aislado (Figura 8) si bien este incremento no fue estadísticamente significativo en comparación con el resto de tratamientos.

Los resultados obtenidos tras realizar la densitometría en la población resistente (Figura 8) parecen indicar que todos los tratamientos tendrían una cantidad de proteína EPSPS por debajo del control y el tratamiento simultáneo “G+Q Sim” contendría menor cantidad aún de proteína que el resto, siendo este último significativamente distinto del “Control”.

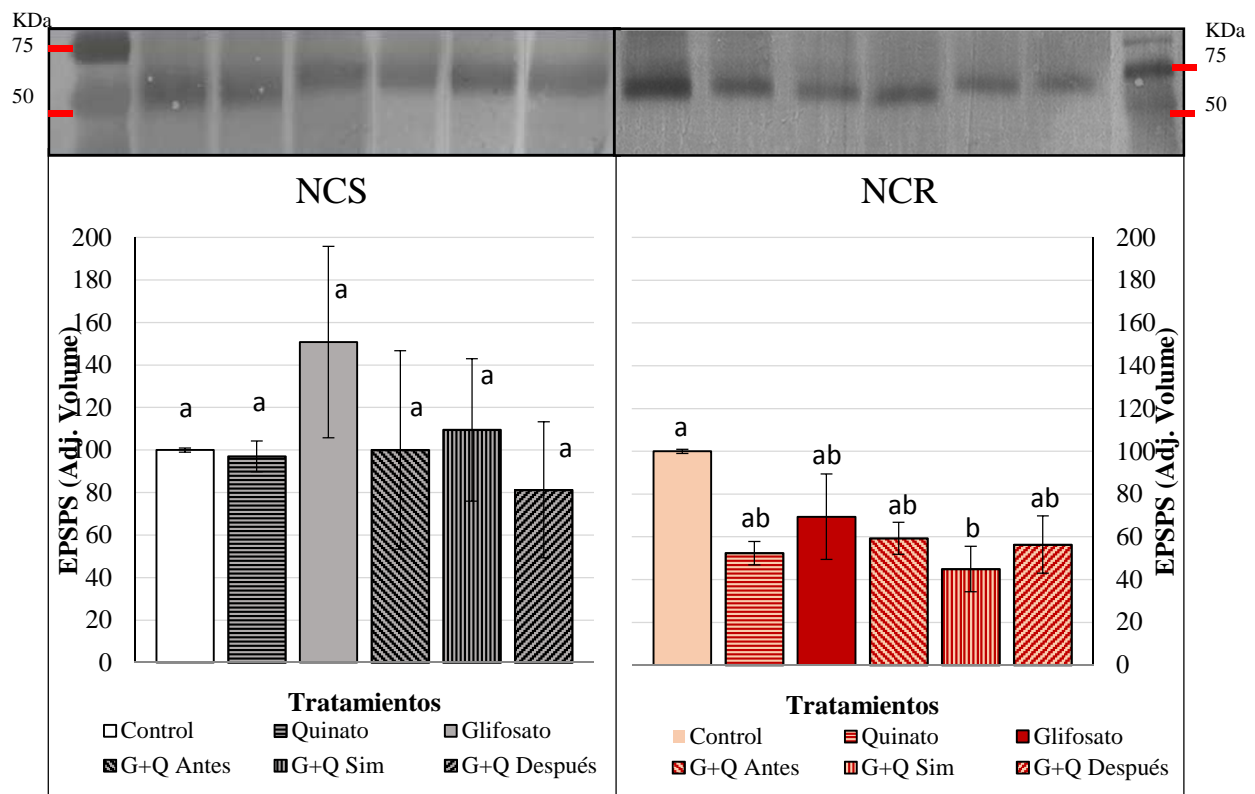


Figura 8. Niveles de EPSPS en hojas de plantas pertenecientes a la población sensible, derecha, y resistente, izquierda. Las plantas de *Amaranthus palmeri* fueron pulverizadas con quinato y con 0,4 g/L de glifosato la población sensible (NC-S) y con 0,8 g/L de glifosato la población resistente (NC-R). El quinato fue aplicado un día antes, a la vez o un día después del glifosato. Media \pm ES (n=3). Para cada población, diferentes letras indican diferencias significativas para $p < 0.05$. En la parte superior se muestran las imágenes de dos membranas representativas.

El nivel basal de proteína en ambas poblaciones es distinto ya que la población resistente debido a la amplificación génica tiene un mayor contenido de esta enzima. De hecho, la inmunodetección se realizó con diferente carga de proteína por pocillo según la población (15 μ g para la población sensible y 80 μ g para la población resistente). Por lo que se observa que

en el tratamiento “Control” de la población resistente la actividad enzimática basal es mucho mayor a la de la población sensible (Figura 9).

En la población sensible se obtuvo una actividad enzimática similar en todos los tratamientos (Figura 9) salvo en el tratamiento “G+Q Después”, el cual presentó una actividad enzimática significativamente mayor al resto con mucha variabilidad. En la población resistente no se obtuvieron diferencias significativas con respecto al “Control”. Sin embargo, si pudo observarse cierta tendencia decreciente en los tratamientos con quinato frente al “Control” y “Glifosato”, en concordancia con lo que ocurría con la cantidad de proteína.

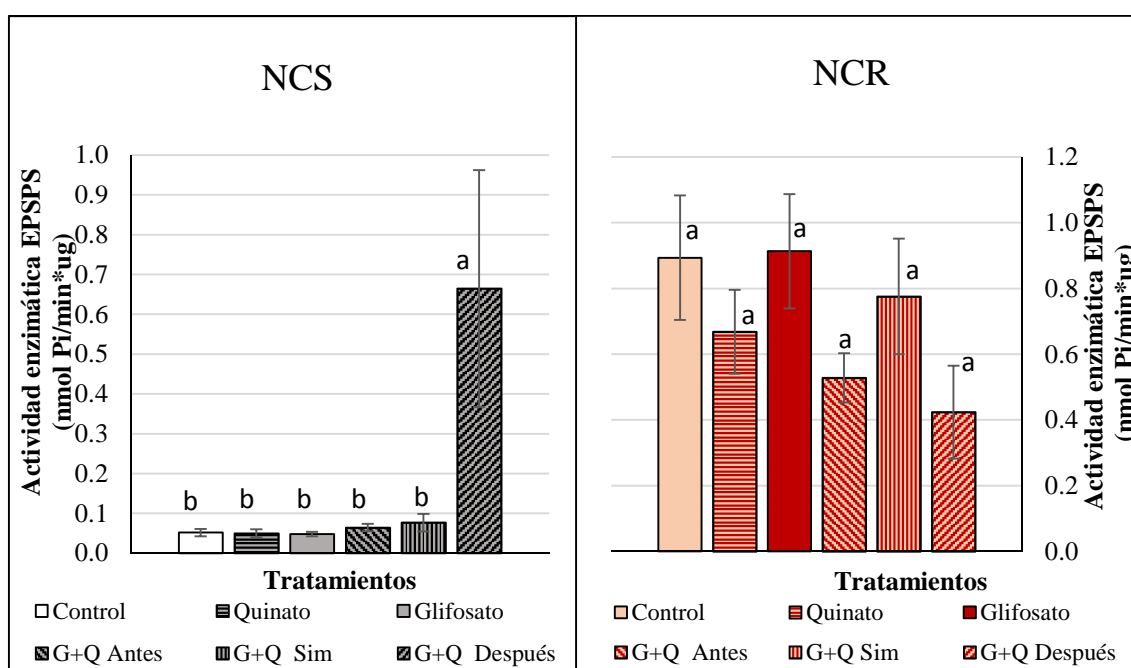


Figura 9. Actividad enzimática de la proteína EPSPS en hojas de plantas pertenecientes a ambas poblaciones, (izquierda población sensible/ derecha población resistente), sometidas a los distintos tratamientos. Las plantas de *Amaranthus palmeri* fueron pulverizadas con quinato y con 0,4 g/L de glifosato la población sensible (NC-S) y con 0,8 g/L de glifosato la población resistente (NC-R). El quinato fue aplicado un día antes, a la vez o un día después del glifosato. Media \pm ES (n=3). Para cada población, diferentes letras indican diferencias significativas para $p < 0.05$.

4.3. Efectos del tratamiento sobre los parámetros anteriores a la diana.

4.3.1. Inmunodetección de DAHPS.

Para valorar el efecto del herbicida y del quinato, de forma aislada o en combinación, sobre otros puntos de la ruta del siquimato, se observó su efecto sobre la cantidad de proteína DAHPS. Esta proteína es el primer enzima de la ruta del siquimato, que marca el flujo de carbono de entrada a la misma a partir del PEP y de eritrosa-4-fosfato.

Se puede observar en la Figura 10 que tanto en la población sensible como en la población resistente las diferencias entre los tratamientos no resultan significativas en comparación con el “Control”.

