

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA***

**VALORACIÓN DE LA FERMENTACIÓN ETANÓLICA EN LA TOXICIDAD DE
LOS HERBICIDAS INHIBIDORES DE LA BIOSÍNTESIS DE LOS AMINOÁCIDOS
RAMIFICADOS**

presentado por

MICAELA GARCÍA ETXEBERRIA *(e)k*

aurkeztua

GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL

***GRADUA NEKAZARITZAKO ELIKAGAIEN ETA LANDA INGURUNEAREN
INGENIARITZAN***

Enero, 2015 / 2015, Urtarrila

AUTORIZACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO FIN DE GRADO

La **Dra. Ana Zabalza Aznárez**, Profesora Contratada Doctor y **Da. Miriam Gil Monreal**, becaria predoctoral de la Universidad Pública de Navarra, del Departamento de Ciencias del Medio Natural, de la Universidad Pública de Navarra,

INFORMAN:

que el trabajo titulado “**Valoración de la fermentación etanólica en la toxicidad de los herbicidas inhibidores de la biosíntesis de los aminoácidos ramificados**” que presenta la alumna **Micaela García Etxeberría** para optar al título de *Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural*, ha sido desarrollado bajo su 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 Fin de Grado.

Pamplona, a 16 de enero de 2015

Fdo.: Ana Zabalza Aznárez

Fdo. Miriam Gil Monreal

Valoración de la fermentación etanólica en la toxicidad de los herbicidas inhibidores de la biosíntesis de los aminoácidos ramificados

Micaela García Etxeberria

Tutoras/ *Tutoreak*:

Fdo.: Ana Zabalza Aznárez

Fdo. Miriam Gil Monreal

Departamento de Ciencias del Medio Natural
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos
Universidad Pública de Navarra
Campus Arrosadía s/n
31006 Pamplona

*Natura Ingurunearen Zientziak
Nekazaritza Ingeniarien Goi Mailako Eskola Teknikoa
Nafarroako Unibertsitate Publikoa
Arrosadia Kanpusa z/g
31006 Iruña*

RESUMEN

En la actualidad, una importante parte de los herbicidas utilizados son herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados, de los que no se conoce exactamente la respuesta fisiológica que producen en las plantas. En este trabajo se ha profundizado en un efecto fisiológico de estos herbicidas, que es la inducción de la fermentación aeróbica.

Se ha evaluado si la respuesta fisiológica en raíces de plantas de guisante al herbicida Imazamox se modificaba si las plantas eran sometidas a un pretratamiento hipóxico. Los resultados obtenidos apuntan a que los marcadores del efecto herbicida (inhibición del crecimiento, acumulación de aminoácidos libres y carbohidratos) se atenúan si las plantas tienen el metabolismo fermentativo activo en el momento de aplicación del herbicida, sugiriendo que la respuesta fermentativa ayudaría a la supervivencia de la planta tratada.

PALABRAS CLAVE

Imazamox; Hipoxia; Herbicida; Fermentación; Inhibidores de acetolactato sintetasa.

LABURPENA

Gaur egun erabiltzen diren herbiziden artean, beren erantzun fisiologikoa zehatz mehatz ezagutu ez arren, aminoazido aldarkatuen biosintesi inhibitzaileen erabilera oso zabalduta dago. Lan honetan, hain zuzen, herbizida horiek landareetan gauzatzen duten eragin fisiologiko batean, hau da, hartzidura aerobikoan sakondu egin da.

Ilar sustraietan Imazamox herbizidak sortzen dituen efektu fisiologikoek aldaketak jasaten dituzten balioztatu da, landare hauek, aurretratamendu hipoxiko baten eraginpean jarri ezker.

Jasotako emaitzek iradokitzen digute markagailu fisiologikoak (hazte etenketak, aminoazido libre eta karbohidrato pilaketa) apaldu egiten direla, baldin eta landareek, herbizida aplikatzen den momentuan, metabolismo hartzigarria aktiboa badute. Beraz, ondorioztatu dezakegu metabolismo hartzigarria martxan izateak, tratatutako landareari, bizirik mantentzen lagunduko liokeela.

GAKO-HITZAK

Imazamox; Hipoxia; Herbizida; Hartzidura; Azetolaktato sintetasa inhibitzailea.

ABSTRACT

Branched chain amino acid biosynthesis inhibiting-herbicides are among the most widely used herbicides, although the physiological effects that they trigger in plants are not fully understood. The objective of this work was to gain further insight into the role of fermentation in the toxic consequences of branched chain amino acid biosynthesis inhibitors.

In order to achieve this aim, it was compared the effects of Imazamox on roots of pea plants exposed to hypoxia before the herbicide treatment with plants non pretreated with hypoxia. The results indicate that the already described physiological consequences of this type of herbicides (growth arrest and carbohydrate and free amino acid accumulation) were alleviated if the plants had the fermentative metabolism induced when the herbicide was applied. These results suggest that the induction of ethanolic fermentation in treated plants would result in better tolerance to the herbicide.

KEYWORDS

Imazamox; Hypoxia; Herbicide; Fermentation; Acetolactate synthase inhibitors.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1	RESPIRACIÓN Y FERMENTACIÓN EN LAS PLANTAS	1
1.1.1	Rutas de fermentación	3
1.2	BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS EN PLANTAS	4
1.2.1	Biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada en plantas.....	4
1.3	HERBICIDAS	7
1.3.1	Generalidades	7
1.3.2	Herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados (IBAR) 9	
1.4	LA FERMENTACIÓN EN PLANTAS Y SU RELACIÓN CON ESTRESSES ABIÓTICOS.....	13
1.5	JUSTIFICACIÓN	14
1.6	OBJETIVOS	15
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1	OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	17
2.1.1	Esterilización y germinación de las semillas.....	17
2.1.2	Condiciones de crecimiento	17
2.1.3	Diseño experimental y aplicación de los tratamientos	18
2.2	MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO EN LA SOLUCIÓN NUTRITIVA	19
2.3	OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	21
2.4	DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CRECIMIENTO	21
2.5	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS.....	21
2.5.1	Extractos para la determinación del contenido en azúcares solubles	21
2.5.2	Extractos para la determinación del contenido en almidón.....	21
2.5.3	Determinación del contenido en carbohidratos solubles	22
2.6	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN AMINOÁCIDOS	22
2.7	DETERMINACIÓN DE LOS ENZIMAS FERMENTATIVOS	23
2.7.1	Determinación del contenido de proteína soluble y la actividad enzimática de los enzimas PDC y ADH <i>in vitro</i>	23
2.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
3.1	EFFECTOS EN EL CRECIMIENTO.....	25

Índice

3.2	EFFECTOS EN EL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS	30
3.3	EFFECTOS EN EL CONTENIDO DE PROTEINA SOLUBLE	32
3.4	ENZIMAS FERMENTATIVOS	34
3.4.1	Actividad <i>in vitro</i> del enzima fermentativo PDC	34
3.4.2	Actividad <i>in vitro</i> del enzima fermentativo ADH	35
3.5	EFFECTOS EN EL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS	37
3.5.1	Contenido de fructosa	37
3.5.2	Contenido de glucosa	38
3.5.3	Contenido de sacarosa	39
3.5.4	Contenido de carbohidratos totales.....	40
3.5.5	Contenido de almidón.....	41
3.6	DISCUSION GENERAL	42
4.	CONCLUSIONES GENERALES	43
5.	BIBLIOGRAFÍA	45

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 RESPIRACIÓN Y FERMENTACIÓN EN LAS PLANTAS

La respiración es un proceso gracias al cual las plantas oxidan los elementos orgánicos generados en la fotosíntesis dando lugar a la liberación de energía almacenada en dichos compuestos (Figura 1.1). La energía liberada sirve para el mantenimiento y desarrollo de la planta. Al mismo tiempo, en la respiración, se generan muchos compuestos intermediarios metabólicos precursores de diferentes procesos de biosíntesis (aminoácidos, etc.).

En las células vegetales, el principal sustrato de la respiración es la sacarosa aunque también hay otros sustratos minoritarios que derivan de diversas fuentes: hexosas fosfato y triosas fosfato derivadas de la degradación del almidón y de la fotosíntesis; polímeros que contienen fructosa y otros azúcares; lípidos; ácidos orgánicos y en ocasiones, proteínas. Estos sustratos entran en el proceso respiratorio en diferentes puntos de la ruta (Taiz and Zeiger, 2010).

El primer paso de la respiración consiste en la degradación de la sacarosa (o sustrato correspondiente) dando lugar a las hexosas que servirán de sustrato a la siguiente etapa de la respiración, la glucólisis. En este proceso que tiene lugar en el citosol, se da la oxidación parcial de las hexosas dando lugar al piruvato y en menor medida de malato. Como consecuencia se libera una pequeña cantidad de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) y nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida (NADH).

Por otro lado, la ruta de las pentosas fosfato, localizada en el citosol y los plastos, complementa la glucólisis aportando más intermediarios de este proceso. En esta ruta se oxida la glucosa-6-fosfato dando lugar a azúcares de tres a siete carbonos, que son intermediarios de la glucólisis. Asimismo, en esta ruta se genera poder reductor en forma de NADH que se utiliza en la síntesis de ácidos nucleicos y otros procesos de biosíntesis (Taiz and Zeiger, 2010).

En condiciones aeróbicas normales, cuando hay oxígeno suficiente, el piruvato (o malato) es consumido a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (o también llamado ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico) el cual tiene lugar en la mitocondria. El ciclo de Krebs cumple dos funciones fundamentales, generar NADH y formar precursores de la síntesis

Introducción y objetivos

de aminoácidos. En esta etapa de la respiración el piruvato es oxidado completamente a dióxido de carbono (Taiz and Zeiger, 2010).

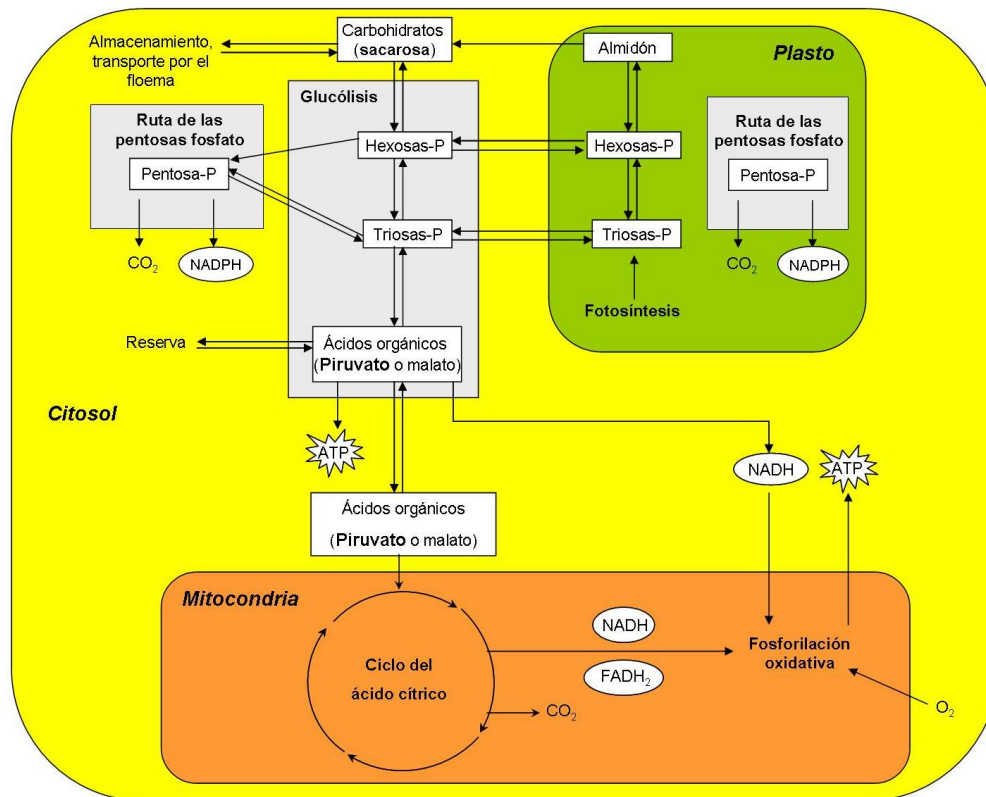


Figura 1.1.1 Esquema general de la respiración. Los sustratos de la respiración se generan en otros procesos celulares y entran en las rutas respiratorias. La glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato en el citosol y los plastos convierten azúcares en ácidos orgánicos, a través de las hexosas fosfato y las triosas fosfato, a la vez que generan NADH o NADPH y ATP . Los ácidos orgánicos son oxidados en el ciclo del ácido cítrico de la mitocondria y el NADH y FADH_2 producidos proporcionan la energía necesaria para la síntesis del ATP en la cadena de (Taiz and Zeiger 2010).

En la fosforilación oxidativa, la última etapa de la respiración, el NADH generado se consume en la cadena transportadora de electrones mitocondrial dando lugar a la síntesis de ATP . Esta cadena que se encuentra en una membrana interna y está compuesta por una serie de proteínas de transporte. Mediante este mecanismo se transfieren los electrones desde el NADH procedente de la glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs hasta el último aceptor, el oxígeno.

Sin embargo, cuando hay ausencia o falta de oxígeno ni el ciclo de Krebs ni la fosforilación oxidativa pueden funcionar, por tanto, no se regenera el NAD^+ requerido en la glucólisis y una vez que se consume todo el NAD^+ presente en la célula este último proceso tampoco puede llevarse a cabo.

La fermentación supone para las plantas un proceso alternativo para metabolizar el piruvato generado en la glucólisis mediante el cual se consigue regenerar parte de NAD^+

permitiendo así que la glucólisis continúe sintetizando ATP y la planta pueda sobrevivir (Taiz and Zeiger, 2010).

