

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

Ainhoa Zulet-González¹✉, Manuel Fernández-Escalada¹, Miriam Gil-Monreal¹, Ana Zabalza¹, Mercedes Royuela¹

¹Dpto. Ciencias Medio Natural, Universidad Pública de Navarra, 31006-Pamplona
✉ ainhoa.zulet@unavarra.es

Resumen: En este estudio se han abordado los mecanismos de regulación de la ruta del siquimato en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos. Para ello se han comparado el contenido de siquimato y de los enzimas EPSPS (5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa) y DAHPS (3-Deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintasa, enzima de entrada a la ruta) en hojas de dos poblaciones de *Amaranthus palmeri* (una sensible y otra resistente al glifosato) incubadas con glifosato y/o con diferentes intermediarios de la ruta (siquimato, quinato, fosfoenolpiruvato, y aminoácidos aromáticos). En ambas poblaciones se dieron similares efectos regulatorios de los intermediarios, evidenciando que la sobreexpresión de EPSPS no modifica de manera significativa la regulación general de la ruta. El enzima DAHPS se confirma como enzima clave en la regulación y en la respuesta al glifosato; su síntesis es inhibida por los productos finales de la ruta y por el quinato, y su regulación puede explicar la acumulación de siquimato tras la aplicación de glifosato.

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

1. INTRODUCCIÓN

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

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

El objetivo de este estudio fue profundizar en los mecanismos de regulación de la ruta del siquimato. Para ello se ha utilizado un novedoso método de aplicación de los tratamientos, mediante la incubación de discos de hojas de dos poblaciones de *A. palmeri* (una sensible y otra resistente por sobreexpresión de EPSPS). Así es posible comparar directamente el efecto del glifosato con el efecto de la aplicación exógena de diversos intermediarios de la misma ruta donde está localizada la diana del herbicida.



Figura 1. Esquema de la ruta del siquimato y síntesis de aminoácidos aromáticos. 3-Deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintasa (DAHPS); 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal. Las plantas de *A. palmeri* (Facilitadas por el Dr. Todd A. Gaines; Colorado State University, Fort Collins, CO, USA) se cultivaron en cultivo hidropónico puro con aireación forzada bajo condiciones controladas mediante el método descrito por Fernández-Escalada et al. (2016). La población resistente empleada en este ensayo presenta una amplificación génica de 47,5 veces más copias de EPSPS (Fernández-Escalada et al., 2016). Las semillas esterilizadas se colocaron individualmente sobre seedholders rellenos previamente con agar al 0.65%. Los contenedores se trasladaron a un fitotrón con condiciones controladas (fotoperíodo luz/oscuridad (h) = 16/8; T^a (°C): 22/18; y HR (%): 60/70%) durante 30 días.

Se recolectaron las hojas más jóvenes de cada uno de los individuos y se tomaron muestras frescas de discos de hoja de 4 mm de diámetro empleando un micro-perforador. Se realizaron dos experimentos: en el primero se determinó el contenido de siquimato dentro del tejido; y en el segundo se determinó el contenido de EPSPS y DAHPS mediante inmunodetección. En el primer ensayo se incubó un único disco de hoja por pocillo en microplacas de 96 pocillos con 100 µl de líquido de incubación (Fig. 2A); para el segundo se incubaron 25 discos de hoja por pocillo en microplacas de 6 pocillos con 2,5 ml de líquido de incubación (Fig. 2B). En ambos experimentos las condiciones de incubación fueron: 24°C, 24 h. Los tratamientos aplicados fueron: agua en el tratamiento control; siquimato 20 mM; quinato 50 mM; glifosato 2,7 mM; cicloheximida

200 μ M; glifosato con cicloheximida; PEP 10 mM; glifosato con PEP; AAA 10 mM de cada aa: fenilalanina, tirosina y triptófano; glifosato con AAA.

2.2. Determinaciones. Transcurrido el tiempo de incubación las placas para la determinación de siquimato se congelaron a -20°C hasta su análisis espectrofotométrico según el método descrito por Fernández-Escalada et al. (2016). En los pocillos que contenían 25 discos de hoja se retiró el medio líquido y fueron congelados en N_2 líquido y almacenados a -80°C hasta su análisis. Se determinó el contenido de EPSPS por inmunodetección según el método descrito por Fernández-Escalada et al. (2016) y el de DAHPS según el descrito por Zabalza et al. (2016).