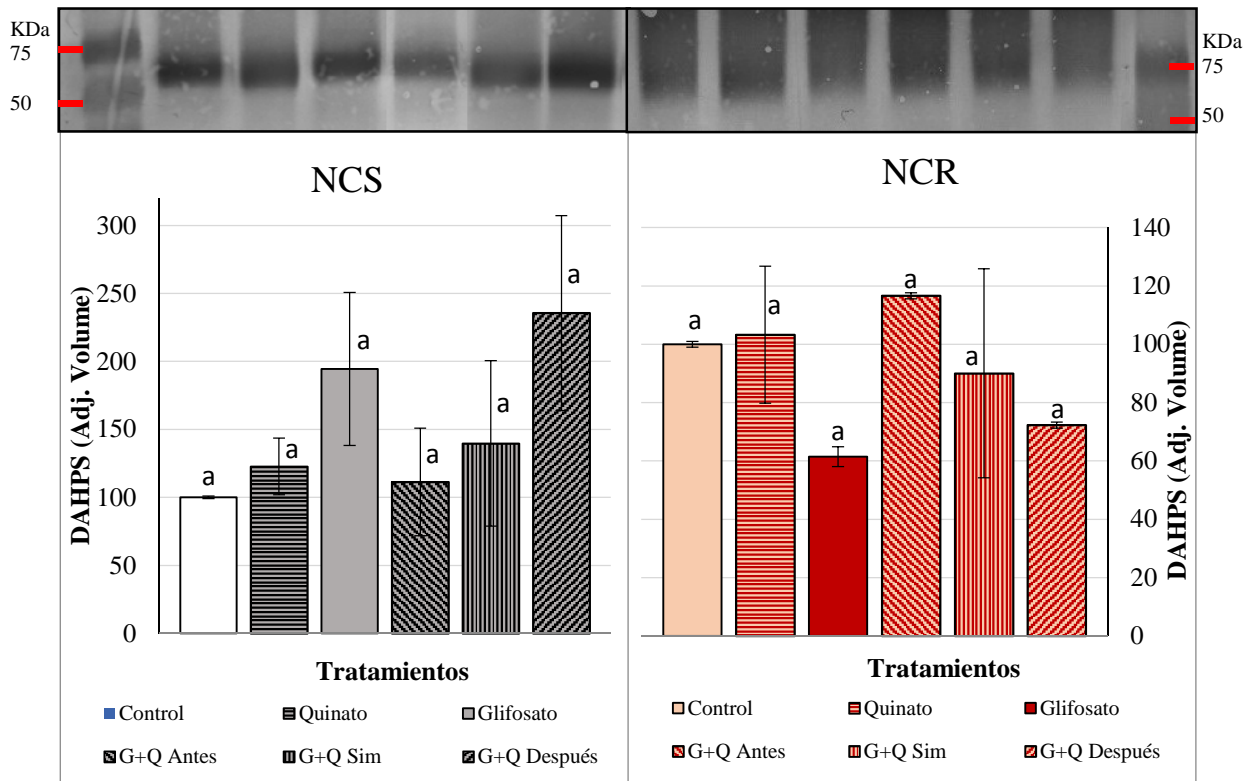


Figura 10. Niveles de DAHPS en hojas de plantas pertenecientes a la población sensible, derecha, y resistente, izquierda. Las plantas de *Amaranthus palmeri* fueron pulverizadas con quinato y con 0,4 g/L de glifosato la población sensible (NC-S) y con 0,8 g/L de glifosato la población resistente (NC-R). El quinato fue aplicado un día antes, a la vez o un día después del glifosato. Media \pm ES (n=3). Para cada población, diferentes letras indican diferencias significativas para $p < 0.05$. En la parte superior se muestran las imágenes de dos membranas representativas.

Aun no siendo significativa, se puede observar una tendencia similar en ambas poblaciones en cuanto al tratamiento “Quinato”, que no aumenta el contenido con respecto al control, y contraria para el tratamiento con glifosato, de forma aislada, siendo esta aparentemente creciente para la población sensible y decreciente para la población resistente.

4.3.2. Contenido en quinato.

La Figura 11 muestra los efectos del tratamiento aislado de quinato sobre el contenido de quinato en la hoja durante los días de muestreo en ambas poblaciones. Es importante valorar

la variación del contenido de quinato debido a que en el momento final del muestreo las plantas de los diferentes tratamientos habían estado diferentes espacios de tiempo con quinato exógeno.

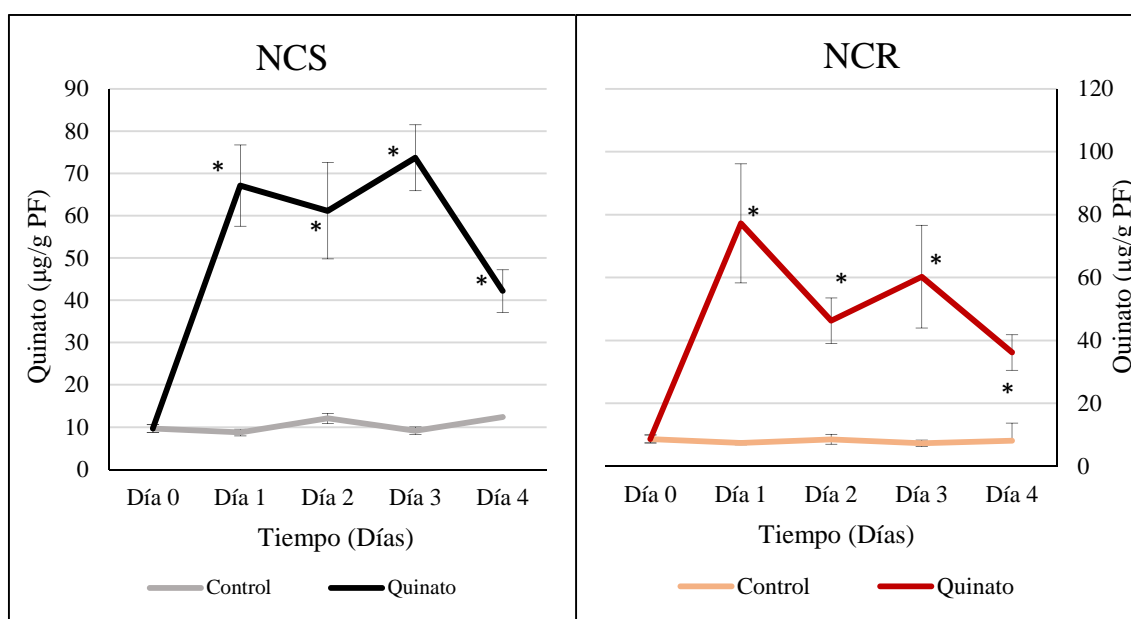


Figura 11. Contenido de quinato en hojas a lo largo del tiempo de estudio tras el tratamiento con quinato aislado, (derecha población sensible/izquierda población resistente). Las plantas de *Amaranthus palmeri* fueron pulverizadas con quinato Media \pm ES (n=4). * Indica diferencias significativas entre los tratamientos para ese día del estudio para $p \leq 0.05$.

Previo al tratamiento, a Día 0, se muestrearon hojas de cada población para tener un valor basal de referencia. Tanto en la población sensible como en la población resistente se pudo observar cómo el contenido de quinato aumentó bruscamente tras el tratamiento con dicho compuesto.

Posteriormente, la acumulación de quinato parece estabilizarse y descender levemente en el último día de muestreo. Las diferencias en las dos poblaciones entre ambos tratamientos a lo largo del tiempo resultaron estadísticamente significativas.

Por otro lado, se valoró el contenido de quinato en hojas pasados tres días en todos los tratamientos.

Mientras que la aplicación exógena de quinato de forma aislada aumenta considerablemente la acumulación de este compuesto en las hojas (Figura 12) en la población sensible, los tratamientos combinados apenas difieren del resultado de la aplicación de quinato aislado ya que no parecen diferencias significativas, pero se pudo observar una ligera tendencia al aumento por parte del tratamiento “G+Q Sim”.

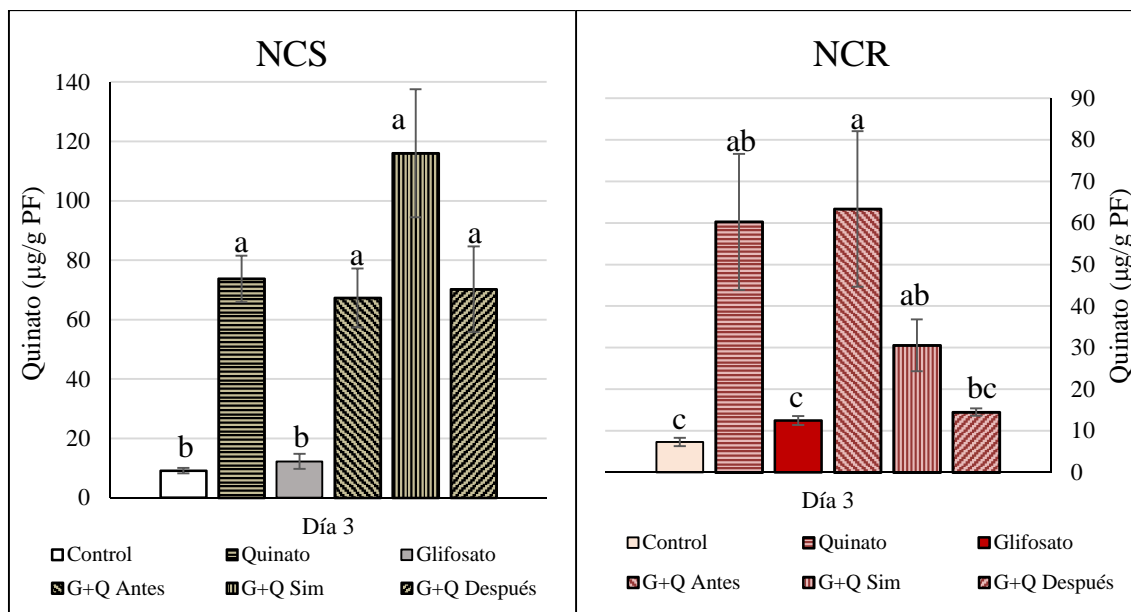


Figura 12. Contenido de quinato en hojas sometidas a los distintos tratamientos, (Izquierda población sensible/ derecha población resistente). Las plantas de *Amaranthus palmeri* fueron pulverizadas con quinato y con 0,4 g/L de glifosato la población sensible (NC-S) y con 0,8 g/L de glifosato la población resistente (NC-R). El quinato fue aplicado un día antes, a la vez o un día después del glifosato. Media \pm ES (n=4). Para cada población, diferentes letras indican diferencias significativas para $p < 0.05$.

El contenido de quinato en la población resistente (Figura 12) presentó un patrón similar en el caso del tratamiento “Quinato”, que superó el contenido obtenido en los tratamientos “Control” y “Glifosato”. De los tratamientos combinados, el tratamiento que alcanzó un contenido similar al tratamiento aislado de quinato fue el “G+Q Antes”. Los tratamientos combinados “G+Q Sim” y “G+Q Después” no presentaron diferencias significativas, aunque si una cierta tendencia de aumento en el tratamiento simultáneo.

4.3.3. Contenido en siquimato.

La inhibición del enzima EPSPS producida por el herbicida produce una gran acumulación de siquimato en hojas (Orcaray et al. 2011) que se produce antes de que el enzima EPSPS sea bloqueado totalmente por el herbicida. Según la cantidad de siquimato que se acumule, se pueden establecer patrones de sensibilidad o resistencia al herbicida en distintas poblaciones. De esta manera, la acumulación siquimato en hojas se utiliza como marcador del nivel de toxicidad que produce el herbicida en la planta.

