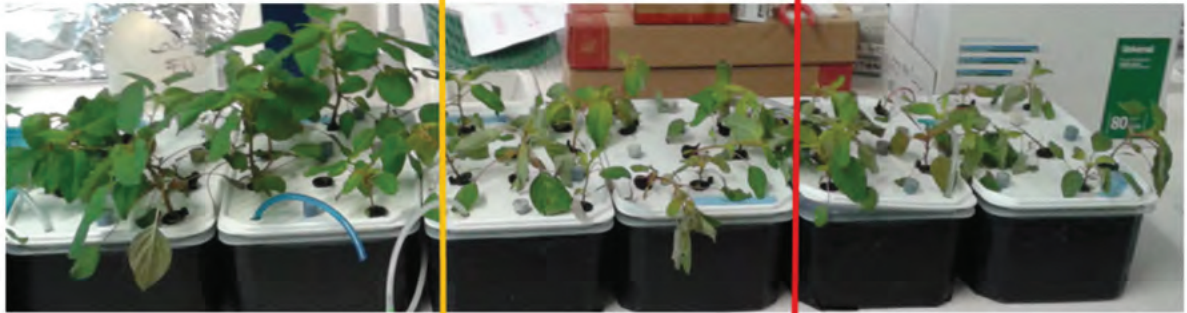


NC-S



NC-R



Control

G1=0.84 kg ha⁻¹

G1=2.52 kg ha⁻¹

Imagen 1. Población NC-S (arriba) y población NC-R (abajo) de *Amaranthus palmeri* tratadas con glifosato transcurridos 3 días. A la izquierda plantas control, en medio plantas tratadas con la dosis recomendada en campo de glifosato G1 (0.84 kg ha⁻¹) y a la derecha plantas tratadas con 3 veces la dosis recomendada en campo de glifosato G3 (2.52 kg ha⁻¹).

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

Universidad Pública de
Navarra, Pamplona/Iruña.
*manuel.fernandez@unavarra.es

Efecto del glifosato en la expresión génica de la ruta del siquimato en *Amaranthus palmeri*

Este estudio ha abordado el efecto del herbicida glifosato en la regulación de la ruta del siquimato en la especie *Amaranthus palmeri*, comparando una población sensible a glifosato con una población resistente. Se ha podido observar que el gran aumento en el número de copias génicas del enzima EPSPS en la población resistente no tiene un efecto general basal en la expresión de los demás genes de esta ruta de síntesis de los aminoácidos aromáticos ni en el contenido en triptófano, tirosina y fenilalanina. Tras el tratamiento con glifosato, se observó, en ambas poblaciones, una inducción general de la expresión de los genes de la ruta del siquimato, dependiente de la dosis de glifosato. Es destacable que la aplicación del glifosato provoca el aumento de la expresión y actividad AS, y la tendencia opuesta en expresión CM, lo que conlleva un flujo preferente hacia la formación de triptófano en lugar de tirosina y fenilalanina.

Palabras clave: Glifosato, ruta del siquimato, *Amaranthus palmeri*, expresión relativa del mRNA, corismato mutasa, antranilato sintasa.

La ruta del siquimato se alimenta de los esqueletos carbonados procedentes de la glicolisis (fosfoenolpiruvato) y de la ruta de las pentosas fosfato (eritrosa4-fosfato). Consta de una sucesión de seis actividades enzimáticas consecutivas (Figura 1): deoxi-D-arabino-heptuloso-7-fosfato sintasa (DAHPS), 3-dehidroquinato sintasa (DHQS), siquimato quinasa (SK), 5-enolpiruvil-siquimato 3-fosfato sintasa (EPSPS) y corismato sintasa (CS) hasta la formación de corismato. Usando como sustrato el corismato, la ruta se divide en dos ramales diferenciados para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (AAA): por un lado, el enzima corismato mutasa (CM), que lleva a la síntesis de tirosina y fenilalanina; y por otro, el enzima antranilato sintasa (AS), que lleva a la síntesis de triptófano (Tzin y col., 2012).