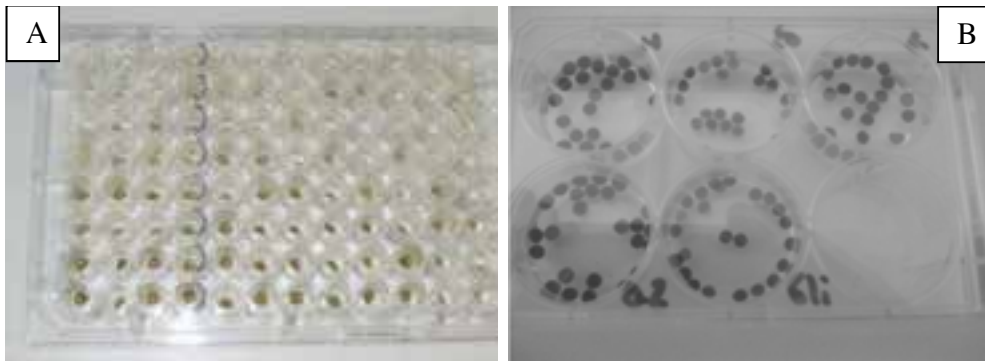


Figura 2. (A) Ensayo para la determinación de siquimato en el que se incubó un único disco por pocillo y (B) ensayo para la determinación del contenido de EPSPS y DAHPS en el que se incubaron 25 discos por pocillo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este ensayo se ha utilizado un método de incubación *in vivo* que permite tratar el material vegetal con intermediarios de la ruta del siquimato. Al tratarse de discos de hoja la incubación proporciona una mayor disponibilidad de los tratamientos en el interior de la hoja y permite trabajar en tiempos cortos (24h) lo que limita la degradación de estos compuestos.

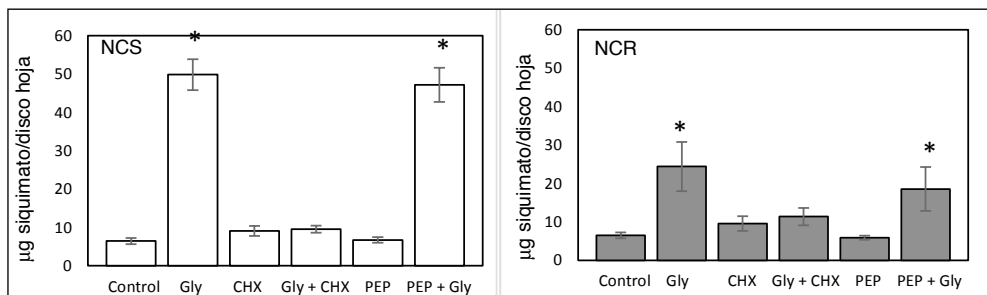


Figura 3. Contenido de siquimato en discos de hoja (población sensible en blanco, NCS, y resistente en gris, NCR). Tratamientos: agua (control); glifosato (Gly); cicloheximida (CHX); glifosato con cicloheximida; PEP; PEP con glifosato. Media \pm ES (n=10). * indica diferencias significativas ($p < 0.05$)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

La inhibición del enzima EPSPS por el herbicida glifosato provoca una gran acumulación de siquimato en hojas (Lydon and Duke 1988; Becerril et al., 1989; Hernández et al., 1999; Orcaray et al., 2010, 2012). En este ensayo se observa una acumulación de este compuesto en el tratamiento con glifosato en ambas poblaciones (Fig. 3), siendo menor en la población resistente (NCR) que en la población sensible (NCS), comprobando así la resistencia de la población al herbicida (Shaner et al., 2005).

El nivel de proteína EPSPS basal es muy diferente en ambas poblaciones, hay más proteína en la población resistente lo que hace que la inmunodetección se realice partiendo de distintas concentraciones de proteína. Este mayor contenido de proteína EPSPS en poblaciones con resistencia debido a amplificación génica ya se había descrito para *A. palmeri* (Gaines et al., 2010; Gaines et al., 2011; Ribeiro et al., 2014; Fernández-Escalda et al., 2016) y para otras especies (Wiersma et al., 2015). Tras la aplicación de glifosato se produce un aumento significativo de la cantidad de EPSPS en ambas poblaciones (Fig. 4, Fernandez-Escalada et al., 2016). Ambas poblaciones mostraron un incremento no significativo de la cantidad de enzima DAHPS tras el tratamiento con glifosato (Fig. 4; Pinto et al., 1988; Zabalza et al., 2016). El hecho de haber detectado los efectos ya conocidos del glifosato (acumulación de siquimato, mayor cantidad de proteína EPSPS y DAHPS) en los discos de hojas tratadas valida este método de ensayo para poder analizar el efecto directo de diferentes intermediarios metabólicos sobre dichos parámetros.

Si la acumulación de siquimato fuera la señal que hace que aumente la expresión de DAHPS y EPSPS, debería haberse observado una mayor cantidad de las mismas tras el tratamiento con siquimato. Sin embargo, no se produce ese aumento en ninguna de las dos poblaciones (Fig. 4).