En el ensayo desarrollado se valoró si los niveles basales de acumulación de siquimato tras el tratamiento con glifosato se veían o no alterados por la aplicación conjunta de quinato en distintos momentos y en las dos poblaciones, sensible y resistente.

Los resultados obtenidos en la población sensible mostraron que la aplicación de quinato de forma individual mantiene un contenido de siquimato similar al obtenido en el “Control”. Se observó un aumento de siquimato en hojas, ya que sus niveles aumentaron hasta 26 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de hoja, tres días después de aplicar el tratamiento con glifosato. Los tratamientos combinados de quinato y glifosato mostraron un incremento similar en el contenido de siquimato con diferencias no fueron significativas (Figura 13).

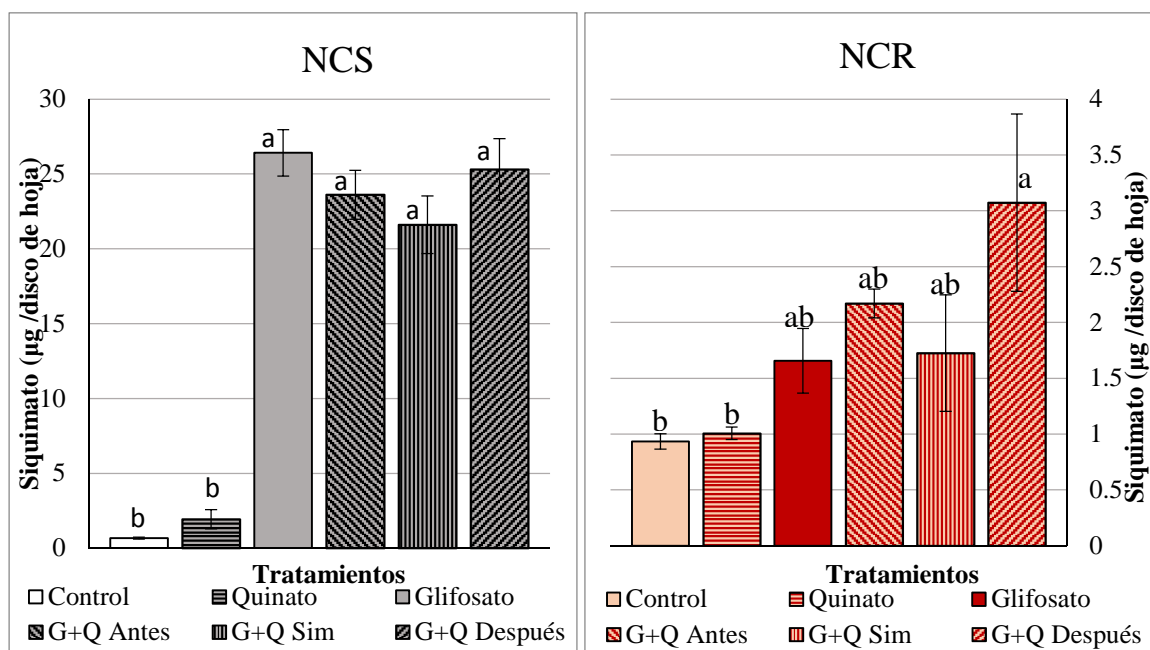


Figura 13. Contenido de siquimato en hojas tras aplicar los distintos tratamientos, (izquierda población sensible/derecha población resistente). Las plantas de *Amaranthus palmeri* fueron pulverizadas con quinato y con 0,4 g/L de glifosato la población sensible (NC-S) y con 0,8 g/L de glifosato la población resistente (NC-R). El quinato fue aplicado un día antes, a la vez o un día después del glifosato. Media \pm ES (n=16) para la población sensible y Media \pm ES (n=12) para la población resistente. Para cada población, diferentes letras indican diferencias significativas para $p < 0.05$.

En la población resistente la aplicación aislada de quinato no alteró el contenido de siquimato respecto al control. El resto de tratamientos produjeron un aumento de siquimato muy inferior al obtenido en la población sensible, con un máximo de 3 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de hoja frente a un máximo de 26 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de hoja, evidenciándose así la resistencia al herbicida. Se puede observar un ligero aumento no significativo del contenido de siquimato en los tratamientos mixtos de quinato aplicado antes y después del glifosato con respecto al tratamiento tan solo con glifosato, que llega a ser significativo en el caso del quinato aplicado posteriormente al herbicida “G+Q Después”.

4.4. Efectos de los tratamientos sobre productos de la ruta del siquimato: Contenido en aminoácidos libres.

Otro de los parámetros utilizados para valorar la fitotoxicidad del glifosato sobre la ruta del siquimato fue el contenido en aminoácidos libres, ya que se ha demostrado que es un parámetro fisiológico que se altera en presencia de este herbicida.

Se determinó la cantidad de aminoácidos totales en hojas de *A. palmeri* de ambas poblaciones, sensible y resistente, pasados tres días tras el tratamiento con el herbicida.

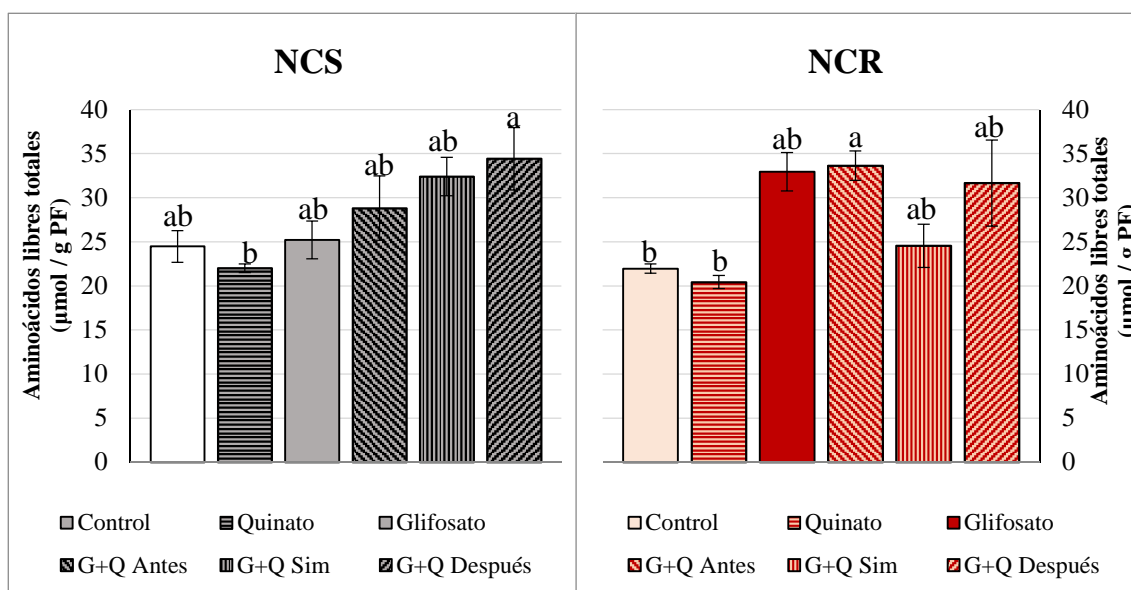


Figura 14. Contenido de aminoácidos libres totales en hojas de *Amaranthus palmeri* tras haber recibido un tratamiento con glifosato tres días antes, (izquierda población sensible/ derecha población resistente). Las plantas de *Amaranthus palmeri* fueron pulverizadas con quinato y con 0,4 g/L de glifosato la población sensible (NC-S) y con 0,8 g/L de glifosato la población resistente (NC-R). El quinato fue aplicado un día antes, a la vez o un día después del glifosato. Media \pm ES (n=4). Para cada población, diferentes letras indican diferencias significativas para $p < 0.05$.

El contenido en aminoácidos libres totales para la población sensible (Figura 14) tras el tratamiento con quinato aislado se redujo ligeramente, aunque no significativamente, su contenido. El tratamiento “Glifosato” y las combinaciones “G+Q Antes” y “G+Q Sim” mantuvieron unos niveles similares a los tratamientos “Control” y “Quinato”. En cambio, el tratamiento “G+Q Después”, aun no siendo diferente al “Control”, si presentó diferencias significativas con respecto al “Quinato”.

En el caso de la población resistente (Figura 14) se obtuvo que el tratamiento “Quinato” mantuvo los niveles “Control” y los tratamientos con aplicación de glifosato mantuvieron unos valores similares con tendencia al aumento que tan solo resultó significativa en el caso del tratamiento “G+Q Antes”.

4.4.1. Contenido en aminoácidos aromáticos.

Además del contenido en aminoácidos libres totales, se valoró la acumulación de los tres aminoácidos aromáticos (Tyr, Phe y Trp) individualmente ya que son los tres cuya ruta de biosíntesis se ve inhibida específicamente por el glifosato. Es importante valorar la evolución a lo largo del tiempo del contenido de los tres aminoácidos tras el tratamiento exógeno de quinato, debido a que en el momento final del muestreo las plantas de los diferentes tratamientos habían estado diferentes espacios de tiempo con quinato exógeno. La Figura 15 muestra los efectos del tratamiento aislado de quinato sobre el contenido de cada uno de los aminoácidos y su suma en ambas poblaciones.

Al analizar de forma individual el contenido de cada aminoácido aromático a lo largo del tiempo (Figura 15), a día 0 se aplicó el tratamiento con quinato aislado y se obtuvo como efecto del quinato dos comportamientos diferentes según cada aminoácido en particular, pero que fueron comunes a las dos poblaciones. Phe y Tyr mostraron una acumulación transitoria que duró 24 h y 48 h respectivamente desde la aplicación de quinato, mientras que el contenido de Trp no fue diferente del contenido de las hojas control en ningún momento del estudio.

Valorando los tres aminoácidos juntos se pudo observar que en ambas poblaciones se producía un aumento inicial del contenido total de aminoácidos aromáticos a Día 1, seguido de un ligero descenso más acentuado en la población resistente, que además presentó una mayor cantidad de los mismos en unidades de $\mu\text{mol/}$ gramo de peso fresco.