El glifosato es un herbicida que inhibe la biosíntesis de los tres aminoácidos aromáticos. El sitio primario de acción del glifosato es la inhibición específica de un enzima clave en la ruta del siquimato: el enzima EPSPS (Gaines y col., 2010; Powles and Yu, 2010) que convierte el siquimato-3-fosfato y el fosfoenolpiruvato en 5-enolpiruvil-siquimato-3-fosfato. A pesar de que se conoce el mecanismo de acción del glifosato (bloqueo del enzima EPSPS) (Steinrücken y Amrhein, 1980), no se conoce completamente el modo de acción del mismo (Gomes y col., 2014) (conjunto de procesos que llevan a la muerte de la planta tras este bloqueo), información que puede ser clave para desarrollar nuevos herbicidas. El uso intensivo del glifosato ha provocado el desarrollo de resistencias en muchas especies de malas hierbas, como *Amaranthus palmeri*, cuya resistencia fue documentada por primera vez en 2006 (Culpepper y col. 2006), y cuyo mecanismo de resistencia al glifosato, la amplificación génica del enzima EPSPS, fue descrito por primera vez en 2010 (Gaines y col. 2010).

El objetivo general de este estudio es profundizar en el conocimiento de la regulación de la vía de biosíntesis de los AAA. Para ello se ha trabajado con dos poblaciones de