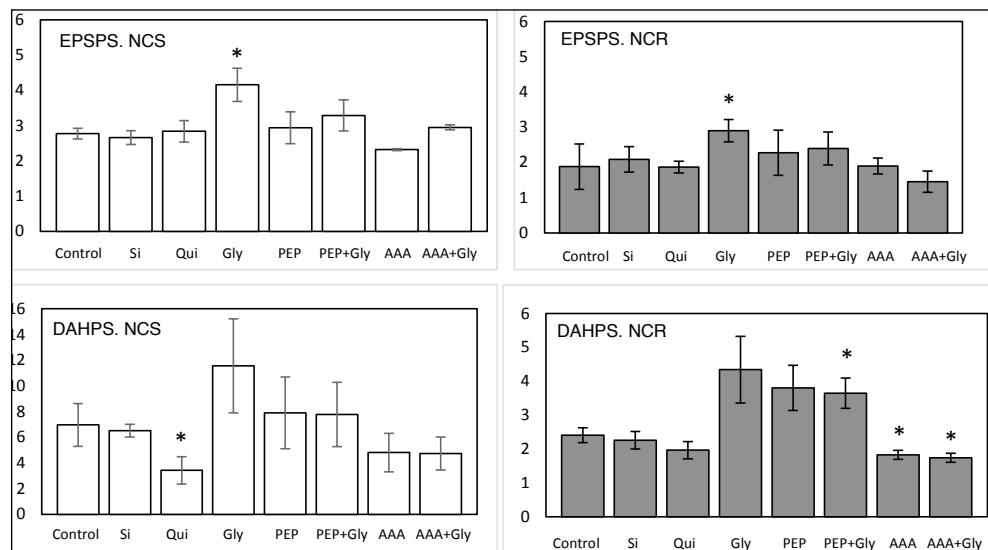


Figura 4. Efecto de los diferentes tratamientos en el contenido de los enzimas EPSPS y DAHPS (Adj. Vol. RD²mm²) en hojas de *A. palmeri*, población sensible (NCS) columnas blancas y resistente (NCR) grises. La proteína cargada en la inmunodetección de EPSPS fue de 60 µg para NCS y 15 µg para NCR, en el caso de DAHPS fue igual en ambas poblaciones (40 µg). Tratamientos: agua (control); glifosato (Gly); cicloheximida (CHX); glifosato con cicloheximida; PEP; PEP con glifosato; aminoácidos aromáticos (AAA); AAA con glifosato. Media ± ES (n=3). * indica diferencia significativa (p<0.05) con el control de la misma población.

Por otra parte, la acumulación de siquimato provocada por el glifosato fue suprimida en las plantas que fueron incubadas en presencia del herbicida y cicloheximida (Fig. 3), un inhibidor de la traducción proteica del citosol. Este resultado sugiere que únicamente se puede llegar a acumular siquimato con glifosato si se produce la síntesis simultánea de alguna proteína, que podría ser la DAHPS, al tratarse del enzima de inicio de la vía de biosíntesis de aminoácidos, donde se sintetiza siquimato y cuya síntesis aumenta en presencia de glifosato (Fig. 4).

La aplicación exógena de quinato, un metabolito formado a partir de una ramificación de la ruta del siquimato y cuya concentración aumenta con glifosato, no modificó la cantidad del enzima EPSPS pero sí disminuyó la cantidad de DAHPS en la población sensible (Fig. 4), tal y como describieron Zabalza et al. (2016) en guisante. A pesar de que se había propuesto que una hipotética mayor disponibilidad de PEP como efecto de la inhibición de EPSPS por el herbicida podría ser un factor que exacerbaría la acumulación de siquimato que provoca el herbicida (DeMaría et al., 2006), el tratamiento conjunto de PEP con glifosato provocó una acumulación de siquimato similar a la que se produce con el herbicida aplicado de forma aislada (Fig. 3). Los AAA aplicados de forma aislada o con glifosato produjeron (Fig. 4) una disminución del contenido de la proteína DAHPS en ambas poblaciones (significativa solo en la población resistente). Estos resultados sugieren que la mayor disponibilidad de productos finales, independientemente de la presencia de glifosato, regularían la cantidad de enzima DAHPS, puerta de entrada hacia la ruta del siquimato.

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

4. AGRADECIMIENTOS

Este proyecto ha sido financiado por el Ministerio Español de Economía y Competitividad (AGL-2013-40567R). M.F-E, A. Z-G y M. G-M han sido becarios predoctorales de la Universidad Pública de Navarra. Agradecemos a Gustavo Garijo por su asistencia técnica y al Dr. Todd A. Gaines (Colorado State University, Fort Collins, CO, USA) por las facilidades para realizar este trabajo.