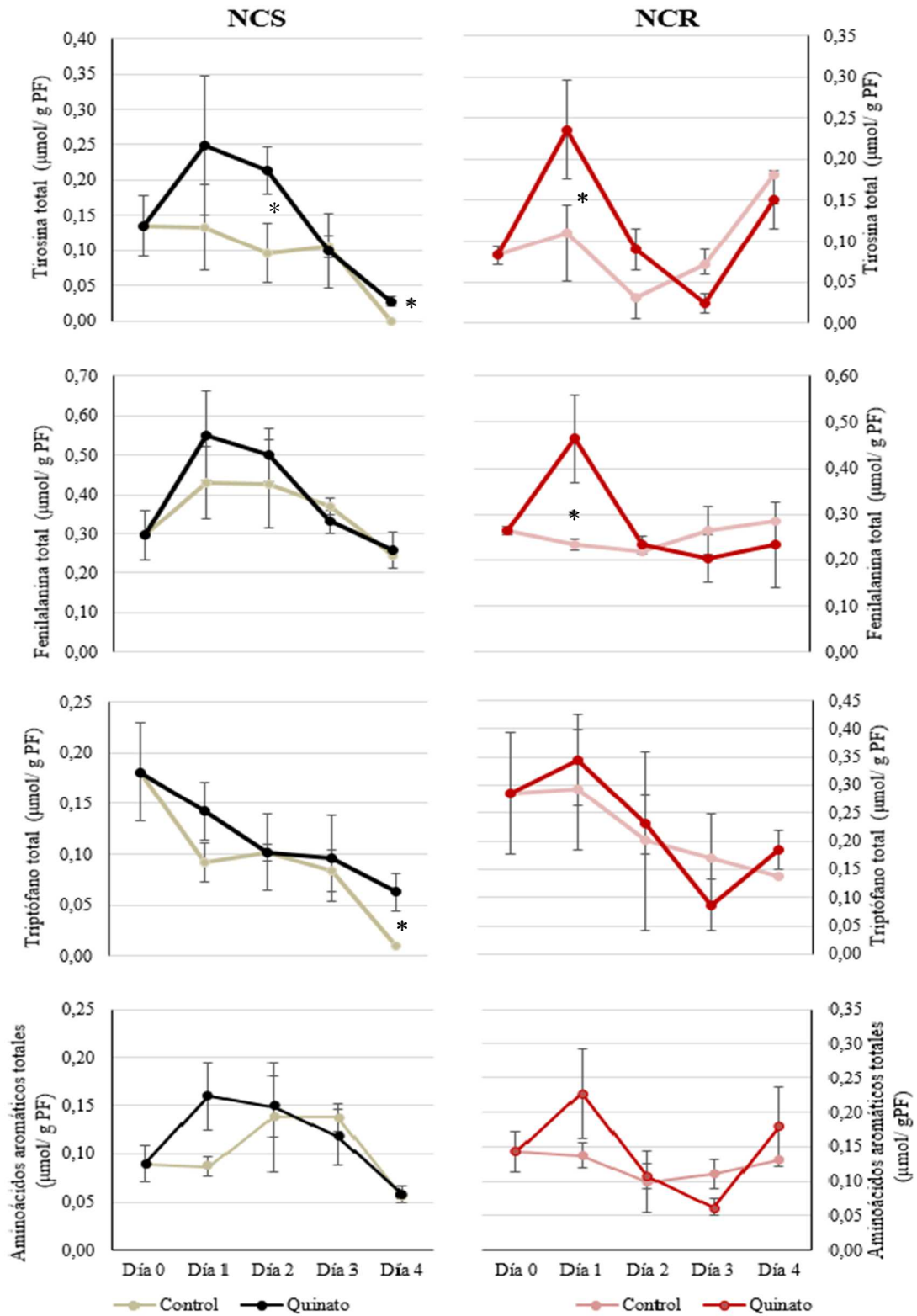


Figura 15. Contenido en aminoácidos aromáticos, individuales (tiroxina, fenilalanina y triptófano) y totales, a lo largo del tiempo de estudio en hojas de *Amaranthus palmeri* tras haber recibido un tratamiento con quinato aislado, (izquierda población sensible/ derecha población resistente). Media \pm ES (n=4). *Indica las diferencias significativas entre los tratamientos para ese día del estudio para $p \leq 0.05$.

Se evaluó el efecto del quinato y del glifosato aislados y en combinación sobre el contenido individual de los aminoácidos aromáticos (Figura 16).

En cuanto a la Phe en la población sensible se observó que el tratamiento “Quinato” mantuvo los mismos niveles que el “Control”, mientras que los tratamientos con glifosato mostraron una tendencia de aumento de este aminoácido con respecto al “Control” siendo significativo en el caso del tratamiento “G+Q Después”.

En el caso de los otros dos aminoácidos estudiados no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en comparación con el “Control”.

La población resistente no mostró diferencias significativas en ninguno de los aminoácidos ni en cada tratamiento. Aunque si que pudo observarse una tendencia creciente en el contenido de Phe con respecto al de Trp y Tyr (Figura 16), sobre todo en el tratamiento “G+Q Después”.

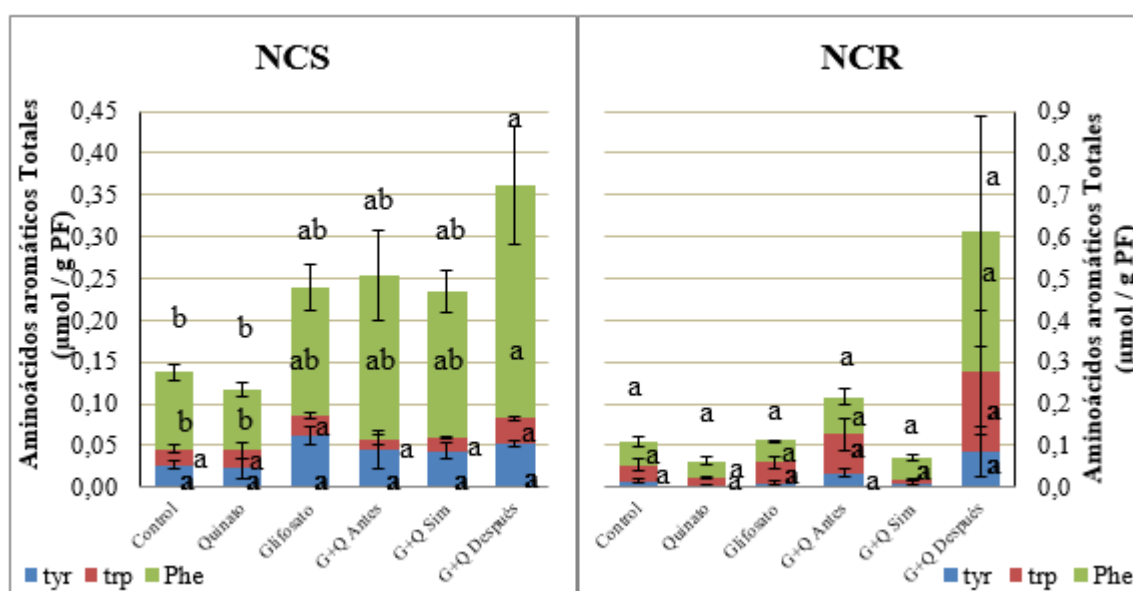


Figura 16. Contenido de aminoácidos aromáticos totales (tirosina, triptófano y fenilalanina) en hojas de *Amaranthus palmeri* tras haber recibido un tratamiento con glifosato tres días antes, (izquierda población sensible/ derecha población resistente). Las plantas de *Amaranthus palmeri* fueron pulverizadas con quinato y con 0,4 g/L de glifosato la población sensible (NC-S) y con 0,8 g/L de glifosato la población resistente (NC-R). El quinato fue aplicado un día antes, a la vez o un día después del glifosato. Media \pm ES (n=4). Para cada población, diferentes letras indican diferencias significativas para $p < 0.05$.

4.4.2. Contenido en aminoácidos ramificados.

En estudios anteriores se ha podido describir una regulación cruzada entre la ruta de biosíntesis de aminoácidos y los aminoácidos aromáticos, comprobando que los herbicidas que bloquean la biosíntesis de aminoácidos ramificados y el glifosato, que bloquea la biosíntesis de

aminoácidos aromáticos, producen efectos comunes como la acumulación de metabolitos intermediarios como el quinato (Orcaray et al., 2010).

En la población sensible (Figura 17) se obtuvo una mayor cantidad de aminoácidos ramificados totales, aunque no significativa, en los tratamientos “Quinato”, “Glifosato”, “G+Q Antes” y G+Q Después”, que sí resultó ser significativa para el tratamiento “G+Q Sim” con respecto al control pero no al resto de tratamientos.

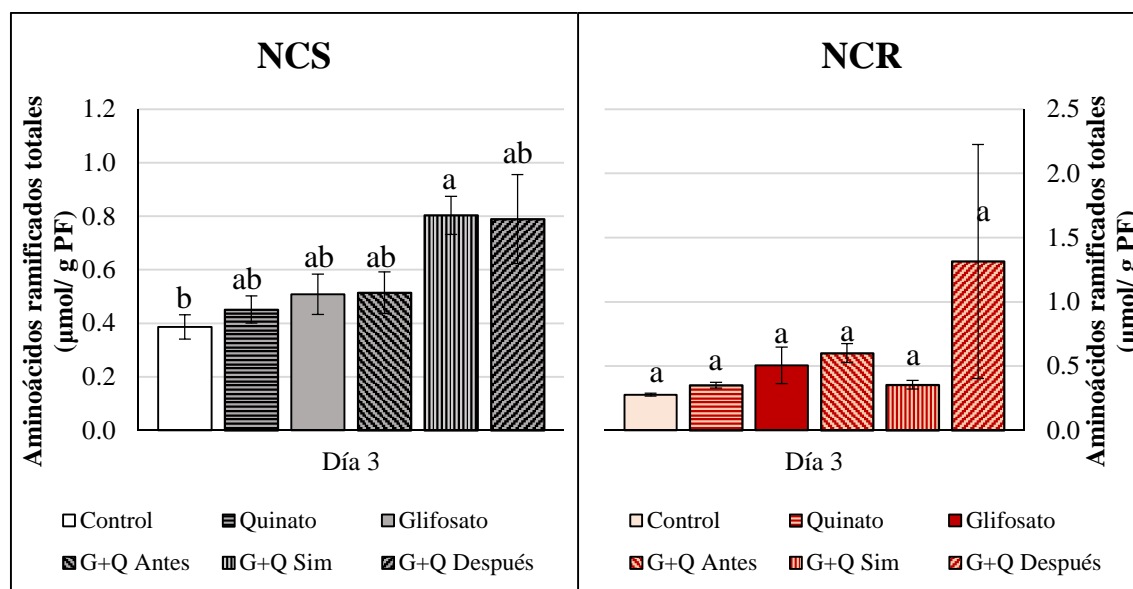


Figura 17. Contenido de aminoácidos ramificados totales, (valina, isoleucina y leucina), en hojas de *Amaranthus palmeri* tras haber recibido un tratamiento con glifosato tres días antes, (izquierda población sensible/ derecha población resistente). Las plantas de *Amaranthus palmeri* fueron pulverizadas con quinato y con 0,4 g/L de glifosato la población sensible (NC-S) y con 0,8 g/L de glifosato la población resistente (NC-R). El quinato fue aplicado un día antes, a la vez o un día después del glifosato. Media \pm ES (n=4). Para cada población, diferentes letras indican diferencias significativas para $p < 0.05$.