1.1.1 Rutas de fermentación

Hay dos rutas de fermentación principales descritas en plantas: la fermentación etanólica y la fermentación láctica (Figura 1.2). La primera de ellas, la más común en plantas, se forma CO_2 y etanol a partir de piruvato por acción de dos enzimas. El primer enzima en intervenir en la fermentación etanólica es el piruvato descarboxilasa (PDC; EC 4.1.1.1), el cual cataliza la conversión del piruvato en acetaldehído. A continuación, el alcohol deshidrogenasa (ADH; EC 1.1.1.1), convierte el acetaldehído en etanol. En la segunda ruta fermentativa mencionada, la fermentación láctica, se produce lactato a partir de piruvato y la reacción la lleva a cabo el enzima lactato deshidrogenasa (LDH; EC 1.1.1.27). En ambas vías es necesario el NADH como cofactor, de esta el NAD^+ necesario para la glucólisis se regenera (Ricard et al., 1994; Van Dongen and Licausi, 2014).

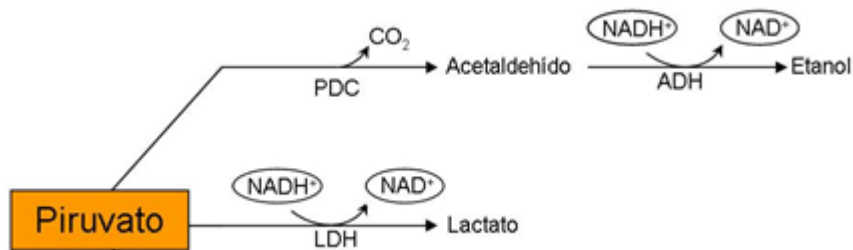


Figura 1.2 Diferentes rutas fermentativas que tienen como sustrato el piruvato. Se puede formar CO_2 y etanol a través de la fermentación etanólica por acción de los enzimas PDC y ADH; también se puede formar lactato a través de la fermentación láctica por acción del enzima LDH.

1.2 BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS EN PLANTAS

La función principal de los aminoácidos es su utilización en la síntesis de proteínas. Además, también desempeñan funciones esenciales en el metabolismo primario y secundario. Algunos aminoácidos sirven para transportar el nitrógeno de las fuentes a los sumideros y otros sirven como precursores de metabolitos secundarios, como hormonas y compuestos involucrados en la defensa de las plantas. Por lo tanto, la biosíntesis de aminoácidos controla directa o indirectamente diferentes aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas.

Existen 20 aminoácidos básicos, de los cuales los seres humanos pueden sintetizar 11. Estos aminoácidos reciben el nombre de no esenciales, a diferencia de los aminoácidos esenciales, que al no poder ser sintetizados deben de ser suministrados en la dieta directa.

Se han identificado enzimas en diferentes rutas de biosíntesis de aminoácidos que se ven afectados por la aplicación de herbicidas, lo cual tiene una aplicación directa en la agricultura. De especial importancia para el desarrollo de herbicidas son el estudio de aquellas rutas que dan lugar a la biosíntesis de los aminoácidos esenciales, porque son rutas exclusivas de plantas y microorganismos, por tanto, sus inhibidores presentan una baja toxicidad hacia los mamíferos (Singh, 1999).

1.2.1 Biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada en plantas.

Los aminoácidos de cadena ramificada (ó BCAA, Branched Chain Amino Acids) son los aminoácidos más hidrófobos y deben su nombre a que se trata de un grupo de aminoácidos no lineales. Entre ellos se encuentran la valina, la leucina y la isoleucina. Estos aminoácidos además de formar parte de las proteínas tienen otras funciones. Por ejemplo, muchos productos del metabolismo secundario derivan de estos tres aminoácidos; además, algunos de los intermediarios de su proceso de síntesis se utilizan en la biosíntesis del pantotenato (o vitamina B5) y del propionil-CoA. Los aminoácidos ramificados se sintetizan en plantas y microorganismos y como los mamíferos no pueden sintetizarlos y deben ingerirlos en la dieta, forman parte de los llamados aminoácidos esenciales (Singh, 1999).

La síntesis de estos aminoácidos sigue dos rutas paralelas cuyas reacciones las llevan a cabo los mismos enzimas pero con sustratos diferentes (Figura 1.3).

La síntesis de valina y leucina comienza con la condensación de dos moléculas de piruvato para producir CO_2 y 2-acetolactato, reacción catalizada por el enzima acetolactato sintasa (ALS; EC 2.2.1.6) o también llamado acetohidroxiácido sintasa (AHAS). Como se explicará a continuación, este enzima también interviene en la síntesis de isoleucina.

La biosíntesis de isoleucina comienza con la desaminación de la treonina dando lugar a una molécula de 2-cetobutirato y amonio; gracias al enzima treonina deshidratasa (TD; EC 4.3.1.19). A continuación el enzima ALS cataliza la condensación de una molécula de piruvato con otra de 2-cetobutirato para producir CO_2 y 2-aceto-2-hidroxi-butirato.

El siguiente paso en ambas rutas lo lleva a cabo el enzima cetoácido reductoisomerasa (KARI; EC 1.1.1.86); y las reacciones que cataliza son la reducción de los cetoácidos sintetizados por el enzima ALS produciendo así dihidroxiácidos. Éstos son transformados en derivados del ácido valérico por la actividad del enzima dihidroxiácido deshidratasa (DHAD, EC 4.2.1.9). El último paso de la ruta de biosíntesis de la isoleucina y la valina es catalizado por un enzima aminotransferasa. Por otro lado, la leucina se sintetiza en cuatro reacciones a partir del producto del enzima DHAD en la ruta de biosíntesis de la valina (el 2-oxoisovalerato), gracias a los enzimas isopropilmalato sintasa (EC 2.3.3.13) isopropilmalato isomerasa (EC 4.2.1.33); isopropilmalato deshidrogenasa (EC 1.1.1.85) y leucina transaminasa (EC 2.6.1.6).

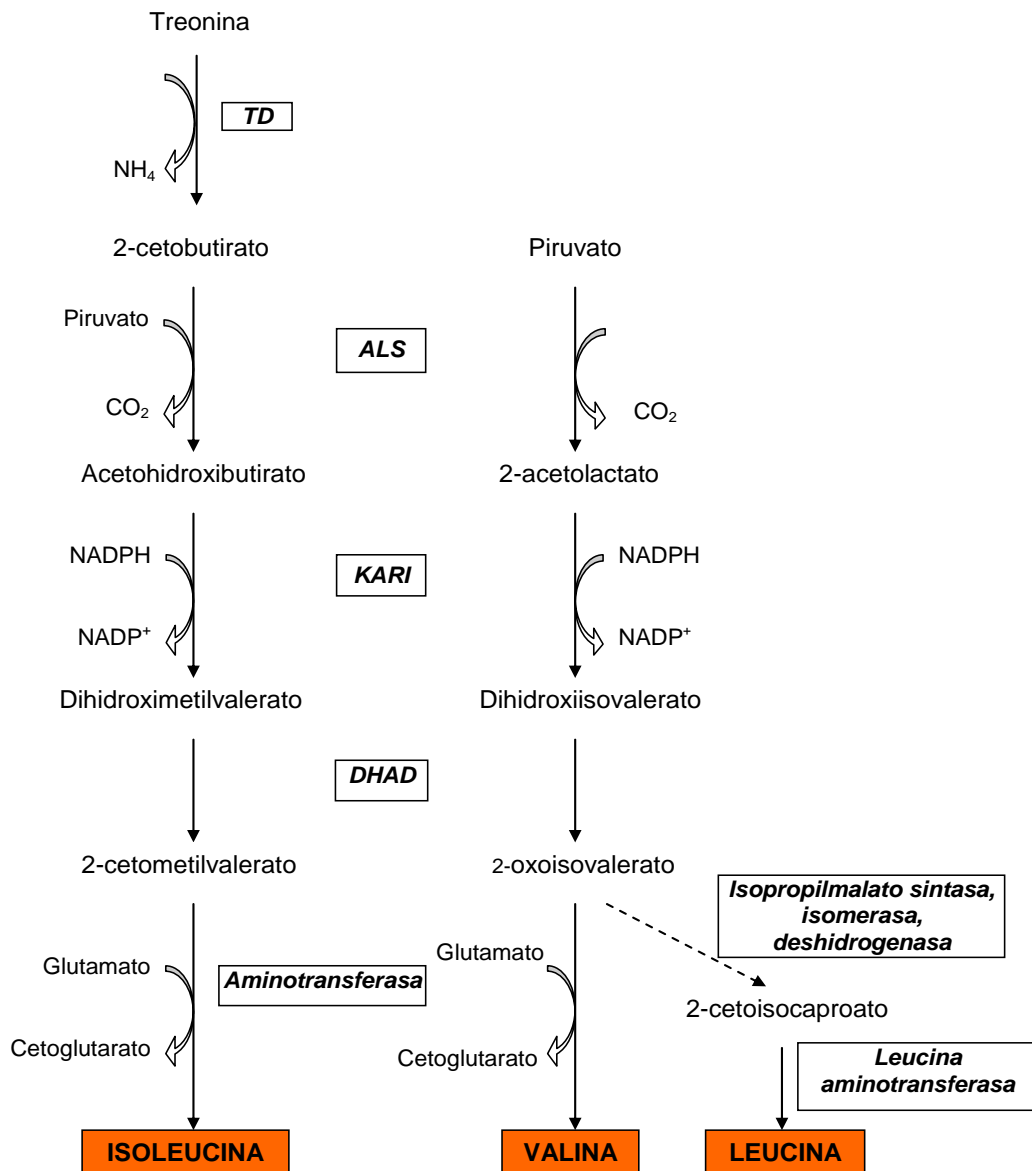


Figura 1.3. Ruta biosintética de los tres aminoácidos ramificados: valina, leucina e isoleucina. TD: treonina deshidratasa; ALS: acetolactato sintasa; KARI: cetoácido reductoisomerasa; DHAD: dihidroxiácido deshidratasa.

a) Localización de la síntesis de aminoácidos ramificados en plantas

Se ha detectado mRNA, proteínas codificadas y actividades enzimáticas de los diferentes enzimas de la ruta de síntesis de los aminoácidos ramificados en todos los órganos vegetales, por lo que se puede establecer que todos ellos pueden sintetizar valina, leucina e isoleucina. Asimismo, en un mismo órgano la síntesis de aminoácidos ramificados tiene lugar preferentemente en los tejidos jóvenes. Esto ha sido demostrado porque se ha visto que el mayor contenido de mRNA que codifican los enzimas de esta ruta se presenta en los tejidos más jóvenes de la planta. Asimismo, los tejidos más jóvenes presentan los mayores niveles de actividad de varios de los enzimas de la ruta. Finalmente, también se ha visto que el flujo de carbono a través de la ruta de biosíntesis de los aminoácidos ramificados tiene lugar principalmente en los tejidos jóvenes (Wittenbach and Abell, 1999).

A nivel subcelular la síntesis de aminoácidos ramificados tiene lugar en los plastidios (Singh, 1999). Se ha comprobado que de todos los orgánulos de espinaca aislados, los cloroplastos fueron los únicos capaces de sintetizar los aminoácidos ramificados a partir de [C¹⁴]-piruvato (SchulzeSiebert et al., 1984) y, por otro lado, sólo se detectó actividad de ciertos enzimas de la ruta biosintética de los BCAA en estos orgánulos (Dumas et al., 1989). Asimismo, se ha comprobado que todos los genes aislados que codifican para enzimas de la ruta de síntesis de los aminoácidos ramificados presentan una secuencia peptídica terminal que sirve de secuencia de tránsito de las proteínas sintetizadas en el citosol hasta los cloroplastos (Mazur et al., 1987; Wiersma et al., 1989; Dumas et al., 1991).

1.3 HERBICIDAS

1.3.1 Generalidades

Un herbicida es una sustancia química que se utiliza para matar o reprimir el crecimiento de las plantas no deseadas. Estas plantas son conocidas como malas hierbas y son plantas que crecen de manera espontánea en lugares donde no son deseadas.

Desde el comienzo de la agricultura se ha intentado combatir las malas hierbas porque disminuyen el rendimiento de los cultivos debido a que compiten con ellos por la luz, el agua y los nutrientes; obstaculizan la recolección; y, además pueden transmitir enfermedades (plagas de hongos, insectos, etc.). Antes de la existencia de los herbicidas los únicos métodos para controlar las malas hierbas eran mecánicos y se basaban en eliminarlas manualmente, y más adelante con maquinaria más sofisticada. No fue hasta el siglo XX cuando se comercializaron los primeros herbicidas, en concreto el primero en sintetizarse fue el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y se comercializó a principios de los años 40. A partir de entonces, la aparición de nuevos herbicidas incrementó rápidamente, y debido a su gran efectividad para eliminar malas hierbas y a la facilidad en el manejo fueron dejándose de lado los métodos mecánicos tradicionales.

Aunque en los últimos años se hacen esfuerzos para que la lucha contra las malas hierbas se apoye de nuevo en otros métodos como los mecánicos y físicos, y se ha conseguido compaginarlos con la lucha química, lo cierto es que en agricultura es primordial la utilización de herbicidas. Por otro lado, desde hace algunos años, las consideraciones de tipo medioambiental se han convertido en una de las mayores preocupaciones de la Política Agraria Común (PAC) y una de las medidas más recientes es la reducción de materias activas que pueden ser utilizadas. Concretamente, a mediados de 2011 se aplicó la Directiva 91/414/CEE con la cual se han retirado el 75% de las sustancias activas comercializadas como fitosanitarios hasta 1993, además de restricciones en la autorización de usos (MMARM, 2009).