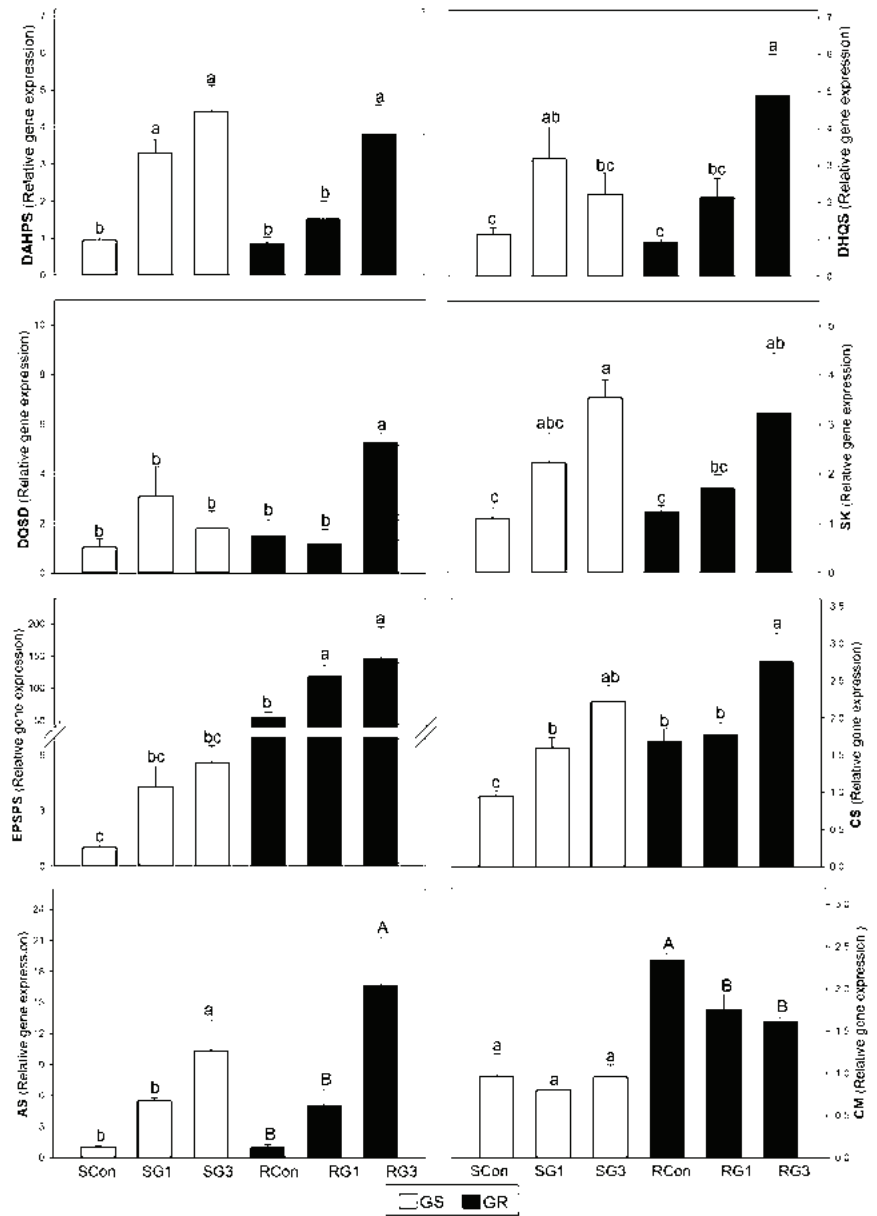


Figura 1. Expresión relativa al control del mRNA de los enzimas de la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos (AAA). En blanco la población sensible y en negro la resistente, para ambas poblaciones tratamiento con (control), G1 (dosis de glifosato recomendada en campo) y G3 (tres veces la dosis de glifosato recomendada en campo). Diferentes letras minúsculas en la población sensible, y diferentes letras mayúsculas en la población resistente indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada población ($p \leq 0.05$).

Amaranthus palmeri de diferente sensibilidad al glifosato, una sensible (NC-S) y otra resistente al mismo (NC-R), con una amplificación génica de 47,5 veces más copias de EPSPS que la población sensible (Fernández-Escalada y col. 2016). Concretamente, se quiere valorar la implicación que tiene en la vía la sobreexpresión del enzima EPSPS y estudiar los efectos fisiológicos que provoca el glifosato en la regulación de la ruta de biosíntesis de AAA (donde se localiza su diana).

Material y métodos

Muestreo y extracción de cDNA

Las semillas de los biotipos NC-R y NC-S fueron proporcionadas por el Dr. Todd Gaines (Colorado State University, Fort Collins, CO, USA) y fueron originalmente recolectadas en North Carolina (USA). Se esterilizó la superficie de las semillas y fueron crecidas en cultivo hidropónico durante tres semanas en condiciones controladas de luz y humedad, momento en el que fueron sometidas a los distintos

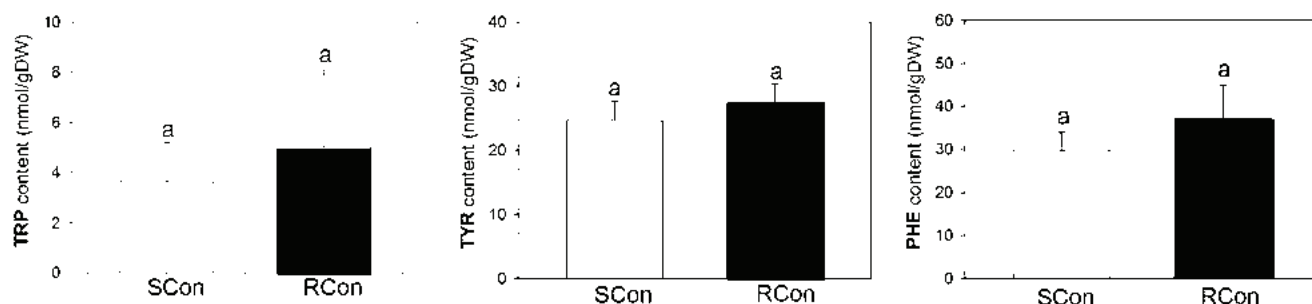


Figura 2. Contenido en triptófano, tirosina y fenilalanina libres en condiciones control para la población sensible (en blanco) y para la resistente (en negro). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada población ($p \leq 0.05$).