En la población resistente (Figura 17) no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, aunque si se pudo observar una tendencia de aumento no significativa para el tratamiento “G+Q Después”.

4.4.3. Contenido en aminoácidos ácidos y aminoácidos amidas.

Se estudiaron, a su vez, las variaciones producidas en los niveles de aminoácidos ácidos (Figura 18) y amidas (Figura 19) relacionados con la asimilación y transporte de nitrógeno en plantas.

Se pudo observar que el contenido en aminoácidos ácidos (Figura 18) en la población sensible tan solo el tratamiento “G+Q Antes” presentó un aumento significativo de los niveles de aminoácidos ácidos con respecto al “Control”, siendo el resto de tratamientos con aplicación

de glifosato combinado con quinato y el tratamiento con aplicación de quinato aislado muy similares entre ellos y con diferencias no significativas.

En cuanto a la población resistente, de nuevo no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

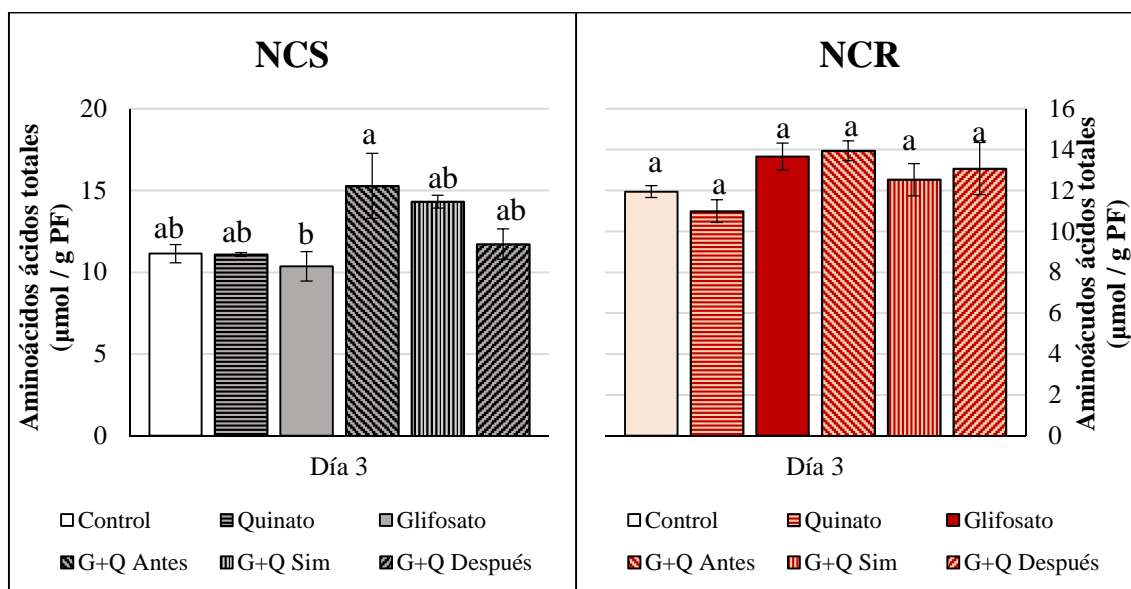


Figura 18. Contenido de aminoácidos ácidos totales, (aspártico y glutámico), en hojas de *Amaranthus palmeri* tras haber recibido un tratamiento con glifosato tres días antes, (izquierda población sensible/ derecha población resistente). Las plantas de *Amaranthus palmeri* fueron pulverizadas con quinato y con 0,4 g/L de glifosato la población sensible (NC-S) y con 0,8 g/L de glifosato la población resistente (NC-R). El quinato fue aplicado un día antes, a la vez o un día después del glifosato. Media \pm ES (n=4). Para cada población, diferentes letras indican diferencias significativas para $p < 0.05$.

Por último, en la valoración de los niveles de aminoácidos amidas (Figura 19) en la población sensible se obtuvo un incremento significativo en sus niveles totales con respecto al “Control” en el tratamiento “G+Q Sim”.

Para la población resistente no se obtuvieron diferencias significativas, pero pudo observarse una tendencia al aumento en los tratamientos con aplicación de glifosato, en especial en los de “Glifosato”, “G+Q Antes” y “G+Q Después”.

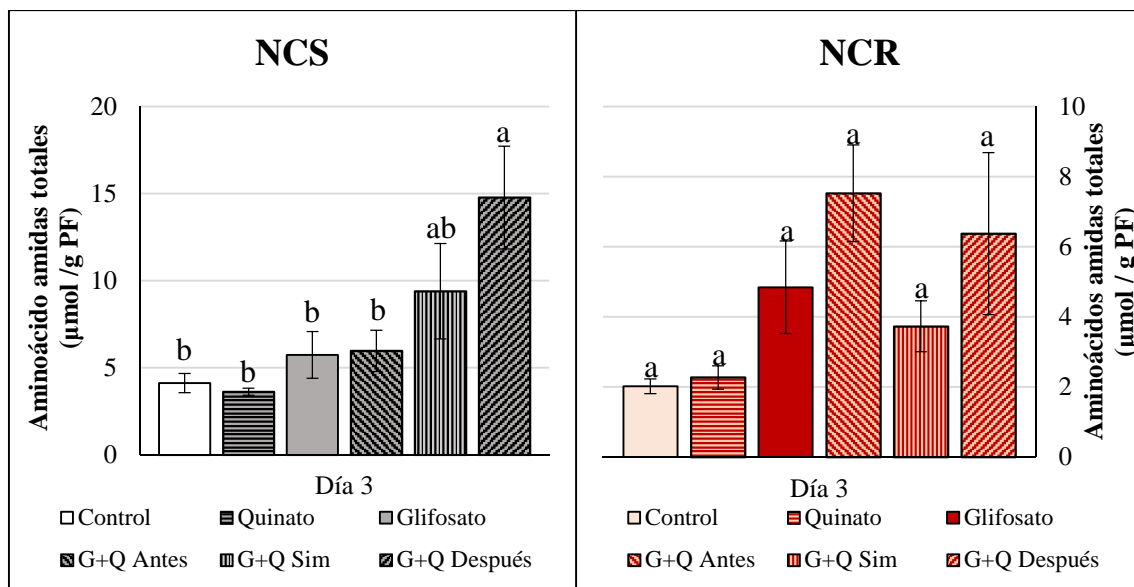


Figura 19. Contenido de aminoácidos amidas totales, (glutamina y asparagina), en hojas de *Amaranthus palmeri* tras haber recibido un tratamiento con glifosato tres días antes, (izquierda población sensible/ derecha población resistente). Las plantas de *Amaranthus palmeri* fueron pulverizadas con quinato y con 0,4 g/L de glifosato la población sensible (NC-S) y con 0,8 g/L de glifosato la población resistente (NC-R). El quinato fue aplicado un día antes, a la vez o un día después del glifosato. Media \pm ES (n=4). Para cada población, diferentes letras indican diferencias significativas para $p < 0.05$.

5. DISCUSIÓN.

5.1. Potenciadores de la toxicidad y letalidad provocada por el glifosato.

A la vista de los resultados obtenidos, Tabla 3, se pudo observar en la población sensible un crecimiento menor en las plantas sometidas a los tratamientos “Quinato” y “Glifosato” en comparación con las plantas “Control”.

El tratamiento con detergente Biopower podría ser la causa de las quemaduras grisáceas presentes en las hojas de ambas poblaciones con el tratamiento “Control” (Tabla 5), no observadas anteriormente en ningún estudio.

En el tratamiento con quinato en la población sensible (Tabla 5) se pudieron apreciar quemaduras o decoloración localizada del ápice, lo que puede deberse a un efecto temporal producido por el quinato observado en estudios previos (Orcaray et al., 2010; Zulet, Zabalza, et al., 2013; Villanueva, 2016), y un enrollamiento en el ápice foliar (Tabla 5). Se ha podido observar que estos efectos descritos tan solo se producen en hojas viejas ya que las hojas jóvenes, crecidas tras la aplicación de quinato, carecían de estas quemaduras. Los efectos de dicho tratamiento apenas tuvieron repercusión en la población resistente, en la que tan solo se pudo apreciar cierta decoloración de una franja pequeña de la hoja. Las diferentes respuestas de ambas poblaciones en cuanto a la sensibilidad del tratamiento con quinato pueden ser debidas a cambios en la morfología de la hoja o en su composición de la cutícula.

Las plantas tratadas con glifosato de forma aislada presentaron una clorosis intensa (recuadro rojo, Tabla 5) en la población sensible, que se observa con menor intensidad en la población resistente.