Hay más de 250 materias activas con acción herbicida comercializadas en todo el mundo y aunque se trate de compuestos de gran éxito comercial, en muchos casos no resulta del todo conocido el proceso que origina la toxicidad en las plantas. Lo que es conocido es su **mecanismo de acción** o el primer proceso del metabolismo que es específicamente inhibido por cada herbicida (Abell, 1996) sin embargo, la investigación sobre herbicidas también debe proporcionar el conocimiento de las razones de la muerte de la planta, es decir, la secuencia de procesos que se desencadenan a partir de ese primer paso inhibido, lo que se conoce como modo de acción.

Existen numerosos sistemas de clasificación de los herbicidas basados en criterios muy dispares (Tabla 1.1). No obstante, la que mayor relevancia ha adoptado es la clasificación según su mecanismo o su sitio de acción. La importancia de esta clasificación radica en que proporciona más información sobre la interacción última entre herbicida y planta, y consecuentemente expresa el efecto fitotóxico del herbicida. Los herbicidas se clasifican en 22 grupos según su sitio de acción. (Tabla 1.1).

Introducción y objetivos

➤ Herbicidas inhibidores de la fotosíntesis:
★ Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II
★ Desviación del flujo electrónico en el fotosistema I
★ Inhibición de la biosíntesis de pigmentos
▪ Inhibición de la biosíntesis de clorofilas
▪ Inhibición de la biosíntesis de carotenoides
▪ Herbicidas que provocan decoloración
➤ Auxinas sintéticas
➤ Herbicidas inhibidores de la síntesis de lípidos
★ Inhibición del enzima acetil coenzima carboxilasa (ACCase)
★ Otros mecanismos (no inhibición de la ACCase)
➤ Herbicidas que inhiben la mitosis y la división celular
➤ Herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos
★ Inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos
★ Inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados
★ Inhibidores de la biosíntesis de glutamina
➤ Otros
★ Inhibidores de la síntesis de pared celular (celulosa)
★ Inhibidores de la biosíntesis de isoprenoides
★ Inhibidores de la biosíntesis de ácido fólico
★ Desacopladores
★ Otros

Tabla 1.1. Clasificación de los herbicidas según su sitio de acción (modificado de: <http://www.hracglobal.com/Education/ClassificationofHerbicideSiteofAction.aspx>).

A pesar de su efectividad eliminando las malas hierbas en la utilización de los herbicidas hay que considerar diversos aspectos. Por un lado, es importante el equilibrio persistencia-no persistencia. Para un cultivo uno de los momentos en los que la competencia con las malas hierbas puede tener efectos más negativos es la etapa inicial, el establecimiento del cultivo. Los herbicidas selectivos persistentes permitieron que aplicándolos en preemergencia de los cultivos su eficacia se mantuviera durante todo el tiempo del cultivo, lo que produjo un importante avance y efectividad en la lucha contra malas hierbas. No obstante, la utilización de herbicidas persistentes tiene muchas limitaciones. Un aspecto a considerar es que las diferentes condiciones edafoclimáticas afectarán a la persistencia. Una persistencia mayor a la deseada puede tener efectos adversos como una limitación de las rotaciones posteriores, efectos de fitotoxicidad o mayor probabilidad de que los herbicidas alcancen organismos no diana por lavados o arrastres.

Otro aspecto relacionado con los herbicidas que más problemas está ocasionando es el desarrollo de resistencias en poblaciones de malas hierbas. La resistencia se define como la capacidad heredada de una planta para sobrevivir y reproducirse después de una exposición a una dosis de herbicida que normalmente sería letal a su especie. Este fenómeno fue observado por primera vez a mediados de los años 60, con resistencias a las triazinas. Con el desarrollo de una amplia gama de herbicidas muy selectivos en los años 80, se pensaba que realmente estaba ganada la batalla contra las malas hierbas. Sin

embargo, este fenómeno de las resistencias se agravó de forma considerable (Figura 1.4). Actualmente ya se han descrito 590 biotipos resistentes a herbicidas (Heap, 2015) incluyendo además, fenómenos de resistencias cruzadas y múltiples. La razón del desarrollo de estos biotipos resistentes está en la enorme presión de selección que se ejerce sobre las poblaciones de malas hierbas con el uso continuado de herbicidas con el mismo mecanismo de acción (proceso metabólico de la planta sobre el que actúan).

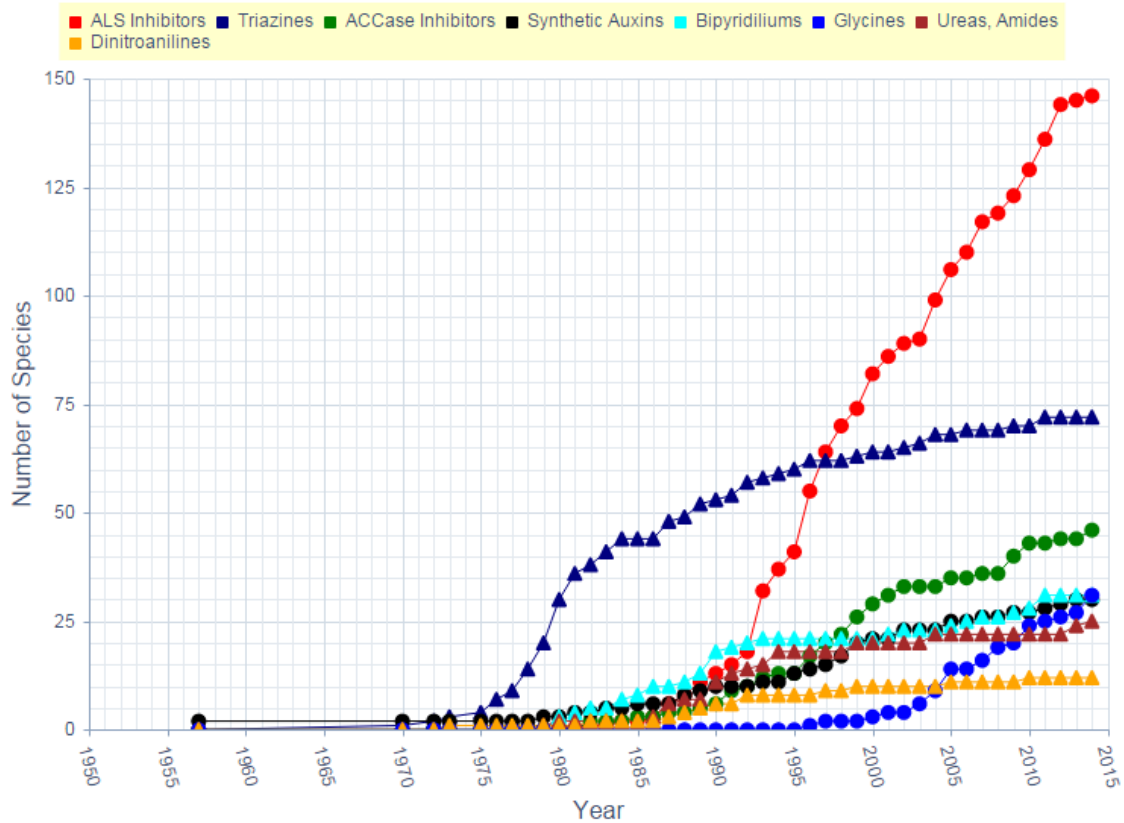


Figura 1.4. Número de biotipos resistentes encontrados a los diferentes grupos de herbicidas a lo largo de los años (Heap, 2015).

1.3.2 Herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados (IBAR)

Los herbicidas que han tenido mayor importancia son aquellos cuyo mecanismo de acción conlleva procesos únicos en planta (como fotosíntesis, biosíntesis de aminoácidos que no se dan en animales, etc.). Como estos herbicidas no atacan procesos presentes en mamíferos, presentan baja toxicidad hacia ellos. Uno de estos procesos es la biosíntesis de aminoácidos ramificados, que como se ha mencionado anteriormente, sólo las plantas y algunos microorganismos son capaces de sintetizar; mientras que los mamíferos deben ingerirlos en la dieta ya que forman parte de los aminoácidos esenciales.

1.3.2.1 Generalidades

El enzima inhibido por este grupo de herbicidas es el enzima acetolactato sintasa (ALS), que como ya se ha mencionado en el apartado anterior es el primer enzima común de la ruta de los aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina) (Wittenbach and Abell,

Introducción y objetivos

1999). La manera en que se da la inactivación del enzima es por unión de la materia activa del herbicida a la ALS dando lugar a un cambio conformacional. De este modo, se impide la unión del sustrato, el piruvato, a la ALS y, por tanto, ésta no puede ejercer su acción. Esta inhibición es una inhibición no competitiva ya que el herbicida y el sustrato se unen a un lugar diferente del enzima. Asimismo, las distintas familias de herbicidas se unen a diferente lugar.

Hay 5 familias químicas que inhiben la biosíntesis de aminoácidos ramificados: sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidinil tiobenzatos y sulfonilaminocarboxamidas

(<http://www.hracglobal.com/Education/ClassificationofHerbicideSiteofAction.aspx>) .

De las 60 materias activas que existen (www.weedscience.org), hay autorizadas en la unión Europea 15 sulfonilureas, 2 imidazolinonas, 4 triazolopirimidina y 1 sulfonilaminocarboxamidas (EU Pesticide Database, 2015).

Estos herbicidas se comercializaron por primera vez en los años 80 y tienen la ventaja de controlar una gran variedad de malas hierbas (monocotiledóneas y dicotiledóneas) y pueden ser utilizados en muy diversos cultivos. Otra de las ventajas es que se emplean a dosis bajas y por ello, presentan baja toxicidad ambiental. Asimismo, muchos de ellos son herbicidas selectivos para su uso en diversos cultivos como herbicidas en pre o post-emergencia. La base de esta selectividad natural se debe principalmente a que los cultivos tolerantes presentan diferencias en el metabolismo del herbicida (Wittenbach and Abell, 1999). Se han realizado estudios en los que se han descrito nueve reacciones metabólicas diferentes en varios puntos de la molécula de sulfonilurea, que han llevado a su inactivación. La detoxificación metabólica también es el mecanismo principal de selectividad de las imidazolinonas.

El mayor inconveniente de estos herbicidas es la rápida aparición de malas hierbas resistentes debido a la simplicidad de su mecanismo de acción. De hecho, las primeras resistencias de *Lolium rigidum* aparecieron sólo 2 años más tarde de la comercialización de la sulfonilurea clorsulfurón y en la actualidad es al grupo de herbicidas frente al cual se han caracterizado el mayor número de especies resistentes (590 biotipos de un total de 147 especies) (Heap, 2015).

Se han producido plantas no transgénicas resistentes a herbicidas de la familia de las imidazolinonas mediante la técnica Clearfield. Ésta consiste en inducir mutaciones en las plantas tratándolas con algún compuesto químico o someténdolas a radiación, de manera que al no introducirse DNA ajeno, no se pueden considerar plantas transgénicas. Posteriormente, se seleccionan aquellas plantas mutadas que son resistentes a los herbicidas pertenecientes a la familia de las imidazolinonas. En la tabla 1.2 podemos ver los principales cultivos Clearfield comercializados y el herbicida al que son resistentes, así como la región donde están comercializados (Tan et al., 2005).

CULTIVO	NORTEAMÉRICA	SUDAMÉRICA	EUROPA Y TURQUÍA	AUSTRALIA
Maíz	Imazapyr Imazetapyr	Imazapyr Imazetapyr Imazazapic	Imazamox	
Colza	Imazamox Imazetapyr			Imazapyr Imazapic
Arroz	Imazetapyr	Imazetapyr Imazapic		
Trigo	Imazamox			Imazapyr Imazapic
Girasol	Imazamox		Imazamox Imazapyr	

Tabla 1.2. Cultivos resistentes a herbicidas de la familia de las imidazolinonas producidos mediante la técnica Clearfield, representados por los países en los que están comercializados (Tan *et al.*, 2005).

1.3.2.2 Efectos fisiológicos

A pesar de que se conozca el mecanismo o el sitio de acción de estos herbicidas, que es la inhibición de la actividad enzimática ALS, se sigue discutiendo e investigando sobre el conjunto de procesos que ocurren desde que el herbicida actúa sobre su diana hasta que la planta muere, lo que se ha conocido como modo de acción. Se han descrito varios procesos fisiológicos que ocurren como consecuencia de la aplicación de herbicidas IBAR, pero no se sabe la importancia de cada uno, ni la razón exacta por la que muere la planta.

1.3.2.3 Efectos en el crecimiento

Uno de los efectos fisiológicos derivados de la inactivación de la ALS, es la disminución o cese del crecimiento de la planta. Diferentes estudios han demostrado que puede ser consecuencia de una inhibición de la división celular y/o a una inhibición de síntesis del DNA (Shaner and Reider, 1986; Rost et al., 1990).

1.3.2.4 Efectos en el metabolismo del nitrógeno

Al inhibirse la síntesis de los aminoácidos ramificados podríamos pensar que tras la aplicación de este tipo de herbicidas el contenido de estos aminoácidos disminuye, sin embargo, diversos estudios han demostrado que esto no es así. De hecho se ha observado que junto con el cese del crecimiento de las plantas, hay una acumulación del contenido de aminoácidos libres en las plantas tratadas con herbicidas IBAR (Anderson and Hibberd, 1985; Shaner and Reider, 1986; Zabalza et al., 2006). Asimismo, los niveles de los aminoácidos ramificados no llegan a ser limitantes para la biosíntesis de proteínas, por lo que no puede atribuirse a la falta de estos aminoácidos el cese de crecimiento y la muerte de la planta (Rhodes et al., 1987; Royuela et al., 1991; Orcaray et al., 2010). Se ha propuesto que los niveles de valina, leucina e isoleucina se renuevan debido a un aumento en la tasa de recambio (turnover) de las proteínas existentes. Es decir, la

degradación de las proteínas a sus correspondientes aminoácidos aumenta los niveles de aminoácidos libres y disminuye la cantidad de proteína soluble; lo que permite mantener niveles de aminoácidos ramificados normales (Royuela et al., 1991b; Wittenbach and Abell, 1999). De hecho, se ha demostrado que los niveles inhibidores de ALS prácticamente anulan la síntesis *de novo* de proteínas (Zabalza et al., 2006), por lo que la síntesis proteica en las plantas tratadas con herbicidas IBAR podría ser realizada mediante la utilización de aminoácidos provenientes de la degradación de proteínas ya existentes.