tratamientos: spray glifosato a la dosis recomendada en campo (0.84 kg ha^{-1}) y a una dosis tres veces la recomendada en campo (2.52 kg ha^{-1}). Las hojas de las plantas fueron cosechadas tres días después de la aplicación, un tiempo suficientemente largo para poder ver los efectos del tratamiento sobre los parámetros fisiológicos sin que las plantas lleguen a la letalidad o se recuperen (Figura 1), y después fueron congeladas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

qPCR

Se realizaron cinco réplicas biológicas por cada tratamiento, tanto para la población sensible como para la resistente. Se empleó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para medir la expresión del mRNA en plantas de las poblaciones NC-S y NC-R en las enzimas de la ruta de biosíntesis de los AAA: D-arabino-heptulose 7-phosphate synthase (DAHPS), dehydroquinase synthase (DHQS), 3-dehydroquinase dehydratase/shikimate dehydrogenase (DQSD), shikimate kinase (SK), The 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (EPSPS) and chorismate synthase (CS) anthranilate synthase (AS) chorismate mutase (CM). Las PCR cuantitativas fueron realizadas en la CSU en colaboración con el laboratorio del Dr. Todd Gaines (Colorado State University, Fort Collins, CO, USA) según Gaines y col. (2010).

Contenido en aminoácidos aromáticos libres en condiciones control

Para la extracción de los aminoácidos se siguió el protocolo de Orcaray y col. 2010. Los aminoácidos aromáticos fueron medidos por electroforesis capilar siguiendo el pro-

Enzima	DAHPS	DHQS	DQSD	SK	EPSPS	CS	CM	AS
Expresión relativa en plantas control R/S	0.86 ± 0.19	0.92 ± 0.12	1.48 ± 0.68	1.32 ± 0.19	55.02 ± 11.18	1.68 ± 0.17	2.33 ± 0.10	1.01 ± 0.21

Tabla 1. Diferencias entre las plantas control de las poblaciones sensible y resistente de *Amaranthus palmeri* en la expresión de los enzimas de la ruta de biosíntesis de los AAA.

cedimiento de Zulet y col. 2013b. Las medidas se hicieron usando un voltaje de +30 kV (kilovoltios) para tirosina y fenilalanina y +20 kV para el triptófano.

Actividad enzimática CM y AS

Se han realizado cuatro réplicas biológicas por cada tratamiento, tanto para la población sensible como para la resistente. La actividad enzimática CM se cuantificó según Goers y Jensen (1984) con ligeras variaciones y se determinó la absorbancia a 320 nm. La actividad enzimática AS se cuantificó según Ishimoto y col. (2010) con ligeras variaciones y se determinó la fluorescencia con filtros excitación/emisión 340/400 nm (Matsukawa y col. 2002).

Resultados y discusión

Se estudió la expresión génica de los enzimas de la ruta del siquimato cuando las plantas son tratadas con diferentes dosis de glifosato, y con los resultados obtenidos, se decidió estudiar también la actividad enzimática de los enzimas con variaciones más relevantes en la expresión: *corismato mutasa (CM)* y *antranilato sintasa (AS)*.

Expresión génica de los enzimas de la ruta del siquimato

Si se compara la expresión génica de cada enzima según la población, no

hay grandes diferencias entre ambas, salvo en el caso ya sabido del enzima EPSPS, enzima diana del herbicida glifosato, para el que ha desarrollado resistencia *Amaranthus palmeri* mediante amplificación génica (Gaines y col. 2010). Este enzima muestra una expresión más de 50 veces superior en la población resistente que en la sensible (en condiciones control, sin tratamiento con herbicida) (Tabla 1, EPSPS), y unas 25 veces mayor si se comparan tratamientos (Figura 1, EPSPS).

Se observó que la tendencia general tras la aplicación del tratamiento de glifosato, tanto en la población sensible como en la resistente, es un aumento significativo de la expresión génica de los enzimas pre-corismato, dependiente de la dosis. El análisis de la vía post-corismato muestra que el glifosato no tiene gran efecto en la expresión del enzima CM (sin cambios significativos en la población sensible y un descenso en la población resistente), pero sí provoca un incremento de la expresión del enzima AS, en ambas poblaciones, que fue muy superior al que se dio en el resto de enzimas de la ruta.