Los tratamientos combinados con quinato y glifosato no presentaron grandes variaciones en el crecimiento de ninguna de las dos poblaciones (Tabla 4), pero mostraron en todos los casos cierto nivel de clorosis en las hojas tanto en la población sensible como en la resistente (Tabla 6). Además de este efecto, producido por el herbicida, se pudo observar que en ambas poblaciones aparecían las quemaduras grisáceas consecuencia de la aplicación de quinato. El tratamiento con mayor afectación a simple vista, debido a la intensidad de los síntomas en comparación con el resto de tratamientos, fue “G+Q Después”.

Las bajas dosis utilizadas de glifosato no resultaron letales para la población resistente.

En la población sensible se pudo observar un crecimiento óptimo, incluso tras el tratamiento con el herbicida (se aplicó una dosis baja del mismo), en aquellas plantas con el

tratamiento de quinato y glifosato simultáneo, mientras que los tratamientos “G+Q Antes” y “G+Q Después” resultaron letales (Figura 7) pasados 15 días tras el muestreo.

Así, considerando los efectos en el estado de crecimiento general de las plantas y la letalidad, este estudio parece indicar que la aplicación anterior y posterior de quinato al glifosato podría llegar a potenciar la fitotoxicidad del glifosato. Para poder discernir qué parámetros fisiológicos estarían relacionados con dicho efecto, se han evaluado en este estudio una serie de parámetros fisiológicos relacionados con la ruta del siquimato que han sido descritos algunos de ellos como marcadores fisiológicos del mismo y que se conoce que se ven afectados por el herbicida.

5.2 Efectos sobre parámetros de la ruta del siquimato.

5.2.1. Efectos sobre el enzima diana del herbicida glifosato: EPSPS.

En la población sensible, la tendencia al aumento en el contenido de EPSPS tras el tratamiento con glifosato se puede relacionar con el efecto del herbicida utilizado, que induce un incremento de la expresión génica del enzima y, por tanto, de su síntesis tal y como se ha descrito recientemente por Fernández-Escalada et al., (2016). Sin embargo, en dicho trabajo solo se detectó incremento de EPSPS con dosis muy altas de herbicida (aplicando una dosis que era tres veces la aplicada en campo), por lo que la falta de diferencias significativas en este trabajo se puede deber a las dosis de glifosato utilizadas que mucho más bajas.

Además, la población resistente mostro una tendencia contraria con unos niveles de proteína EPSPS en todos los tratamientos por debajo de los niveles control (Figura 8), siendo significativo en el caso del tratamiento “G+Q Sim”. Esto podría indicar una potenciación del efecto del herbicida por parte del quinato cuando se aplican ambos compuestos de forma simultánea.

Respecto a la actividad del enzima, en la población sensible se obtuvo una actividad enzimática similar en los tratamientos “Control”, “Quinato” y “Glifosato”, y en los tratamientos combinados. A pesar de que se obtuvo un aumento en el tratamiento “G+Q después”, con unos niveles de actividad enzimática muy altos, las diferencias entre el resto de los datos no fueron significativas, debido a la gran variabilidad que presentaba el parámetro. Estos resultados se encuentran en contradicción con lo esperado, ya que en estudios anteriores se detectó un descenso con la misma dosis (Villanueva, 2016) y con dosis superiores (Fernández-Escalada et al., 2016), de acuerdo con esto en la población sensible el glifosato debería haber inhibido la actividad EPSPS y por tanto los datos de los tratamientos con herbicida aplicado deberían ser

mucho menores que en el tratamiento “Control” (Figura 9). Una posible explicación a estos resultados podría ser que el análisis “*in vitro*” realizado no represente la situación “*in vivo*” correctamente debido a la pérdida de eficacia en la unión herbicida-diana y, por tanto, no puede saberse cuánto de inhibido se encuentra el enzima en el momento del análisis o si la unión glifosato-EPSPS resulta reversible al realizar el desalado de la muestra durante el procedimiento de aislamiento. Otra explicación podría encontrarse en la baja dosis de glifosato utilizada, ya que la dosis de glifosato aislada no resultó letal para la población sensible.

La actividad EPSPS en la población resistente no se modificó significativamente con ninguno de los tratamientos. Se detectó una actividad semejante en las hojas de aquellas plantas “Control” y en las de las plantas tratadas con glifosato, lo que se puede deber a que la baja dosis utilizada. El quinato aplicado de forma aislada no produjo cambios apreciables y se detectó un descenso no significativo de la actividad cuando el quinato fue aplicado antes y después del glifosato.

5.2.2. Efectos sobre parámetros anteriores a la diana: DAHPS, quinato y siquimato.

A pesar de no ser significativo, la población sensible mostró un ligero aumento del contenido de DAHPS en el tratamiento con glifosato de forma aislada, tal como se ha podido observar en estudios anteriores (Pinto et al., 1988; Siehl, 1997; Zabalza et al., 2017). Esta tendencia se vio aumentado en el tratamiento “G+Q Después” (Figura 10) por lo que, aunque las diferencias no resultaron significativas, este resultado podría indicar que el quinato aplicado 24 horas tras un tratamiento con glifosato potenciaría el efecto sobre dicha enzima. Se ha propuesto que el aumento de este enzima producido por un tratamiento con glifosato se debe a que tras la inhibición de la actividad EPSPS, la falta de metabolitos producidos a partir del corismato impide su actuación como inhibidores alostéricos de la actividad DAHPS, lo que desencadena su aumento. Esto sugiere la existencia de una regulación específica de la expresión de DAHPS debido a la acumulación de ciertos metabolitos situados por encima del paso catalizado por EPSPS en la ruta, lo que implica una incapacidad a la hora de controlar la entrada de carbono en la ruta bloqueada (Pinto et al., 1988; Siehl, 1997), o por la falta de otros metabolitos situados posteriormente (Siehl, 1997).

El efecto del glifosato sobre el contenido de la enzima DAHPS fue contrario en la población resistente, detectándose un descenso no significativo en presencia del herbicida (Figura 10), como si no hubiese los mismos mecanismos de regulación. Este efecto del glifosato fue revertido cuando se aplicó quinato con anterioridad.

Los efectos fitotóxicos y metabólicos producidos por el quinato administrado de forma exógena se han manifestado sobre el crecimiento vegetal y la fisiología de la planta, y se asemejan, en algunos casos, a aquellos causados por el herbicida glifosato. Se desconoce si posee una diana concreta, pero se sabe que el quinato penetra en la ruta del siquimato y altera la regulación de procesos relacionados con la misma (Zabalza et al., 2017)

El seguimiento en el contenido de quinato a lo largo del tiempo (Figura 11) sufrió un aumento muy rápido justo tras el tratamiento exógeno con el mismo compuesto, tal y como era esperable. A pesar de que se pudo observar un descenso paulatino en la concentración de quinato foliar a lo largo de los días en ambas poblaciones (Figura 11), el contenido foliar de quinato era suficientemente estable y diferente de los valores control a lo largo de los días. Así, hay que considerar que las plantas de los tratamientos combinados llevaban diferente número de días en presencia de quinato, siendo 4, 3 y 2 días para los tratamientos “G+Q Antes”, “G+Q Sim” y “G+Q Después”, respectivamente.

Los valores de quinato obtenidos a Día 3 (Figura 12) en la población sensible y en la población resistente fueron muy bajos para los tratamientos “Control” y “Glifosato”, resultados previamente observados en varios estudios (Zulet-gonzález, 2014; Villanueva, 2016) y contrarios a los obtenidos en otros (Orcaray et al., 2010; Zabalza et al., 2017), en los cuales se detectó acumulación de quinato tras el tratamiento con glifosato. Estos resultados pueden deberse a la baja dosis de herbicida empleada (0,21 Kg/ ha NCS / 0,42 kg/ ha NCR) que no permitió una acumulación de quinato significativa.

En cambio, en los tratamientos con quinato aislado y combinado con glifosato se obtuvieron valores por encima del “Control”, lo que pondría de manifiesto el efecto estimulador de la aplicación de quinato exógena sobre la acumulación de quinato en el interior de la célula vegetal, resultados observados a su vez en la población resistente. Sin embargo, la tendencia del comportamiento de los dos tratamientos combinados fue diferente según la población de estudio: Mientras en la población sensible los tres tratamientos provocaron acumulación de quinato (que fue máximo en la aplicación simultánea), en la población resistente la acumulación de quinato fue máxima en la aplicación previa y mínima en la aplicación posterior. Estos resultados contrastan con lo esperable, que sería detectar niveles máximos de quinato en la aplicación posterior, por llevar menos tiempo desde la aplicación del compuesto. Así, en la población resistente sugieren una mayor tasa de metabolización de quinato si la planta se encuentra pre-tratada con glifosato.

A la vista de los resultados observados en los tratamientos combinados de ambas poblaciones no puede establecerse el momento de aplicación idóneo para asegurar una mayor acumulación de quinato.

El último parámetro medido anterior a la diana del herbicida fue el contenido de siquimato en hojas (Figura 13). Los resultados obtenidos pasados tres días tras el tratamiento con el herbicida mostraron que la aplicación de quinato de forma aislada en ambas poblaciones no modifica los valores obtenidos en el tratamiento “Control”, lo cual contradice lo esperado ya que al aportar sustrato a la ruta deberían aumentar el contenido en metabolitos de dicha ruta. Estos resultados indican que el quinato aportado exógenamente es metabolizado rápidamente sin llegar a acumularse en metabolitos intermediarios de la misma, tal y como se ha mostrado recientemente en guisante (Zabalza et al., 2017).

En la población sensible (Figura 13) se pudo observar un gran y significativo aumento del contenido de siquimato en el tratamiento con glifosato aislado, observado anteriormente (Orcaray et al., 2010; Zabalza et al., 2017), así como en las combinaciones con quinato.

Novedosamente, en la población resistente se pudo observar un aumento significativo de siquimato en el tratamiento “G+Q Después”.

Dado que el incremento del contenido de siquimato se relaciona con la acumulación de compuestos que se encuentran en pasos anteriores al enzima EPSPS en la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos, se podría esperar un aumento mayor del contenido de este metabolito al aplicar quinato de forma exógena con posterioridad al herbicida y así aumentar el flujo de carbono en la ruta. Sin embargo, este resultado solo fue detectado en la población resistente.