1.3.2.5 Efectos en el metabolismo del carbono

Contenido en carbohidratos

Asimismo, se ha comprobado que la aplicación de los herbicidas IBAR provoca una inhibición en el transporte de fotoasimilados. Algunos autores propusieron que la falta de esqueletos carbonados en los sumideros podría ser la causa de la muerte de las plantas tratadas con herbicidas IBAR (Shaner and Singh, 1991); sin embargo, estudios posteriores han demostrado que hay una acumulación de carbohidratos en los sumideros de las plantas tratadas con estos herbicidas, lo que provoca la inhibición de su transporte. La acumulación de carbohidratos en los sumideros y la consecuente inhibición de su transporte provoca una posterior acumulación de los mismos en las hojas de las plantas tratadas con herbicidas inhibidores de la ALS (Zabalza et al., 2004)

Metabolismo fermentativo

Otro de los efectos fisiológicos observados tras la aplicación de este tipo de herbicidas es la activación de los enzimas fermentativos (ADH, PDC Y LDH) (Gaston et al., 2002; Zabalza et al., 2005). Estos enzimas tienen como sustrato el piruvato, y se ha propuesto que su activación podría deberse a un aumento en la disponibilidad de piruvato provocada por la inactivación de la ALS.

Se desconoce el papel de la fermentación como consecuencia de la aplicación de los herbicidas inhibidores del enzima ALS. Por un lado podría ayudar a la supervivencia de las plantas durante un tiempo, pero por otro lado, el lactato y el etanol (ambos productos de la fermentación) podrían resultar tóxicos para las plantas (Perata and Alpi, 1993).

1.4 LA FERMENTACIÓN EN PLANTAS Y SU RELACIÓN CON ESTRESSES ABIÓTICOS

A pesar de que la fermentación se relaciona fundamentalmente con la respuesta ante la falta de O₂ se ha descrito también una activación de la fermentación etanólica ante diversos estreses ambientales y como respuesta al ataque de patógenos. La exposición de diversas especies a déficit hídrico, SO₂, ozono o bajas temperaturas provocó la producción de acetaldehído y etanol a concentraciones no limitantes de oxígeno (Kimmerer and Kozlowski, 1982). Por otro lado, la actividad ADH incrementó en plántulas de maíz bajo estrés osmótico (Kato-Noguchi, 2000) y también aumentó la actividad y expresión de este enzima en plántulas de maíz y arroz expuestas a bajas temperaturas (Christie et al., 1991). Además, la expresión de la *ADH* y de la *PDC1* se incrementó en plántulas de *Arabidopsis* expuestas a salinidad, paraquat, bajas temperaturas, estrés osmótico y ácido abscísico (Kursteiner et al., 2003).

Esto demuestra que la fermentación etanólica es una respuesta general frente a diversos estreses en condiciones aerobias. Parece que bajo condiciones adversas en las que se daña la maquinaria de la fosforilación oxidativa y por tanto, se impide la producción de ATP, se activa la fermentación para mantener el estado energético de las plantas (Tadege et al., 1999). Se ha demostrado una posible conexión entre la fermentación etanólica y la respuesta frente a patógenos y se ha propuesto que la fermentación regule el metabolismo de los carbohidratos bajo condiciones de estrés incluso ante suficiente disponibilidad de oxígeno (Tadege et al., 1999).

1.5 JUSTIFICACIÓN

Para cubrir la gran demanda de productos provenientes de la agricultura, es necesario producir grandes cantidades de los mismos y para poder lograrlo es imprescindible el uso de fitosanitarios en general y de herbicidas en particular. Existen grandes limitaciones en el uso de estos productos como los problemas de persistencia en el ambiente, la aparición de resistencias en hierbas adventicias y las restricciones en el uso de materias activas.

Teniendo en cuenta estas limitaciones, sería de gran interés conocer con más exactitud la respuesta fisiológica que los herbicidas producen en las plantas ya que en muchos casos, como en el caso de los herbicidas IBAR, no se conoce exactamente la fisiología de la letalidad que provocan en las plantas tratadas y se sigue investigando sobre ello. El conocimiento de la respuesta fisiológica de las plantas a los herbicidas permitiría un uso más sostenible de los mismos. Se podrán desarrollar nuevos herbicidas con mecanismos de acción alternativos que disminuyan la presión de selección y evitar así la aparición de malas hierbas resistentes.

En este trabajo se pretende profundizar en uno de los efectos fisiológicos que se han detectado tras la aplicación de los IBAR: la inducción de la fermentación etanólica aeróbica. Es conocido que la fermentación es una respuesta fisiológica presente en las plantas tratadas con dichos herbicidas y se pretende analizar y valorar la función de la fermentación como respuesta fisiológica ya que no está claro si este proceso aumenta la letalidad del herbicida o si, por el contrario, ayuda a la supervivencia de la planta.

1.6 OBJETIVOS

Los herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados han adquirido una gran importancia en la agricultura de hoy en día. La aplicación de este tipo de herbicidas induce las rutas fermentativas en las plantas.

La inducción del metabolismo fermentativo en las plantas puede estar relacionada no únicamente con la falta de oxígeno, sino también con otros estreses. No obstante, no está claro el cometido de dicha ruta metabólica en esas condiciones de estrés. Como consecuencia de la activación del metabolismo fermentativo se puede producir una acumulación de etanol y ácido láctico, compuestos que pueden resultar tóxicos para las plantas. A pesar de ello, se ha probado que la fermentación puede favorecer la supervivencia de las plantas bajo esas condiciones.

El **objetivo general** de este Trabajo de Fin de Grado es profundizar en el conocimiento de la función de la fermentación como respuesta a la aplicación de herbicidas IBAR, y determinar si contribuye a la letalidad del herbicida o, por el contrario, ayuda a la supervivencia de la planta.

Para ello, se utilizó la siguiente aproximación experimental: se aplicó un herbicida inhibidor de la biosíntesis de aminoácidos ramificados (Imazamox) a dos grupos de plantas de guisante que previamente habían sido cultivadas en condiciones de hipoxia durante 24 y 48 horas para que en el momento de aplicación del herbicida tuvieran el metabolismo fermentativo activado. De esta manera, se compararon los efectos fisiológicos más característicos provocados por la aplicación del herbicida en plantas con el metabolismo fermentativo inducido, frente a otras cuyas rutas metabólicas no estaban inducidas.

Los parámetros estudiados que nos servirán de marcadores por ser los efectos característicos de la aplicación de herbicidas son los siguientes:

- Crecimiento de las plantas
- Contenido de proteína soluble
- Concentración de aminoácidos libres
- Concentración de carbohidratos

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

2.1.1 Esterilización y germinación de las semillas

La especie vegetal utilizada en este proyecto fue el guisante (*Pisum sativum* L. cv. snap sugar boys). La superficie de las semillas se esterilizó según el método de Labhilili *et al.* (1995). Primero fueron sumergidas en una mezcla de 1 % de hipoclorito de sodio (p/v) y 0,01 % SDS (p/v) durante 40 min. Tras aclararlas abundantemente con agua se mantuvieron otros 10 min sumergidas en una disolución de 0,01 N HCl, tras lo cual se aclararon.

Una vez esterilizadas se colocaron en bandejas que contenían una mezcla de perlita:vermiculita (2:1) húmeda. Las bandejas se colocaron en una cámara a 27 °C en oscuridad durante 96 horas para la germinación de los guisantes, regando con agua desionizada para que no se seque el sustrato.

2.1.2 Condiciones de crecimiento

Una vez germinadas las plántulas, fueron trasplantadas a contenedores de 2,7 litros, en concreto se colocaron 15 plántulas en cada uno de los contenedores. Éstas crecieron en un cultivo hidropónico puro con aireación forzada, que se aplicó colocando en cada contenedor una bomba de aireación de 3,5 W con un flujo de 750 cc min⁻¹. Los contenedores permanecieron en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas (tabla 2.1) (figura 2.1).

Periodo	Duración	Temperatura	Humedad Relativa
Noche	12 h	16 °C	70%
Amanecer	30 min	18 °C	65%
	30 min	20 °C	60%
Día	10 h	20 °C	60%
Anochecer	30 min	18 °C	65%
	30 min	16 °C	70%

Tabla 2.1. Condiciones de crecimiento de las plantas en la cámara de crecimiento.

La radiación fotosintéticamente activa (PAR) fue de 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la solución nutritiva empleada fue la establecida por Rigaud y Puppo (1975) pero utilizando K_2HPO_4 en lugar de KH_2PO_4 y enriquecida con 10 mM de KNO_3 . La solución nutritiva fue renovada semanalmente.



Figura 2.1 Cultivo hidropónico puro de guisante en contenedores con aireación forzada bajo condiciones controladas en cámara de crecimiento. Estado de las plantas a día 0, antes de la aplicación del tratamiento herbicida.

2.1.3 Diseño experimental y aplicación de los tratamientos

Cuando las plantas contaban con 12 días se dividieron en seis grupos. A cuatro de los grupos se les aplicó un pretratamiento de hipoxia, a dos de ellos se les quitó la aireación forzada de la solución durante 24 horas (Prehipoxia -1) y a las otras dos durante 48 horas (Prehipoxia -2) antes del tratamiento con herbicida. Después de este periodo se les volvió a aplicar la aireación y se les aplicó el herbicida a los grupos correspondientes (día 0). A la mitad de las plantas del grupo Prehipoxia -1 y a la mitad de las de Prehipoxia -2 se les añadió la dosis correspondiente de herbicida a la solución nutritiva y fueron nombrados IMX -1 e IMX -2 respectivamente. El herbicida utilizado fue el Imazamox en una dosis de 5 mg l^{-1} , en concreto se utilizó el producto comercializado con el nombre Pulsar 40 (BASF) el cual contiene una riqueza del 4,0 % (p/v). A las otras mitades de los grupos Prehipoxia-1 y Prehipoxia-2 no se les aplicó ningún tratamiento y se consideró como el grupo control de los anteriores grupos, se les denominó HIP -1 e HIP -2. Por otro lado, a la mitad de las plantas sin pretratar también se le aplicó herbicida en la misma dosis que a los grupos pretratados (IMX). Finalmente, al tercer grupo sin pretratar no se le aplicó ningún tratamiento y se consideró como grupo control (C) (tabla 2.2).

	Abreviatura	Nombre del tratamiento	Descripción del tratamiento
Sin prehipoxia	C	Control	Tratamiento control al que no se le aplicó ningún tratamiento
	IMX	Imazamox	Aplicación de 5 mg l ⁻¹ de Imazamox a la solución nutritiva el día 0
Prehipoxia -1	HIP -1	Hipoxia -1	El día anterior al día 0 se quitó la aireación forzada durante 24 horas, tras lo cual, el día 0, se volvió a aplicar.
	IMX -1	Imazamox -1	El día anterior al día 0 se eliminó la aireación forzada durante 24 horas, tras lo cual, el día 0, se volvió a aplicar y además se añadió una dosis de 5 mg l ⁻¹ de Imazamox a la solución nutritiva
Prehipoxia -2	HIP -2	Hipoxia -2	Los dos días previos al día 0 se quitó la aireación forzada durante 48 horas, tras lo cual, el día 0, se volvió a aplicar.
	IMX -2	Imazamox -2	Los dos días previos al día 0 se quitó la aireación forzada durante 48 horas, tras lo cual, el día 0, se volvió a aplicar y además se añadió una dosis de 5 mg l ⁻¹ de Imazamox a la solución nutritiva

Tabla 2.2. Resumen de los tratamientos aplicados.

Con la aplicación de la hipoxia se quiso activar las rutas fermentativas antes del tratamiento con herbicida.

De este modo se pudieron comparar los efectos fisiológicos más característicos a nivel de raíz provocados por la aplicación del herbicida en plantas con el metabolismo fermentativo activado frente a otras cuyas rutas fermentativas no estaban activas.

2.2 MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO EN LA SOLUCIÓN NUTRITIVA

Se realizaron medidas de la concentración de oxígeno en la solución a lo largo del experimento para controlar que se consiguió un ambiente hipóxico en la solución cuando era deseado. Esto se hizo mediante un oxímetro CRISON oxi 45 (CRISON INSTRUMENTS, S.A., Barcelona, Spain) (figura 2.2). En concreto la concentración de oxígeno en las plantas pretratadas con hipoxia disminuyó casi un 70 % 12 horas después de quitar la aireación forzada; mientras que 24 horas después de aplicar la hipoxia el contenido de oxígeno disminuyó casi un 80 %, momento que se considera día 0 del experimento.

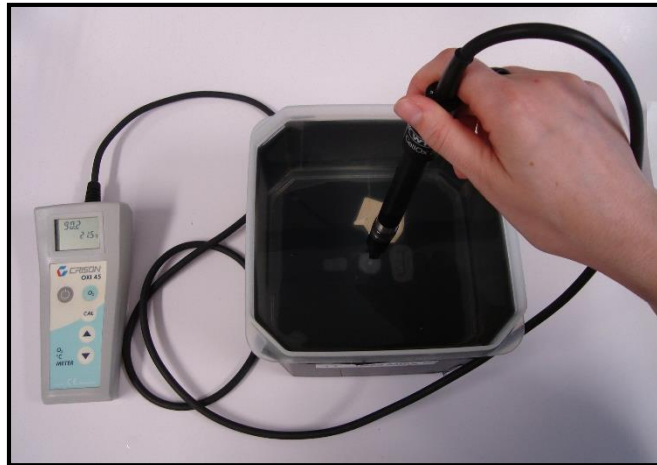


Figura 2.2 Medida de la concentración de oxígeno mediante un oxímetro OXI 45.