Contenido en Trp, Tyr y Phe en condiciones control

Se han realizado cuatro réplicas biológicas por cada tratamiento, tanto para la población sensible como

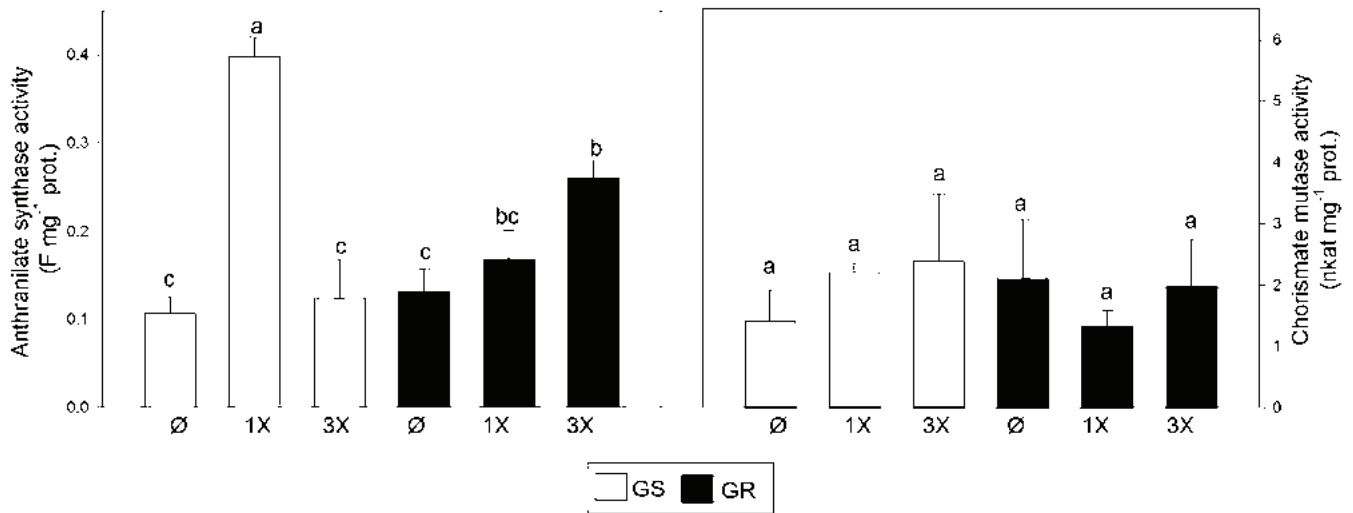


Figura 3. Actividad de los enzimas corismato mutasa (CM) (izquierda) y antranilato sintasa (AS) (derecha). En blanco la población sensible y en negro la resistente, siendo para ambas poblaciones los tratamientos control, G1 (dosis de glifosato recomendada en campo) y G3 (tres veces dosis de glifosato recomendada en campo). Diferentes letras minúsculas en la población sensible, y diferentes letras mayúsculas en la población resistente indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

para la resistente en condiciones control. Se ha podido observar que no hay diferencias significativas en el contenido en triptófano, tirosina y fenilalanina entre las dos poblaciones (Figura 2).

Actividad de los enzimas CM y AS

Se complementó este estudio comprobando la actividad de los enzimas que modificaban su expresión de una manera más relevante, y fueron el enzima CM y el enzima AS (Figura 3). En cuanto a la enzima CM, se observó que no hay diferencias significativas en su actividad ni en la población sensible ni en la resistente con un aumento de la dosis de glifosato. El enzima AS mostró un comportamiento notablemente diferente, ya que se observaron aumentos significativos respecto al control en la actividad tanto en la población sensible (aunque sólo a la menor dosis) como en la resistente, donde se vio un aumento progresivo que depende de la dosis. Así, se puede decir que conforme se aumenta la dosis de glifosato, no hay cambios en la actividad CM y, sin embargo, la actividad AS aumenta, siendo este comportamiento similar en ambas poblaciones, y similar al mostrado en la expresión.