Mientras que en la población sensible no hubo modificaciones en el contenido de siquimato en los tratamientos combinados en la población resistente se pudo observar una potenciación de la acumulación de siquimato en el tratamiento “G+Q Después”, indicando la capacidad del quinato de agudizar el efecto. Parece pues que, en el caso de la población resistente, al suplementar carbono a la ruta una vez que la vía lleva parcialmente inhibida 24 horas se acentúa la acumulación de siquimato que se detecta con la aplicación de glifosato aislado.

5.3. Perfil de aminoácidos libres en respuesta a los tratamientos.

El efecto del glifosato sobre el contenido de aminoácidos libres total depende en gran medida del órgano y del momento de aplicación del estudio, (Haderlie et al., 1977; Hollander and Amrhein, 1980; Wang, 2001). En general, las dosis letales del glifosato se ha mostrado que

inducen un incremento en el contenido de aminoácidos libres totales (Wang, 2001; Orcaray et al., 2012; Armendáriz, 2014; Zulet-gonzález, 2014). Las bajas dosis de herbicida aplicadas en este estudio, y en línea con el efecto transitorio detectado, no provocaron un incremento significativo de este parámetro (Figura 14), limitándose así su uso como parámetro para poder detectar alivio o potenciación de la toxicidad herbicida. Si a pesar de ello se consideran las tendencias, cabría reseñar que la mayor acumulación en la población sensible se detectó en la aplicación posterior de quinato, lo cual indicaría una mayor agresividad del tratamiento.

En el seguimiento del contenido de cada aminoácido aromático a lo largo del periodo de estudio (Figura 15) en respuesta al tratamiento con quinato, evidenció un incremento transitorio de los aminoácidos Phe y Tyr, es decir los aminoácidos sintetizados en la rama de la corismato mutasa a partir del corismato. Este punto de ramificación en la ruta del siquimato, en la cual el corismato puede ser dirigido hacia la síntesis de Trp o Tyr y Phe ha sido descrito como un punto clave en la regulación de la ruta (Maeda and Dudareva, 2012). Nuestros resultados muestran que el quinato aplicado exógenamente es metabolizado en un plazo de 24-48 horas hacia una síntesis preferente de la corismato mutasa. Esta incorporación del quinato se detectó en ambas poblaciones.

El contenido en aminoácidos aromáticos a los tres días tras los tratamientos mostró un incremento preferente de la fenilalanina, significativo en el tratamiento “G+Q Después” (Figura 16), tal y como había sido observado anteriormente en aplicación externa de glifosato aislado (Haderlie et al., 1977; Petersen et al., 2007; Fernández-Escalada et al., 2016); mientras que en otros estudios se pudo observar como en poblaciones sensibles de *A. palmeri* y soja tras un tratamiento con glifosato se acumulaba tan solo triptófano (Vivancos et al., 2011; Maroli et al., 2015).

En la población resistente, solo el tratamiento “G + Q después” alteró el contenido de los aminoácidos aromáticos de las plantas tratadas. Es decir, a pesar de que la aplicación aislada de glifosato no incrementó el contenido de los mismos, la aplicación posterior del quinato provocó una acumulación debida posiblemente a una mayor asimilación del mismo por una ruta previamente activada en presencia del glifosato.

En estudios anteriores se pudo comprobar que la presencia de glifosato afectaba de manera muy marcada sobre el contenido en aminoácidos ramificados (Maroli et al., 2015), así como la presencia de los herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados afectaron en gran medida al contenido en aminoácidos aromáticos (Orcaray et al., 2010; Zulet et al., 2015; Fernández-Escalada et al., 2016). Así, se considera el incremento del contenido de los aminoácidos ramificados como un indicador de la fitotoxicidad del glifosato. En la población

sensible la dosis aplicada de glifosato fue muy baja y no alteró el contenido de los ramificados de forma aislada, solo se produjo un incremento del contenido del mismo cuando el quinato fue aplicado a la vez o con posterioridad. En la población resistente, el único tratamiento que alteró este parámetro fue la aplicación posterior de quinato.

Las plantas de poblaciones sensibles tratadas con glifosato muestran un descenso en el contenido de aminoácidos ácidos y un incremento en el contenido de aminoácidos amidas, Orcaray et al., (2010) al producirse un cambio en el almacenamiento de nitrógeno que pasa de forma ácida a forma de amida. Sin embargo, las bajas dosis de glifosato empleadas en este estudio solo han alterado levemente el contenido de estos aminoácidos, en la misma tendencia de lo publicado con anterioridad.

5.4. Efectos de la amplificación génica de EPSPS sobre la regulación de la ruta del siquimato.

Las plantas de la población resistente presentan una amplificación génica del enzima EPSPS que justifica la mayor cantidad de enzima y de actividad EPSPS de dicha población (Figuras 8 y 9). Pese a la capacidad de dichas plantas de metabolizar más carbono en este paso de la ruta del siquimato, se pudo observar que los valores basales (controles) de todos los parámetros de la ruta del siquimato analizados presentan valores muy similares entre ambas poblaciones y sugiriendo que el flujo de carbón y la regulación de la vía serían similares entre ambas poblaciones. La aplicación exógena de quinato provocó el mismo cambio y de la misma intensidad en ambas poblaciones, con un incremento transitorio del contenido de los dos aminoácidos aromáticos de la rama de la corismato mutasa. Esto parece apoyar de manera adicional que si bien la resistencia otorga un óptimo funcionamiento del enzima ante el glifosato que la inhibe, el resto de parámetros se regulan de la misma forma que en la población sensible.

5.5. Efectos de los diferentes tratamientos sobre la regulación de la ruta del siquimato en ambas poblaciones

La aplicación exógena de quinato aislado no provocó grandes cambios en los parámetros evaluados en ninguna de las dos poblaciones, solo un incremento del contenido foliar del mismo, por ser absorbido y acumulado.

La población sensible mostró tras el tratamiento con glifosato aislado dos de los ya conocidos marcadores fisiológicos de la ruta del siquimato: acumulación de siquimato (Figura 13) e incremento de la proteína DAHPS (Figura 10). La aplicación simultánea y posterior de quinato exacerbó estos dos efectos, respectivamente. A pesar de que no se detectaron

modificaciones significativas en el perfil de aminoácidos con el glifosato aislado debido a la baja dosis de glifosato empleada, la aplicación posterior de quinato permitió detectar cambios en el perfil de aminoácidos que han sido relacionados con la toxicidad del herbicida: incremento del contenido de los aminoácidos libres totales (Figura 14), aminoácidos aromáticos (Figuras 15 y 16), ramificados (Figura 17) y amidas (Figura 19).

La población resistente mostró un efecto contrario al esperado en el contenido de DAHPS tras aplicar el glifosato aislado. Mientras que se ha descrito que el glifosato induce un incremento de esta proteína (Pinto et al., 1988; Siehl, 1997), la población resistente muestra que la sobreexpresión del enzima EPSPS altera la respuesta de la entrada de la vía ante el tratamiento con glifosato, por algún mecanismo regulatorio que implica cambios en la transcripción o traducción del enzima.

De todos los tratamientos comparados en la población resistente, la aplicación de quinato posterior al glifosato ha resultado ser la que más perturbaciones metabólicas induce en los parámetros analizados. Este tratamiento provocó una mayor acumulación de siquimato, un menor contenido de quinato, un mayor contenido en aminoácidos aromáticos, ramificados y amidas. Así, parece que aplicar glifosato antes que quinato induce en la población resistente una mayor capacidad de incorporar a la ruta el carbono exógeno procedente del quinato. El quinato es metabolizado de tal manera que no se detecta acumulación del mismo y se acumulan los tres productos finales la ruta, destacando la fenilalanina.

De las tres combinaciones temporales evaluadas la aplicación posterior de quinato ha mostrado ser el tratamiento que provoca mayores modificaciones tanto en la población sensible como en la resistente. En la población sensible resultó letal y evidenció algunos marcadores toxicológicos del herbicida y en la población resistente fue capaz de desajustar la regulación de la ruta del siquimato de una manera más acusada que el resto de las combinaciones.

6. CONCLUSIONES.

- La aplicación foliar exógena de quinato de forma aislada tiene un efecto similar en ambas poblaciones produciendo un aumento en la acumulación de dicho compuesto, debido al aporte externo; pero no obtiene resultados significativos en el resto de parámetros medidos
- Aparte de las esperables diferencias de la actividad EPSPS y cantidad de proteína entre las poblaciones no se detectaron diferencias entre los niveles control de los parámetros, sugiriendo un comportamiento similar de la ruta en ausencia de tratamientos. Además, ambas poblaciones mostraron el mismo comportamiento tras la aplicación exógena de quinato: un incremento transitorio del contenido de los aminoácidos aromáticos Phe y Tyr.
- El glifosato aplicado de manera aislada no provocó una fitotoxicidad muy elevada debido a la baja dosis aplicada en la población sensible y a la resistencia de la población resistente. Este bajo efecto detectado permitió valorar la posible potenciación del mismo en presencia de quinato.
- En la población sensible, de los tratamientos evaluados solo la aplicación previa y posterior de quinato fueron letales. De entre ellas, se detectó con la aplicación posterior de quinato un mayor desequilibrio metabólico y un mayor efecto en los marcadores fitotóxicos ya conocidos: exacerbación del incremento del contenido de DAHPS e incremento del contenido de los aminoácidos libres totales, aromáticos, ramificados y amidas.
- El glifosato aislado provocó en la población resistente el efecto contrario sobre el contenido de DAHPS que en la población sensible. De todos los tratamientos evaluados solamente la aplicación posterior de quinato provocó una importante desregulación metabólica de la ruta del siquimato, evidenciada en un incremento del siquimato y contenido de aminoácidos aromáticos.
- Aunque los resultados de este estudio no presentan en la mayoría de los casos una modificación muy acusada, en base a los patrones detectados en la población sensible y resistente se puede proponer la aplicación posterior de quinato como el tratamiento que provoca mayor fitotoxicidad y mayor desregulación de la ruta del siquimato.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- Arlt K, Brandt S, Kehr J** (2001) Amino acid analysis in five pooled single plant cell samples using capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A* **926**: 319–325
- Armendáriz O** (2014) Aplicación conjunta de herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos en malas hierbas sensibles y resistentes. Ana Zabalza (dir.). Trabajo Fin de Grado. Universida Pública de Navarra.
- Becerril JM, Duke SO, Lydon J** (1989) Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf. *Phytochemistry* **28**: 695–699
- Boudet A** (1973) Quinic and shikimic acids in woody angiosperms. *Phytochemistry* **12**: 363–370
- Boudet AM** (2012) Polyphenols: From plant adaptation to useful chemical resources. *In* V Cheynier, P Sarni-Manchado, S Quideau, eds, *Recent Adv. Polyphen. Res.*, First. Wiley-Backwell, Chichester, West Sussex, UK, pp 41–70
- Bradford M** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254
- Catizone, P., Zanin G** (2002) No Title. *Malherbologia Bolonia, IT Patron*: 925
- Chatham LA, Wu C, Riggins CW, Hager AG, Young BG, Gordon K, Tranel PJ** (2015) EPSPS gene amplification is present in the majority of glyphosate-resistant Illinois waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) Populations. *Weed Technol* **29**: 48–55
- Chen J, Huang H, Zhang C, Wei S, Huang Z, Chen J, Wang X** (2015) Mutations and amplification of EPSPS gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). *Planta* **242**: 859–868
- Chueca, C., Cirujeda, A., De Prado, R., Díaz, E., Ortas, L., Taberner A** (2005) Colección de folletos sobre manejo de poblaciones resistentes en *Papaver*, *Lolium*, *Avena* y *Echinochloa*. Zaragoza
- Cromartie TH, Polge ND** (2000) An improved assay for shikimic acid and its use as monitor