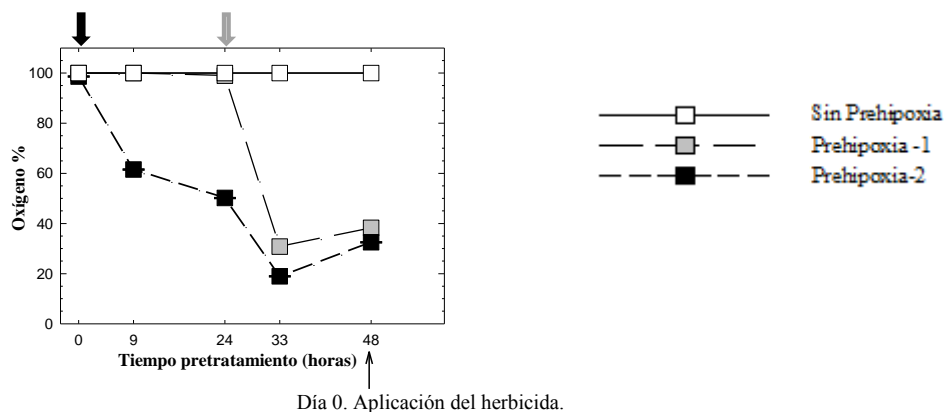


Figura 2.3. Contenido de oxígeno a lo largo de los tratamientos prehipóxicos. La flecha gris indica la eliminación de la aireación del tratamiento Prehipoxia -1. La flecha negra indica la eliminación de la aireación del tratamiento Prehipoxia -2.

Por otro lado, en la Figura 2.3 podemos ver la cantidad de oxígeno presente en la solución nutritiva de cada tratamiento desde el día -2 hasta el día 0 (48h en la figura 2.3), momento en el que se restableció la aireación y se aplicó el tratamiento herbicida. Como se puede observar, la concentración de oxígeno descendió desde el inicio en ambos grupos de prehipoxia, si bien las plantas del grupo prehipoxia-1 presentaron una caída más acusada. A pesar de que ambos grupos presentaron cierta recuperación en la concentración de oxígeno entre las 33 y las 48h, la concentración fue en todo caso de niveles hipóxicos.

2.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las plantas fueron muestreadas en el momento anterior de ser tratadas con el herbicida, considerando éste como día 0; y posteriormente los días 1, 3 y 7 tras la aplicación del herbicida.

Después de medir los parámetros de crecimiento (número de pisos, longitud de la parte aérea y de la raíz principal) se cosecharon las raíces de las plantas y se congelaron a -80 °C para posteriores análisis, anotando su peso fresco. Asimismo, parte de las muestras se secaron en una estufa de aire recirculado a 75-80 °C durante 48 horas para obtener el peso seco, con objeto de calcular la relación peso fresco/peso seco, que luego se utilizaría en los cálculos de las determinaciones analíticas. Por otro lado, parte de las raíces fueron reducidas a polvo utilizando un microdesmembrador MM200 Retsch® (Retsch®, Haan, Germany), y manteniendo en todo momento una baja temperatura que impidiese su descongelación, utilizando para ello nitrógeno líquido. Una vez trituradas se realizaron alícuotas de aproximadamente 0,1 g para su posterior utilización en las determinaciones analíticas.

2.4 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

Se midió la longitud de la parte aérea, definida como la distancia entre el punto de inserción de los cotiledones al tallo y el inicio del brote apical. Asimismo, se midió la longitud de la raíz, definida como la distancia entre el punto de inserción de los cotiledones al tallo y la punta de la raíz principal. Asimismo, se contó el número de pisos definido como la cantidad de hojas con los folíolos totalmente expandidos.

2.5 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS

2.5.1 Extractos para la determinación del contenido en azúcares solubles

A muestras de material vegetal de 0,1 g se les añadió 3 ml de etanol 80 % y se dejó hervir 3 veces en una placa calefactora durante 30 s. Tras esto se realizó un cuarto lavado en frío. El sobrenadante de cada lavado fue llevado a un tubo TurboVap. El sobrenadante total recogido fue llevado al evaporador TurboVap® LV Evaporator (Zymark, Hopkinton, MA, USA) a 40 °C con aire comprimido a una presión de 1,2 bar, para eliminar completamente el etanol. La muestra seca obtenida desde el evaporador se resuspendió en 4 ml de agua desionizada y tras sonicar durante 10 min se centrifugó a 2300 g durante 10 min. El sobrenadante obtenido se congeló a -20 °C, para luego determinar el contenido de azúcares solubles mediante electroforesis capilar.

2.5.2 Extractos para la determinación del contenido en almidón

Para la determinación de almidón se utilizó el material vegetal insoluble en etanol, obtenido tras los lavados en etanol 80 %, una vez secado en estufa a 70 °C durante 24

horas, según el procedimiento descrito por McRae (1971). El tejido seco obtenido fue pesado y luego homogenizado en mortero con 4 ml de agua desionizada. El volumen total fue hervido durante 1 h, y después de enfriarse se le añadió 1 ml de solución de amiloglucosidasa (41 mg de enzima amiloglucosidasa en 50 ml de tampón acetato 8,55 mM, pH 4,5). Dicho enzima cataliza la hidrólisis de almidón a glucosa.

Para asegurar la completa hidrólisis del almidón presente en la muestra a glucosa, la mezcla se agitó e incubó durante toda la noche en un baño a 50 °C. Una vez terminada la incubación, las muestras fueron agitadas y posteriormente centrifugadas durante 15 min a 2300 g. El sobrenadante se conservó a -20 °C para la determinación de la concentración de glucosa en el mismo. Así, el contenido de almidón fue expresado como mg glucosa g⁻¹ PS.

2.5.3 Determinación del contenido en carbohidratos solubles

La concentración de fructosa, sacarosa y glucosa de los extractos solubles en etanol y de glucosa proveniente de la hidrólisis del almidón fueron determinadas mediante electroforesis capilar en un equipo P/ACE™ MDQ (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) según el método descrito por Warren and Adams (2000). Se utilizó un capilar de sílice fundida de 50 µm de diámetro interno y 31,4/38,4 cm de longitud. El tampón utilizado fue 10 mM benzoato, 0,5 mM MTAB (pH 12, ajustado con NaOH). La detección fue indirecta a una longitud de onda de 225 nm y se trabajó con un voltaje de -15 kV. Los resultados se expresaron como mmoles del azúcar correspondiente g⁻¹ PS. Adams (2000). Se utilizó un capilar de sílice fundida de 50 µm de diámetro interno y 31,4/38,4 cm de longitud. El tampón utilizado fue 10 mM benzoato, 0,5 mM MTAB (pH 12, ajustado con NaOH). La detección fue indirecta a una longitud de onda de 225 nm y se trabajó a un voltaje de -15 kV.

2.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN AMINOÁCIDOS

Para la determinación de aminoácidos libres se empleó el método propuesto por Yemm y Cocking (1955). Se utilizaron los mismos extractos que para la determinación de carbohidratos solubles en etanol.

Se tomaron 20 µL de muestra a los que se les añadieron 500 µL de tampón citrato (126g de ácido cítrico anhidro y 48 g de hidróxido sódico en 750 mL de agua milliQ; pH 5,5) y 430 µL de reactivo ninhidrina (50 mg de ácido ascórbico en 5 mL de agua milliQ y 1,25 g de ninhidrina en 125 mL de 2-metoxi-etanol). La mezcla se incubó a 100°C durante 20 min y se dejó enfriar en hielo. Se añadió 1 mL de etanol al 60% y, previa agitación se cargó la microplaca con 200 µL en cada pocillo. Se leyó la absorbancia a 570 nm. Se utilizó L-glicina como patrón en un rango de calibrado de 0 a 12,5 nmol µl⁻¹. Los resultados se expresaron como µmoles de glicina g⁻¹ PS.

2.7 DETERMINACIÓN DE LOS ENZIMAS FERMENTATIVOS

2.7.1 Determinación del contenido de proteína soluble y la actividad enzimática de los enzimas PDC y ADH *in vitro*

a) Extracción

Las muestras de tejido radical ya pulverizadas se homogeneizaron añadiendo un volumen de tampón (50 mM MOPS, pH 7; 5 mM MgCl₂; 20 mM KCl; 1 mM EDTA; 10 mM DTT y β-mercaptoetanol 0,08 % (p/v)) según la relación 1:4 (g PF:ml). Se centrifugó a 20 000 g durante 30 min, la pastilla fue descartada y el sobrenadante se utilizó para la determinación de las actividades enzimáticas y de la proteína soluble. Todas las operaciones se realizaron a 4 °C.

b) Determinación de la concentración de proteína soluble

La proteína soluble se determinó según el método de Bradford (1976). Se tomaron 60 µl de muestra diluida 30 veces y se mezclaron por agitación con 200 µl del reactivo Bradford (Bio-Rad 500-0006, Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA) previamente diluido (1:5) y filtrado. Se determinó la absorbancia en un lector de microplacas modelo SinergyTM HT (BioTek® Instruments Inc., Winooski, VT, USA) a 595 nm frente a una recta patrón de 0 a 6 µg de BSA.

c) Piruvato Descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa

El proceso de desalado del sobrenadante se llevó a cabo en placas de 96 pocillos UNIFILTERTM (800 µl) de Whatman Polyfiltronics® (Whatman Inc., Clifton, NJ, USA) que contenían Sephadex® G-50. Dichas columnas fueron equilibradas previamente con 50 mM MOPS (pH 7); 5 mM MgCl₂ y 20 mM KCl.

Las actividades enzimáticas se determinaron en lector de microplacas utilizando 20 µl de ese sobrenadante desalado en un volumen de reacción final de 170 µl. Todas las actividades enzimáticas se determinaron a 30 °C, 340 nm y durante un tiempo de ensayo de 10 minutos. El coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm es 6,22.

La PDC se determinó en la dirección piruvato a acetaldehído y acoplándola a la ADH monitorizándose la desaparición de NADH a 340 nm (Bouny and Saglio, 1996) con modificaciones. La mezcla de reacción contenía 100 mM Tricina (pH 6,5); 2 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 0,2 mM NADH; 3 unidades ml⁻¹ ADH; 10 mM piruvato sódico; 25mM oxamato (para inhibir el enzima LDH) y 1 mM TPP. La reacción se inició con la adición del piruvato y para todos los extractos se realizó un blanco sin él.

La ADH Se determinó en la dirección etanol a acetaldehído y según el método descrito por John and Greenway (1976). El medio de reacción estaba compuesto por 50 mM Bicina (pH 8,8); 5 mM MgCl₂; 49 µM etanol absoluto y 1 mM NAD. Se determinó la formación de NADH midiendo el incremento de absorbancia a 340 nm. Para cada muestra se realizó un blanco sin etanol.

2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un doble análisis estadístico para cada parámetro cuantificado utilizándose el programa SPSS 20.0 para Windows. Por un lado se analizaron los datos en tres grupos: plantas Sin prehipoxia, plantas con 1 día de prehipoxia y plantas con dos días de prehipoxia. Dentro de cada grupo, los resultados se evaluaron aplicando una comparación de medias para variables independientes según la t de student. No se realizó un estudio estadístico a lo largo del tiempo sino que se compararon para cada día del muestreo los datos de las plantas control y las tratadas con herbicida. Los resultados significativamente diferentes para una $P \leq 0,05$ se indican en las gráficas mediante el símbolo “*”.

Asimismo se realizó una ANOVA de doble vía de factores fijos donde se evaluó para cada parámetro y para cada día el efecto del factor herbicida, del factor prehipoxia y la posible interacción entre ambos. Los factores o las interacciones significativamente diferentes para una $P \leq 0,05$ se indican en negrita en las tablas correspondientes.

Las tablas de resultados completas obtenidas en el programa SPSS se muestran en el Anexo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este Trabajo Fin de Grado se pretende estudiar el efecto de la fermentación como respuesta a la aplicación de herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados pues no está claro si este proceso aumenta la letalidad del herbicida o ayuda a la supervivencia de la planta.

El estudio se realizó con tres grupos de plantas; a dos de los grupos se les sometió previamente a condiciones de hipoxia durante un día (Prehipoxia -1) o durante dos días (Prehipoxia -2). En cada uno de los grupos, a la mitad de las plantas se les aplicó Imazamox y la otra mitad se dejó como control. Con ello se pretendía valorar si un metabolismo fermentativo activado en el momento de aplicación del herbicida provocaba diferencias en la respuesta fisiológica de la planta al herbicida. La respuesta fisiológica se valoró mediante crecimiento, contenido de aminoácidos libres totales y proteína soluble, enzimas fermentativas y contenido en carbohidratos en raíz.

Los efectos sobre cada parámetro evaluado se muestran en figuras independientes. En ellas, se pueden distinguir tres partes: una superior donde se recogen las gráficas de los tres grupos de plantas: Sin prehipoxia, con prehipoxia de 1 día y con prehipoxia de dos días. En la parte inferior se muestra la tabla resumen del análisis estadístico ANOVA de doble vía con los factores fijos herbicida y prehipoxia. En el cuadrante inferior derecho se muestra una gráfica para comparar el efecto del herbicida en cada uno de los grupos como porcentaje de su respectivo control.

3.1 EFECTOS EN EL CRECIMIENTO

Las siguientes imágenes muestran el aspecto de las plantas una vez transcurridos 7 días desde la aplicación del herbicida. La figura 3.1 muestra el aspecto de la parte aérea de las plantas de guisante. El número de entrenudos de las plantas tratadas con herbicida y expuestas a un pretratamiento hipóxico era menor, al igual que la longitud de los entrenudos (figura 3.1). En todos los grupos estudiados, el crecimiento de las plantas tratadas con herbicida fue menor en comparación con sus controles.