Discusión

Comparando los datos de expresión génica obtenidos en las plantas sin

tratar con glifosato de las poblaciones sensible y resistente de *Amaranthus palmeri*, se puede inferir que el gran aumento en el número de copias génicas del enzima *EPSPS* en la población resistente al glifosato no afecta a la expresión basal de los genes de la ruta de síntesis de los aminoácidos aromáticos (Tabla 1) ni al contenido en aminoácidos aromáticos libres (Figura 2). En ambas poblaciones se detectó una inducción general de la expresión de los enzimas de la ruta tras el tratamiento con glifosato dependiente de la dosis (Figura 1), lo que sugiere una respuesta transcripcional generalizada de la ruta a dicho tratamiento. Este efecto generalizado no había sido detectado anteriormente en otras especies, como *Kochia scoparia* (Wiersma y col. 2014) que también presentaban amplificación génica como mecanismo de resistencia al glifosato.

Además, se observó un aumento tanto en la expresión génica como en la actividad

enzimática de la enzima AS con la dosis de glifosato, siendo este comportamiento similar en ambas poblaciones (Figuras 1 y 3). Por el contrario, la expresión génica del enzima CM se mantuvo sin diferencias significativas en la población sensible y descendió en la resistente, no habiendo diferencias significativas

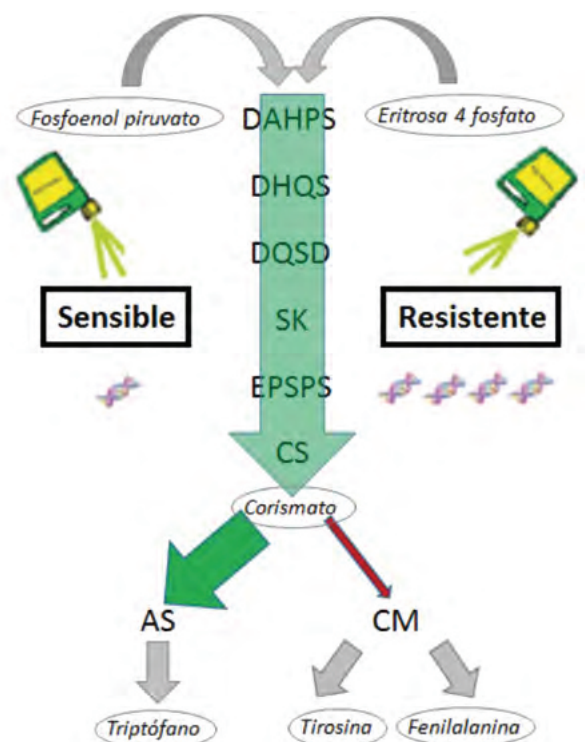


Figura 4. Esquema resumen de los enzimas implicados en la ruta de biosíntesis de AAA (triptófano, tirosina y fenilalanina). Las flechas verdes indican la inducción en la expresión génica de las enzimas y en rojo la inhibición.

en su actividad enzimática ni según la dosis de glifosato ni entre poblaciones (Figuras 1 y 3). La bifurcación de la ruta tras la formación de corismato ha sido sugerida como punto de regulación *feedback* por Schmid y Amrhein (1995), lo que le confiere una importancia destacada. Nuestros resultados sugieren una desviación preferente del flujo de carbono hacia la síntesis de triptófano, en detrimento de la formación de tirosina y fenilalanina (Figuras 1 y 3), lo que podía estar relacionado con una regulación de la ruta de los AAA que pudiera tener como señal el triptófano, como ha sido sugerido por Galili y col. (2016) para la especie *Arabidopsis thaliana*. Estos nuevos aspectos sobre la regulación de la ruta de los AAA pueden complementar el conocimiento sobre la respuesta al tratamiento con glifosato que hasta ahora se tenía de la sobreexpresión génica del enzima EPSPS (Gaines y

col. 2010), proporcionando una visión global de su funcionamiento, que nos acerca a poder explicar el modo de acción del glifosato.

Conclusiones

La sobreexpresión del enzima EPSPS en la población NC-R no afectó al contenido en AAA ni a la expresión de genes de la ruta de la síntesis.