5. REFERENCIAS

- Becerril, J.M., Duke, S.O. and Lydon, J. (1989). Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf. *Phytochemistry*, 28, 695-699.
- DeMaría, N., Becerril J., García-Plazaola, J., Hernández, A., DeFelipe, MR. and Fernández-Pascual, M. (2006). New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: Role of shikimate accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2621-2628.
- Fernández-Escalada, M., Gil-Monreal, M., Zabalza, A. and Royuela, M. (2016). Characterization of the *Amaranthus palmeri* physiological response to glyphosate in susceptible and resistant populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 95-106.
- Gaines, T.A., Shaner, D.L., Ward, S.M., Leach, J.E., Preston, C. and Westra, P. (2011). Mechanism of resistance of evolved glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5886-5889.

- Gaines, T.A., Zhang, W., Wang, D., Bukun, B., Chisholm, S.T., Shaner, D.L., Nissen, S.J., Patzoldt, W.L., Tranel, P.J., Culpepper, A.S., Grey, T.L., Webster, T.M., Vencill, W.K., Sammons, R.D., Jiang, J., Preston, C., Leach, J.E. and Westra, P. (2010). Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 1029-1034.
- Gomes, M.P., Smedbol, E., Chalifour, A., Häänault-Ethier, L., Labrecque, M., Lepage, L., Lucotte, M. and Juneau, P. (2014). Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: An overview. *Journal of Experimental Botany*, 65, 4691-4703.
- Hernández, A., García-Plazaola, J.I. and Becerril, J.M. (1999). Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2920-2925.
- Lydon, J. & Duke, S.O. (1988). Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 813-818.
- Orcaray, L., Igal, M., Marino, D., Zabalza, A. and Royuela, M. (2010). The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. *Pest Management Science*, 66, 262-269.
- Orcaray, L., Zulet, A., Zabalza, A. and Royuela, M. (2012). Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. *Journal of Plant Physiology*, 169, 27-33.
- Pinto, J E., Dyer, W E., Weller, S C. and Herrmann, K M. (1988). Glyphosate induces 3-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in potato (*Solanum tuberosum* L.) Cells grown in suspension culture. *Plant Physiology*, 87, 891-893.
- Powles, S.B. & Yu, Q. (2010). Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Reviews in Plant Biology*, 61, 317-347.
- Ribeiro, D.N., Pan, Z., Duke, S.O., Nandula, V.K., Baldwin, B.S., Shaw, D.R. and Dayan, F.E. (2014). Involvement of facultative apomixis in inheritance of EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant *Amaranthus palmeri*. *Planta*, 239, 199-212.
- Shaner, DL, Nadler-Hassa, T, Henry, WB and Koger, CH (2005). A rapid *in vivo* shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science*, 53, 769-774.
- Siehd D. (1997). Inhibitors. *Herbicide activity: Toxicology, biochemistry and molecular biology*. Roe R., Burton J., Kuhr R. Amsterdam. 37-67.
- Wiersma, AT, Gaines, TA, Preston, C, Hamilton, JP, Giacomini, D, Robin Buell, C, Leach, JE and Westra, P (2015). Gene amplification of 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-resistant *Kochia scoparia*. *Planta*, 241, 463-474.
- Zabalza A., Orcaray L., Fernández-Escalada M., Zulet-González, A. and Royuela, M. (2016). The pattern of shikimate pathway and phenylpropanoids after inhibition by glyphosate or quinate feeding in pea roots. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. DOI: 10.1016/j.pestbp.2016.12.005.

Effect of glyphosate and different metabolic intermediates on the regulation of shikimate pathway

Summary: This study is an approach to the mechanisms of regulation of the shikimate pathway (located in the biosynthetic pathway of the aromatic amino acids). For that aim, shikimate content and protein amount of EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) and DAHPS (3-Deoxy-d-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase, first enzyme of the pathway) have been compared in leaf discs of two populations of *Amaranthus palmeri* (one sensitive and another glyphosate-resistant) incubated with glyphosate or several intermediates of the shikimate pathway (shikimate, quinate, phosphoenol pyruvate and aromatic amino acids). Both populations showed similar regulatory patterns, evidencing that EPSPS overexpression does not significantly affect the overall regulatory mechanisms. DAHPS is confirmed to be a key enzyme in the regulation of the shikimate pathway and in the physiological response to glyphosate, as its synthesis is inhibited by aromatic amino acids and quinate and seems to be involved in the elicited shikimate accumulation after glyphosate treatment.

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