Con el fin de evaluar los efectos de los tratamientos en el crecimiento de la planta, se midió la longitud de la parte aérea y la raíz, obteniéndose los siguientes resultados (figuras 3.2 y 3.3).

La longitud de la parte aérea fue similar en los grupos objeto de estudio. El grupo Sin prehipoxia, a pesar de que no hubiese diferencias significativas, el ritmo de crecimiento de las plantas controles fue ligeramente superior a las de Imazamox, evidenciándose sobre todo al final del tiempo de estudio (figura 3.1A).

Resultados y discusión

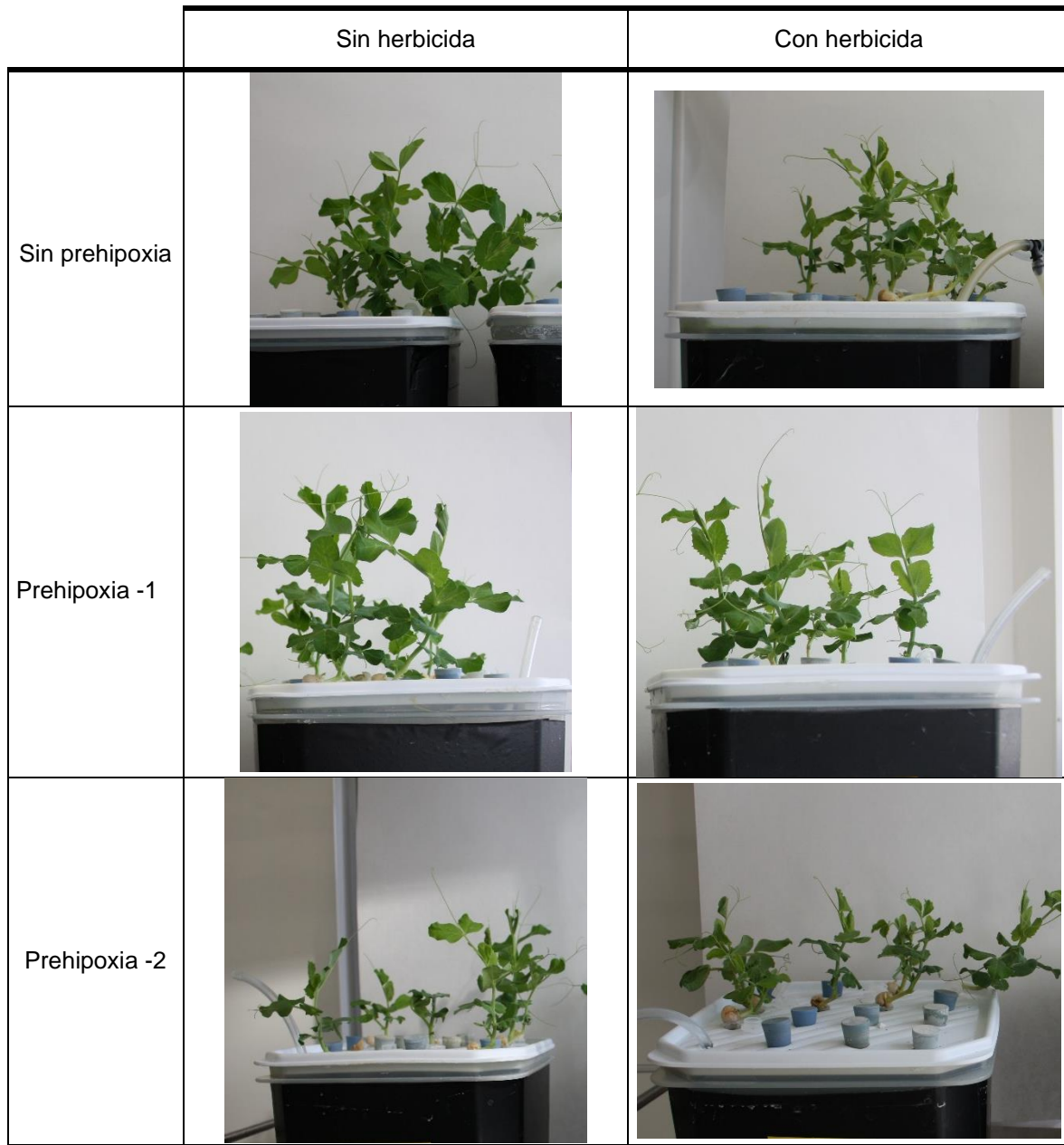
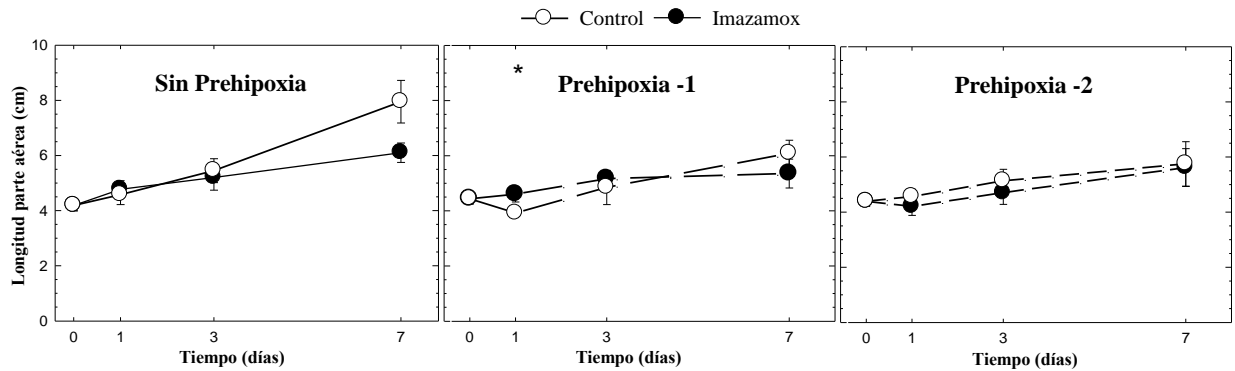


Figura 3.1 Estado de las plantas de guisante el día 7 de tratamiento.

El análisis de doble vía mostró que ninguno de los factores fijos ni su interacción resultaron significativos. La gráfica comparativa mostró que en ninguno de los grupos el herbicida afectó de manera significativa la longitud de la parte aérea.

A)



B)

	Día 1	Día 3	Día 7
Herbicida	0,515	0,738	0,087
Prehipoxia	0,082	0,631	0,066
Interacción	0,144	0,681	0,392

C)

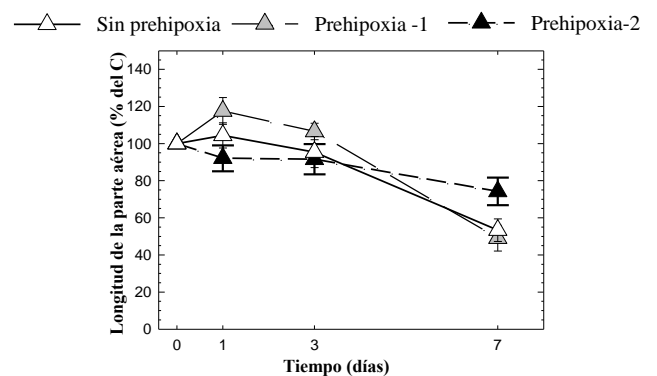
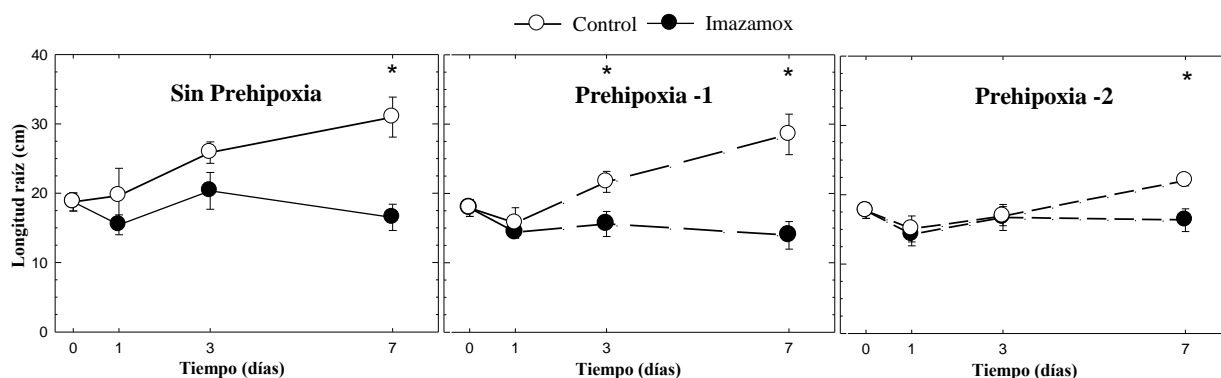


Figura 3.2 A) Longitud de la parte aérea de plantas de guisante no tratadas (control) o tratadas con el herbicida Imazamox tras no haber o haber sido sometidas a una prehipoxia de 1 o 2 días B) Significancias de los factores fijos herbicida y prehipoxia y su interacción tras la realización de análisis ANOVA de doble vía para cada uno de los días de estudio. C) Efecto del herbicida como porcentaje del control. Los cálculos son de cada día de estudio y grupo de prehipoxia. (los valores originales se muestran en el apartado A).

La longitud de la raíz en los tres grupos de plantas según prehipoxia mostró un comportamiento similar tras la adición del herbicida (figura 3.3.A). El crecimiento de la raíz principal se detuvo en el día 3 en las plantas tratadas con herbicida, momento a partir del cual el efecto del factor herbicida fue significativo en la ANOVA de dos vías. La diferencia de longitud de la raíz principal en los tratamientos C e IMX y HIP-2 e IMX -2 fue significativa en día 7, mientras que dicha diferencia entre en tratamiento HIP-1 e IMX-1 fue significativa desde el día 3. La falta de efecto del herbicida en la longitud a día 3 en las plantas de prehipoxia-2 podría relacionarse con que las plantas control presentaron menores tasas de elongación que los controles de los grupos Sin prehipoxia y Prehipoxia -1.

Resultados y discusión

A)



B)

	Día 1	Día 3	Día 7
Herbicida	0,531	0,014	0,000
Prehipoxia	0,012	0,006	0,064
Interacción	0,963	0,229	0,219

C)

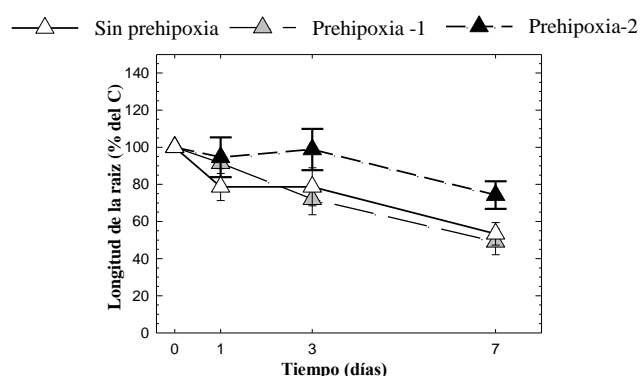


Figura 3.3. A) Longitud de la raíz de plantas de guisante no tratadas (control) o tratadas con el herbicida Imazamox a tiempo 0 tras no haber (Sin prehipoxia) o haber sido sometidas a una prehipoxia de 1 (Prehipoxia-1) o 2 (Prehipoxia-2) días. Media \pm ES (n=4). “*” indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los valores control y el tratamiento Imazamox para cada día de tratamiento. B) Significancias de los factores fijos herbicida y prehipoxia y su interacción tras la realización de análisis ANOVA de doble vía para cada uno de los días de estudio. Los valores significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) se muestran en negrita. C) Efecto del herbicida como porcentaje del control. Los cálculos son de cada día de estudio y grupo de prehipoxia. (los valores originales se muestran en el apartado A).

Ambos factores evaluados de manera independiente afectaron a la longitud de la raíz, pero no se detectó interacción entre ambos (figura 3.3.B). Sin embargo, a pesar de no existir una interacción significativa, la grafica comparativa de porcentajes mostró que la inhibición del crecimiento de la raíz que mostraron las plantas IMX-2 respecto a su control fue mucho menos acusada que la que mostraron IMX e IMX-1. Esta comparación sugiere que las plantas con una prehipoxia de 48 h mostraron un menor efecto del herbicida.

En las plantas en las que se aplicó herbicida se inhibió el crecimiento de las raíces secundarias, además, las raíces adoptaron un color marronáceo, tono muy diferente al de las raíces no tratadas que eran blanquecinas, tal y como se observa en la figura 3.4.

Los herbicidas IBAR inhiben la división celular (Rost et al., 1990) mostrando los primeros síntomas en las regiones meristemáticas, pudiendo ser esta la causa de la inhibición de la formación de raíces secundarias.

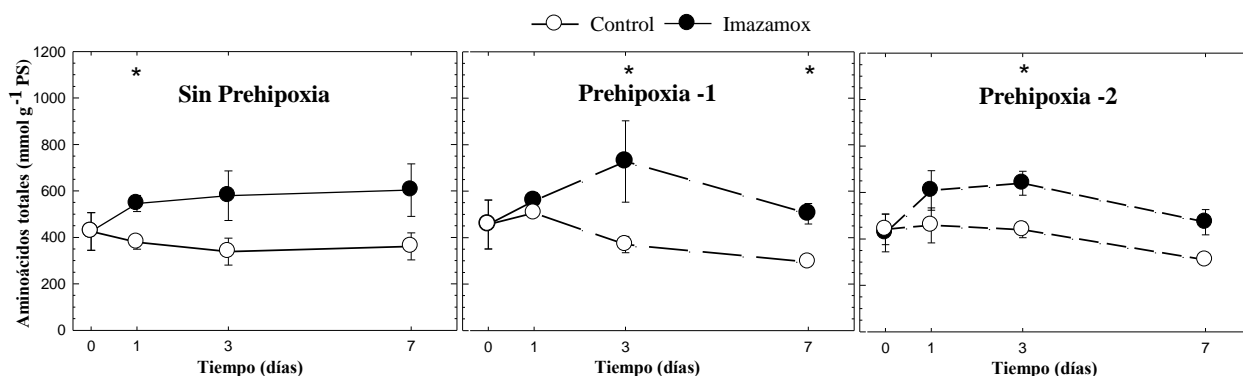


Figura 3.4 De izquierda a derecha, C, IMX, IMX-1 e IMX-2 el día 7.