El tratamiento con glifosato provocó un incremento muy importante en la expresión de los enzimas de la vía tanto en la población sensible como en la resistente, de manera dosis-dependiente, indicando una regulación transcripcional coordinada en todo la ruta.

Se produjo una desviación preferente del flujo de carbono hacia la síntesis de triptófano, lo que confiere gran importancia al corismato como punto regulatorio de la ruta.

Abstract

This study has addressed the effect of glyphosate herbicide on the regulation of shikimate pathway in *Amaranthus palmeri*, comparing one resistant and one sensitive population. It has been observed that the large increase in the number of EPSPS gene copies in the resistant population does not have a basal pleiotropic effect on the expression of the other genes of this biosynthetic pathway. After glyphosate treatment, it was observed a general dose-dependent induction of the expression in both populations. It is noteworthy that the application of glyphosate causes increased AS expression and activity and the opposite trend in CM expression, which implicates a preferential flux toward the formation of tryptophan instead of tyrosine and phenylalanine.

Keywords: Glyphosate, shikimate pathway, *Amaranthus palmeri*, mRNA relative expression, chorismate mutase, antranilate synthase.

Bibliografía



- Culpepper AS, Grey T and Vencill W (2006). Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. *Weed Sci*, 54, 620-626.
- Fernández-Escalada M, Gil-Monreal M, Zabalza A and Royuela M (2016). Characterization of the *Amaranthus palmeri* physiological response to glyphosate in susceptible and resistant populations. *J Agric Food Chem*, 64, 95-106.
- Gaines TA, Zhang W, Wang D, Bukun B, Chisholm ST, Shaner DL, Nissen SJ, Patzoldt WL and Tranel PJ, Culpepper AS, Grey TL, Webster TM, Vencill WK, Sammons RD, Jiang J, Preston C, Leach JE, Westra P (2010). Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 1029-1034.
- Galili G, Amir R and Fernie AR (2016). The regulation of essential amino acid synthesis and accumulation in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 67, 153-78.
- Goers SK & Jensen RA (1984). Separation and characterization of two chorismate-mutase isoenzymes from *Nicotiana glauca*. *Planta*, 162, 109-116.
- Gomes M P, Smedbol E, Chalifour A, Henault-Ethier L, Labrecque M, Lepage L, Lucotte M, Juneau P (2014). Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: An overview. *J. Exp. Bot.* 65, 4691-4703.
- Ishimoto M, Rahman SM, Hanafy MS, Khalafalla MM, El-Shemy HA, Nakamoto Y, Kita Y, Takanashi K, Matsuda, F, Murano Y, Funubashi T, Miyagawa H and Wakasa K (2010). Evaluation of amino acid content and nutritional quality of transgenic soybean seeds with high-level tryptophan accumulation. *Mol Breed*, 25, 313-326.
- Matsukawa T, Ishihara A and Iwamura H (2002). Induction of anthranilate synthase activity by elicitors in oats. *Z fur Naturforsch C* 57, 121-128.
- Powles S B, and Yu Q. (2010). Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annu Rev Plant Biol*, 61, 317-347.
- Schmid J & Amrhein N (1995). The Shikimate Pathway. *Plant Amino Acids: Biochemistry and biotechnology*. Shing BK (ed.), pp.147-169. Marcel Dekker, Inc. New York City, New York, USA.
- Steinrücken H C and Amrhein N (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate acid-3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 94, 1207-1212.
- Tzin V, Rogachev I, Meir S, Moyal Ben Zvi M, Masci T, Vainstein A, Aharoni A and Galili G (2012). Tomato fruits expressing a bacterial feedback-insensitive 3-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase of the shikimate pathway possess enhanced levels of multiple specialized metabolites and upgraded aroma. *J Exp Bot*, 64, 4441-52.
- Wiersma AT, Gaines TA, Preston C, Hamilton, JP, Giacomini D, Buell CR, Leach JE, Westra P (2014). Gene amplification of 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-resistant *Kochia scoparia*. *Planta*, 241, 463-474.