for the activity of sulfosate. Weed Sci. Soc. Am. Proc. pp 4, 121

- Culpepper A, Grey T, Vencill W** (2006) Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. Weed Sci **54**: 620–626
- Délye C, Jasieniuk M, Le Corre V** (2013) Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. Trends Genet **29**: 649–658
- Duke SO, Powles SB** (2008) Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. Pest Manag Sci **64**: 319–325
- Ehleringer J** (1983) Ecophysiology of *Amaranthus palmeri*, a Sonoran desert summer annual. Oecologia **64**: 107–112
- Fernández-Escalada M, Gil-Monreal M, Zabalza A, Royuela M** (2016) Characterization of the *Amaranthus palmeri* Physiological Response to Glyphosate in Susceptible and Resistant Populations. J Agric Food Chem **64**: 95–106
- Fuchs MA, Geiger DR, Reynolds TL, Bourque JE** (2002) Mechanisms of glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti medikus*). Pestic Biochem Physiol **74**: 27–39
- Gaines T a, Wright A a, Molin WT, Lorentz L, Riggins CW, Tranel PJ, Beffa R, Westra P, Powles SB** (2013) Identification of genetic elements associated with EPSPS gene amplification. PLoS One **8**: e65819
- Gaines T a, Zhang W, Wang D, Bukun B, Chisholm ST, Shaner DL, Nissen SJ, Patzoldt WL, Tranel PJ, Culpepper a S, et al** (2010) Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. Proc Natl Acad Sci U S A **107**: 1029–1034
- Gruys K, Sikorski J** (1999) Inhibitors of tryptophan, phenylalanine, and tyrosine biosynthesis as herbicides. In BK Singh, ed, Plant Amin. acids Biochem. Biotechnol. Marcel Dekker, New York, pp 357–384
- Haderlie LC, Widholm JM, Slife FW** (1977) Effect of glyphosate on carrot and tobacco cells. Plant Physiol **60**: 40–43
- Heap I** The international survey of herbicide resistant weeds. Online. Internet.
- Hernandez A, Garcia-Plazaola JI, Becerril JM** (1999) Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). J Agric Food Chem **47**: 2920–

- Hoagland DR, Arnon DI** (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Calif Agric Exp Stn Circ **347**: 1–32
- Hoagland RE, Jordan RH, Teaster ND** (2013) Bioassay and Characterization of Several Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) Biotypes with Varying Tolerances to Glyphosate. Am J Plant Sci **4**: 1029–1037
- Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, Pollet B, Legrand M** (2004) Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. Plant Cell **16**: 1446–65
- Hollander H, Amrhein N** (1980) The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. I. Inhibition by glyphosate of phenylpropanoid synthesis in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). Plant Physiol **66**: 823–829
- Labhili M, Joudrier P, Gautier MF** (1995) Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. Plant Sci **112**: 219–230
- Lorentz L, Gaines T a, Nissen SJ, Westra P, Streck HJ, Dehne HW, Ruiz-Santaella JP, Beffa RS** (2014) Characterization of Glyphosate Resistance in *Amaranthus tuberculatus* Populations. J Agric Food Chem **62**: 8134–8142
- Lydon J, Duke SO** (1988) Glyphosate Induction of Elevated Levels of Hydroxybenzoic Acids in Higher-Plants. J Agric Food Chem **36**: 813–818
- Maeda H, Dudareva N** (2012) The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. Annu Rev Plant Biol **63**: 73–105
- Maroli AS, Nandula VK, Dayan FE, Duke SO, Gerard P, Tharayil N** (2015) Metabolic profiling and enzyme analyses indicate a potential role of antioxidant systems in complementing glyphosate resistance in an *Amaranthus palmeri* biotype. J Agric Food Chem **63**: 9199–9209
- Moldes CA, Medici LO, Abrahao OS, Tsai SM, Azevedo RA** (2008) Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. Acta Physiol

Plant **30**: 469–479

Orcaray, Luis; Zulet, Amaia; Zabalza, Ana; Royuela M (2011) Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. *J Plant Physiol* **28**

Orcaray L, Igal M, Marino D, Zabalza A, Royuela M (2010) The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. *Pest Manag Sci* **66**: 262–269

Orcaray L, Igal M, Zabalza A, Royuela M (2011) Role of exogenously supplied ferulic and p-coumaric acids in mimicking the mode of action of acetolactate synthase inhibiting herbicides. *J Agric Food Chem* **59**: 10162–10168

Orcaray L, Zulet A, Zabalza A, Royuela M (2012) Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. *J Plant Physiol* **169**: 27–33

Osipov V, Aleksandrova L (1986) Effect of glyphosate on metabolism of quinic and shikimic acids in scotch pine needles. *Sov Plant Physiol* **33**: 584–589

Petersen IL, Hansen HCB, Ravn HW, Sørensen JC, Sørensen H (2007) Metabolic effects in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings after root exposure to glyphosate. *Pestic Biochem Physiol* **89**: 220–229

Pinto JE, Dyer WE, Weller SC, Herrmann KM (1988) Glyphosate Induces 3-Deoxy-d-arabino-Heptulosonate 7-Phosphate Synthase in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cells Grown in Suspension Culture. *Plant Physiol* **87**: 891–893

Powles SB, Yu Q (2010) Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annu Rev Plant Biol.* doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112119

Ribeiro DN, Pan Z, Duke SO, Nandula VK, Baldwin BS, Shaw DR, Dayan FE (2014) Involvement of facultative apomixis in inheritance of EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant *Amaranthus palmeri*. *Planta* **239**: 199–212

Salas R a., Dayan FE, Pan Z, Watson SB, Dickson JW, Scott RC, Burgos NR (2012) EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) from Arkansas. *Pest Manag Sci* **68**: 1223–1230

Sammons RD, Gaines T a. (2014) Glyphosate resistance: State of knowledge. *Pest Manag Sci*

70: 1367–1377

- Shaner DL, Nadler-Hassar T, Henry WB, Koger CH** (2005) A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Sci* **53**: 769–774
- Siehl DL** (1997) Inhibitors of EPSP synthase, glutamine synthetase and histidine synthesis. *Rev Toxicol* **1**: 37-67
- Steinrücken HC, Amrhein N** (1980) The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun* **94**: 1207–1212
- Tan S, Evans R, Singh B** (2006) Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids* **30**: 195–204
- Vila-Aiub MM, Goh SS, Gaines T a, Han H, Busi R, Yu Q, Powles SB** (2014) No fitness cost of glyphosate resistance endowed by massive EPSPS gene amplification in *Amaranthus palmeri*. *Planta* **239**: 793–801
- Villanueva A** (2016) Optimización del momento de aplicación de quinato en la mejora de la eficacia del herbicida glifosato. *Trab. Fin Máster . Univ. Navarra*
- Vivancos PD, Driscoll SP, Bulman C a, Ying L, Emami K, Treumann A, Mauve C, Noctor G, Foyer CH** (2011) Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependent inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration. *PLANT Physiol* **157**: 256–268
- Wang C-Y** (2001) Effect of Glyphosate on Aromatic Amino Acid Metabolism in Purple Nutsedge (*Cyperus rotundus*). *Weed Technol* **15**: 628–635
- Watson S** (1877) Descriptions of new species of plants, with revisions of certain genera. *Science (80-)* **12**: 246–278
- Wiersma AT, Gaines T a., Preston C, Hamilton JP, Giacomini D, Robin Buell C, Leach JE, Westra P** (2015) Gene amplification of 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-resistant *Kochia scoparia*. *Planta* **241**: 463–474
- Yoshida S, Tazaki K, Minamikawa T** (1975) Occurrence of Shikimic and Quinic Acids in

Angiosperms. *Phytochemistry* **14**: 195–197

Zabalza A, Orcaray L, Fernández-escalada M, Zulet-González A, Royuela M (2017) The pattern of shikimate pathway and phenylpropanoids after inhibition by glyphosate or quinate feeding in pea roots. *YPEST*. doi: 10.1016/j.pestbp.2016.12.005

Zulet-González A (2014) Estudio del quinato como potenciador del herbicida glifosato en poblaciones sensibles y resistentes de *Amaranthus palmeri*. Universidad Pública de Navarra

Zulet A, Gil-Monreal M, Villamor JG, Zabalza A, van der Hoorn R a L, Royuela M (2013a) Proteolytic Pathways Induced by Herbicides That Inhibit Amino Acid Biosynthesis. *PLoS One* **8**: e73847

Zulet A, Gil-Monreal M, Zabalza A, van Dongen JT, Royuela M (2015) Fermentation and alternative oxidase contribute to the action of amino acid biosynthesis-inhibiting herbicides. *J Plant Physiol* **175**: 102–112

Zulet A, Zabalza A, Royuela M (2013b) Phytotoxic and Metabolic Effects of Exogenous Quinate on *Pisum sativum* L. *J Plant Growth Regul* **32**: 779–788