3.2 EFECTOS EN EL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS

Se midió el contenido de aminoácidos libres totales en las plantas de los diferentes tratamientos: C, IMX, HIP-1, IMX-1, HIP-2 e IMX-2 (figura 3.5).

A)



B)

	Día 1	Día 3	Día 7
Herbicida	0,640	0,001	0,001
Prehipoxia	0,522	0,457	0,273
Interacción	0,746	0,607	0,823

C)

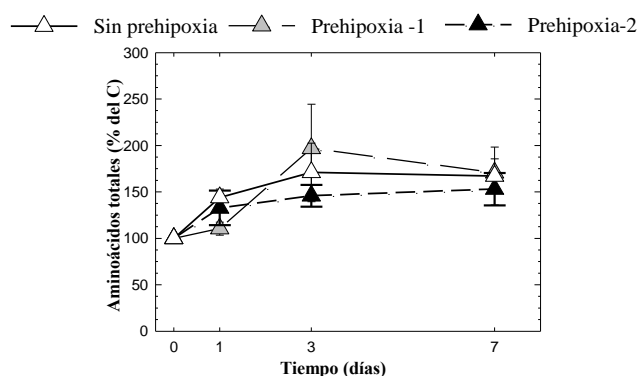


Figura 3.5 A) Efecto de los tratamientos (control, Imazamox, prehipoxia -1, prehipoxia-1 con Imazamox, prehipoxia -2 y prehipoxia -2 con Imazamox) en el contenido de los aminoácidos libres totales ($\mu\text{mol g}^{-1}$ PS) en raíces de guisante. Media \pm ES (n=4). “**” indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los valores control y el tratamiento Imazamox para cada día de tratamiento. **B)** Significancias de los factores fijos herbicida y prehipoxia y su interacción tras la realización de análisis ANOVA de doble vía para cada uno de los días de estudio. Los valores significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) se muestran en negrita. **C)** Efecto del herbicida como porcentaje del control. Los cálculos son de cada día de estudio y grupo de prehipoxia. (los valores originales se muestran en el apartado A).

El factor prehipoxia no resultó significativo en ninguno de los tres días de muestreo, sugiriendo que el nivel de falta de oxígeno al que se sometieron las muestras no fue lo suficientemente agresivo para provocar acumulación de aminoácidos, como se ha descrito en tratamientos anóxicos (Rocha et al., 2010; Narsai et al., 2011) (figura 3.5.B).

Los tres grupos tratados con Imazamox, IMX, IMX-1 e IMX-2 mostraron una mayor cantidad de aminoácidos libres totales respecto a sus respectivos controles, y el factor fijo evaluado en la ANOVA mostró diferencias significativas desde el día 3 de tratamiento.

Los resultados obtenidos reflejaron un aumento en el contenido de aminoácidos libres totales en las plantas tratadas con Imazamox hasta el día 3. Como consecuencia de la aplicación de herbicidas IBAR ocurre una acumulación de aminoácidos libres totales

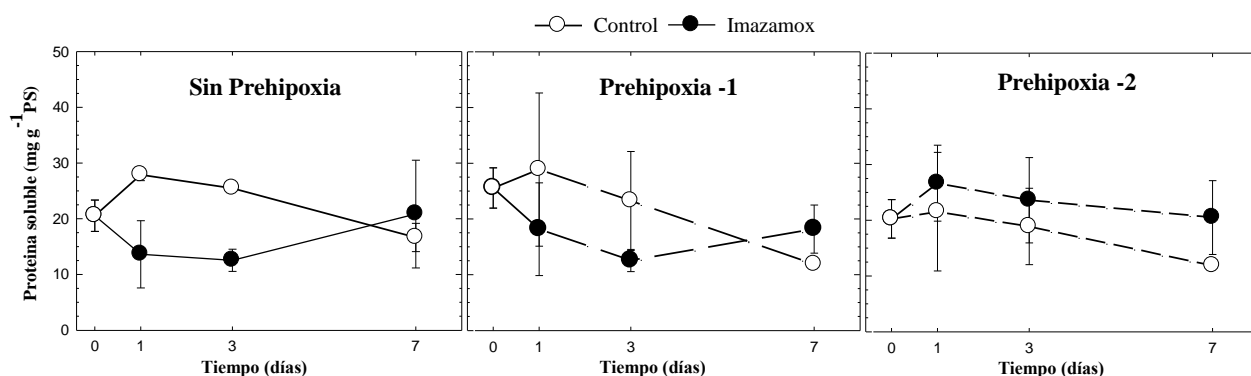
(Anderson and Hibberd, 1985; Shaner and Reider, 1986; Zabalza et al., 2006; Orcaray et al., 2010; Zulet et al., 2013). Se ha propuesto que dicha acumulación se deba a un incremento en la tasa de recambio de las proteínas provocado por un aumento en la actividad de su degradación y una disminución en la síntesis de *novο* de las proteínas (Rhodes et al., 1987; Zabalza et al., 2006; Orcaray et al., 2010). Por tanto, aunque siga habiendo síntesis de proteínas tras la aplicación de herbicidas inhibidores de la ALS, los aminoácidos que las forman provienen de la degradación de proteínas ya existentes.

No se ha detectado interacción entre los dos factores en ningún momento de estudio (figura 3.5.B), lo cual permite establecer que el pretratamiento no afectó de manera muy evidente a la respuesta fisiológica. A pesar de tratarse de diferencias mínimas, de manera gráfica (figura 3.5.C) se pudo observar que a día 3 y 7 de tratamiento Prehipoxia-2 presentaron unos valores de inducción inferiores a Sin prehipoxia e Prehipoxia-1.

3.3 EFECTOS EN EL CONTENIDO DE PROTEÍNA SOLUBLE

Se midió el contenido de proteínas solubles en las raíces de guisante para los diferentes tratamientos (figura 3.6).

A)



B)

	Día 1	Día 3	Día 7
Herbicida	0,910	0,959	0,797
Prehipoxia	0,238	0,455	0,209
Interacción	0,405	0,505	0,928

C)

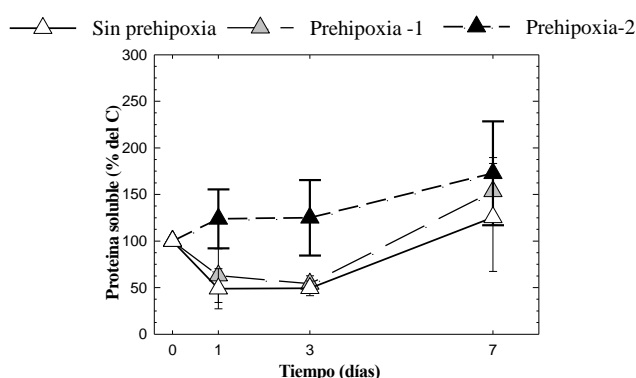


Figura 3.6 A) Concentración de proteína soluble en la raíz de plantas de guisante no tratadas (control) o tratadas con el herbicida Imazamox tras no haber o haber sido sometidas a una prehipoxia de 1 o 2 días. B) Significancias de los factores fijos herbicida y prehipoxia y su interacción tras la realización de análisis ANOVA de doble vía para cada uno de los días de estudio. C) Efecto del herbicida como porcentaje del control. Los cálculos son de cada día de estudio y grupo de prehipoxia. (los valores originales se muestran en el apartado A).

Se ha descrito que los herbicidas inhibidores de la actividad ALS provocan una disminución del contenido de proteína soluble (Wittenbach and Abell, 1999; Gaston *et al.*, 2002) aspecto que también ha sido descrito en el caso de raíces de guisante tratadas con Imazamox (Zulet *et al.*, 2013). Recientemente se ha valorado si dicha disminución se debía a una posible relación inducción de la proteólisis. Se han evaluado los principales sistemas proteolíticos descritos en plantas y, al contrario de lo que se esperaba, no ha sido posible describir un incremento general de las actividades proteolíticas tras la aplicación de Imazamox, ya que algunas actividades aumentaron y otras disminuyeron (Zulet *et al.*, 2013).

No se detectaron diferencias significativas por efecto del herbicida en ninguno de los tres grupos con diferente pretratamiento. Sin embargo, a pesar de mostrar una gran variabilidad, las plantas control de los tratamientos Sin prehipoxia y prehipoxia-1

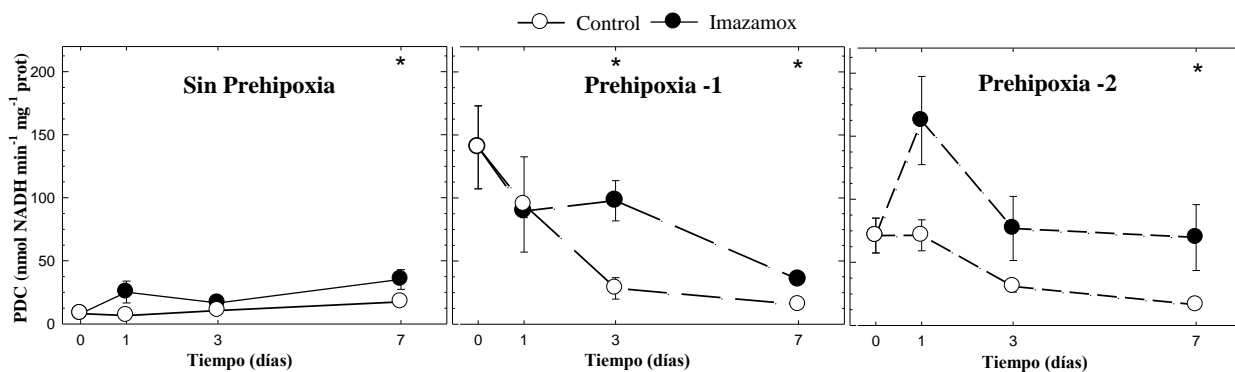
mostraron mayor contenido de proteína soluble respecto las plantas tratadas con herbicida (figura 3.6.A).

3.4 ENZIMAS FERMENTATIVOS

3.4.1 Actividad *in vitro* del enzima fermentativo PDC

Se evaluó la actividad fermentativa de la enzima PDC (figura 3.7) que interviene en la fermentación etanólica convirtiendo el piruvato en acetaldehído.

A)



B)

	Día 1	Día 3	Día 7
Herbicida	0,003	0,988	0,017
Prehipoxia	0,169	0,333	0,450
Interacción	0,161	0,051	0,412

C)

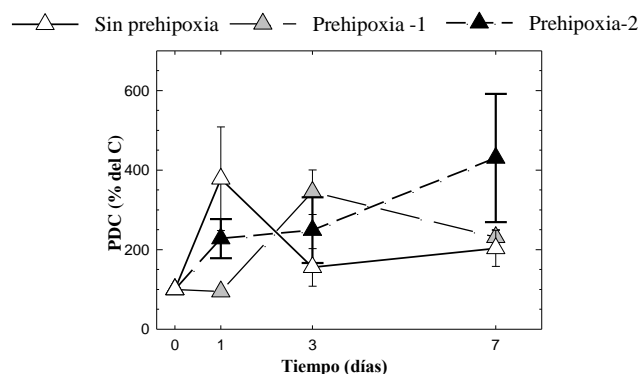


Figura 3.7 A) Efecto de los tratamientos en las actividad enzimática específica de piruvato descarboxilasa (PDC) en raíz de guisante no tratadas (control) o tratadas con el herbicida Imazamox tras no haber o haber sido sometidas a una prehipoxia de 1 o 2 días. Media \pm ES (n=4). “**” indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los valores control y el tratamiento Imazamox para cada día de tratamiento. B) Significancias de los factores fijos herbicida y prehipoxia y su interacción tras la realización de análisis ANOVA de doble vía para cada uno de los días de estudio. Los valores significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) se muestran en negrita. C) Efecto del herbicida como porcentaje del control. Los cálculos son de cada día de estudio y grupo de prehipoxia. (los valores originales se muestran en el apartado A).

Las plantas C no mostraron variaciones en la actividad de la PDC y presentaron una actividad de alrededor de 10 nmol NADH min⁻¹ mg⁻¹ de proteína a lo largo de todo el experimento. La actividad de la PDC en las plantas IMX aumentó durante el transcurso del experimento. Evaluado como factor fijo en el ANOVA de dos vías, el tratamiento con herbicida fue significativo a día 1 y 7.

Las plantas sometidas a un pretratamiento de hipoxia, Prehipoxia -1 y Prehipoxia -2, presentaron unos niveles muy superiores que las no pretratadas a día 0, lo que demuestra

que ya tenían el metabolismo fermentativo activo. El efecto de la hipoxia respecto a la actividad PDC desapareció a partir del día 7.

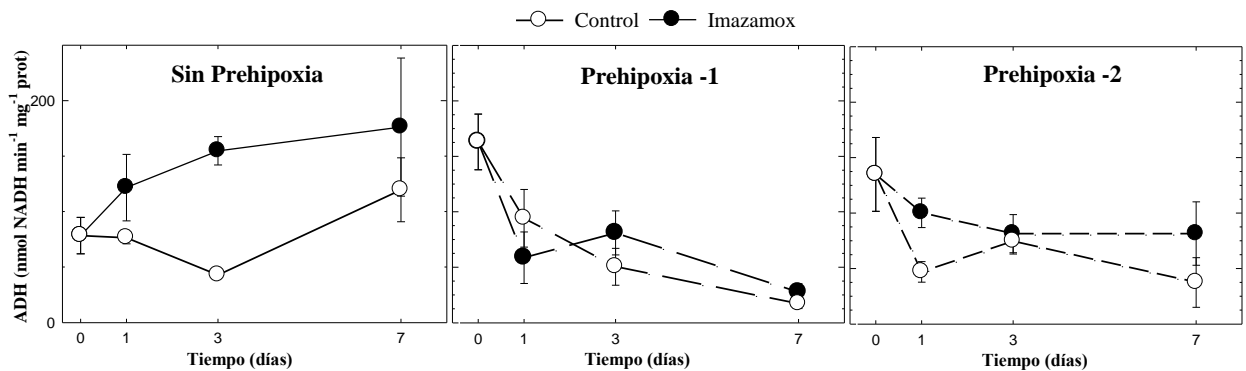
Las plantas prehipoxicas tratadas con herbicida, IMX-1 e IMX 2, no mostraron la misma recuperación que las prehipóxicas sin herbicida ya que mostraron una actividad enzimática superior a sus respectivos controles en todo momento. En las plantas, IMX-2, se dio el máximo el día 1 que se estabilizó y se mantuvo hasta el fin del experimento con un contenido de PDC considerablemente superior a los otros grupos.

El análisis estadístico no mostró interacción entre ambos factores (figura 3.7.B) y la grafica comparando los efectos del herbicida como porcentaje de su respectivo control sin herbicida no mostró una tendencia clara a lo largo del tiempo.

3.4.2 Actividad *in vitro* del enzima fermentativo ADH

Se estudió la actividad de la enzima ADH (figura 3.8) en raíz de guisante. Este enzima, cataliza la reacción en la que el acetaldehído se convierte en etanol.

A)



B)

	Día 1	Día 3	Día 7
Herbicida	0,632	0,682	0,205
Prehipoxia	0,001	0,146	0,451
Interacción	0,081	0,757	0,598

C)

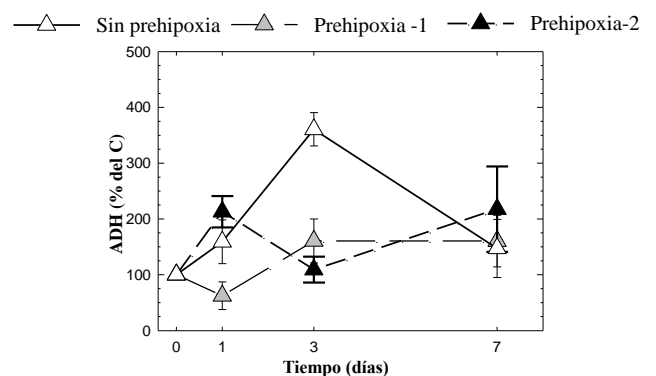


Figura 3.8 A) Efecto de los tratamientos en las actividad enzimática específica de alcohol deshidrogenasa (ADH) en raíz de guisante no tratadas (control) o tratadas con el herbicida Imazamox tras no haber o haber sido sometidas a una prehipoxia de 1 o 2 días. Media \pm ES (n=4). B) Significancias de los factores fijos herbicida y prehipoxia y su interacción tras la realización de análisis ANOVA de doble vía para cada uno de los días de estudio. Los valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) se muestran en negrita. C) Efecto

Resultados y discusión

del herbicida como porcentaje del control. Los cálculos son de cada día de estudio y grupo de prehipoxia. (los valores originales se muestran en el apartado A).

En las plantas que no tuvieron pretratamiento prehipóxico, a pesar de que las diferencias no fuesen significativas (figura 3.8.A), los niveles de ADH fueron ligeramente superiores en las plantas IMX que en las C.

En los grupos Prehipoxia -1 y Prehipoxia -2, los niveles de ADH en el día 0, fueron muy superiores a las plantas no pretratadas, lo cual hizo que el factor fijo independiente prehipoxia fuese significativo a día 1. El grupo expuesto a 24 horas de hipoxia, prehipoxia-1, a pesar de que los niveles de ADH de fueros similares a lo largo del experimento, a día 3 y 7 los valores de las plantas tratadas con Imazamox fueron tenuemente superiores.

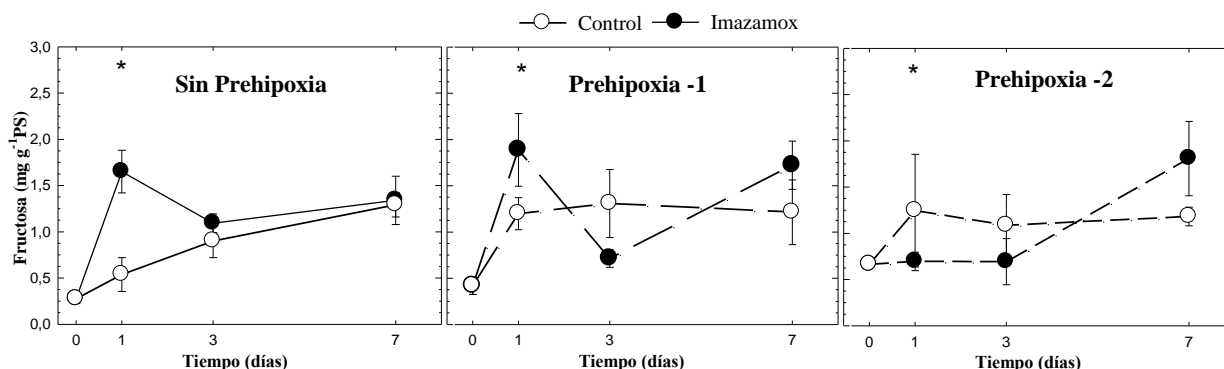
En plantas que se expusieron a una prehipoxia, a pesar de que las diferencias no fuesen significativas, la actividad de ADH fue superior en las plantas con herbicida. No hubo interacción entre los factores de prehipoxia y herbicida (figura 3.8.B). La gráfica comparativa del efecto del herbicida como porcentaje de su respectivo control (figura 3.8.C), no mostró una tendencia clara.

3.5 EFECTOS EN EL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS

Se midió el contenido en fructosa (figura 3.9), glucosa (figura 3.10), sacarosa (figura 3.11) y almidón (figura 3.13) en las raíces de las plantas de guisante con el fin de estudiar la posible acumulación de carbohidratos ya que es un efecto característico de los herbicidas IBAR (Abell, 1996; Gaston et al., 2002; Zabalza et al., 2004)

3.5.1 Contenido de fructosa

A)



B)

	Día 1	Día 3	Día 7
Herbicida	0,001	0,248	0,102
Prehipoxia	0,002	0,873	0,782
Interacción	0,002	0,375	0,552

C)

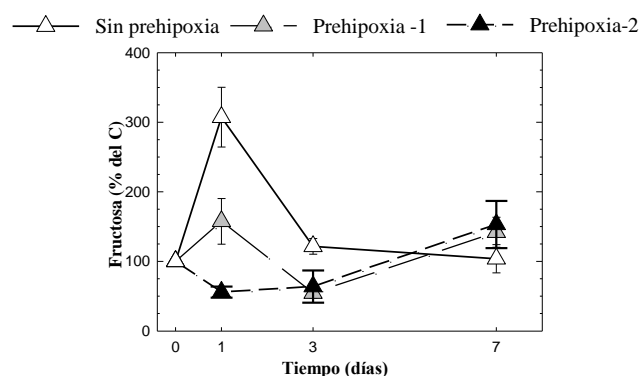
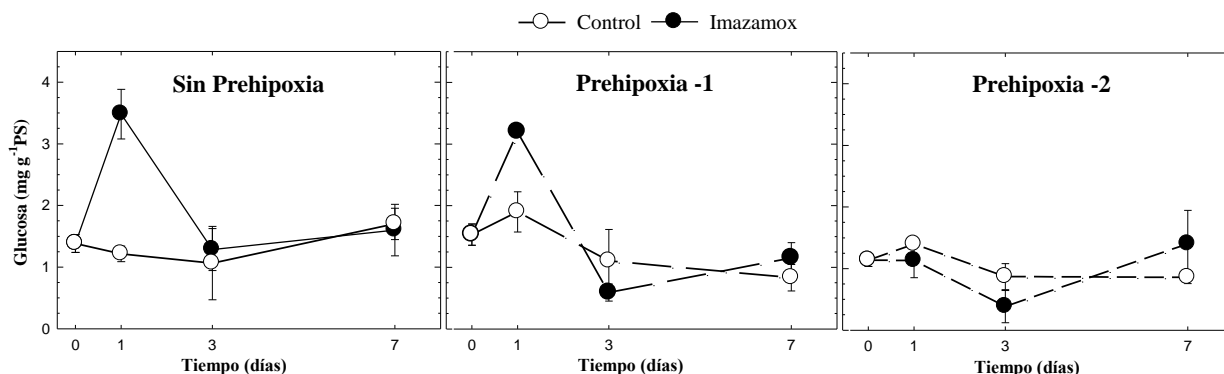


Figura 3.9 A) Efecto de los tratamientos en el contenido de fructosa (mg g⁻¹ PS) en raíz de guisante no tratadas (control) o tratadas con el herbicida Imazamox tras no haber o haber sido sometidas a una prehipoxia de 1 o 2 días. Media ± ES (n=4). “*” indica diferencias significativas (p≤0,05) entre los valores control y el tratamiento Imazamox para cada día de tratamiento. **B)** Significancias de los factores fijos herbicida y prehipoxia y su interacción tras la realización de análisis ANOVA de doble vía para cada uno de los días de estudio. Los valores significativamente diferentes (p<0,05) se muestran en negrita. **C)** Efecto del herbicida como porcentaje del control. Los cálculos son de cada día de estudio y grupo de prehipoxia. (los valores originales se muestran en el apartado A).

La variación del nivel de fructosa a causa del herbicida y/o el pretratamiento hipóxico no mostró un comportamiento claro en ninguno de los grupos estudiados. Dicho resultados no son de gran relevancia dado que la fructosa es un azúcar minoritario.

3.5.2 Contenido de glucosa

A)



B)

	Día 1	Día 3	Día 7
Herbicida	0,001	0,384	0,351
Prehipoxia	0,002	0,341	0,143
Interacción	0,002	0,539	0,621

C)

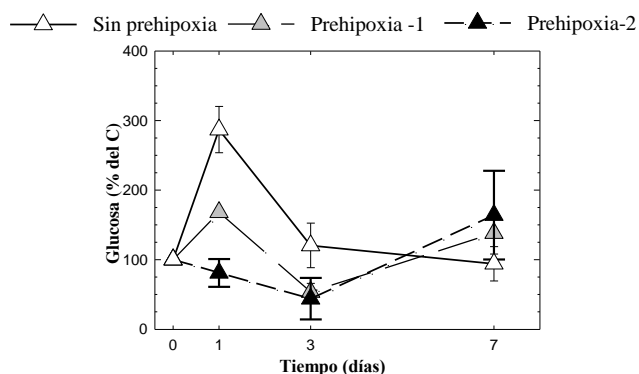


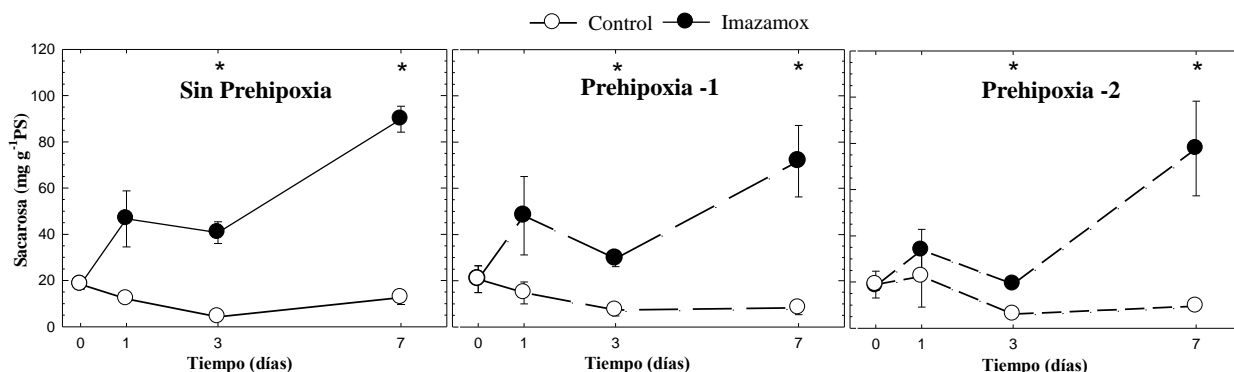
Figura 3.10 A) Efecto de los tratamientos en el contenido de glucosa (mg g^{-1} PS) en raíz de guisante no tratadas (control) o tratadas con el herbicida Imazamox tras no haber o haber sido sometidas a una prehipoxia de 1 o 2 días. Media \pm ES ($n=4$). B) Significancias de los factores fijos herbicida y prehipoxia y su interacción tras la realización de análisis ANOVA de doble vía para cada uno de los días de estudio. Los valores significativamente diferentes ($p<0,05$) se muestran en negrita. C) Efecto del herbicida como porcentaje del control. Los cálculos son de cada día de estudio y grupo de prehipoxia. (los valores originales se muestran en el apartado A).

Las plantas de los grupos Sin prehipoxia y Prehipoxia -1 tratadas con Imazamox, sufrieron un incremento puntual de glucosa a día 1, a día 3 y 7 el nivel de glucosa presentó valores similares a los control, siendo similar a las plantas sin Imazamox. Las plantas expuestas a dos días de pretratamiento hipóxico los niveles de glucosa fueron parejos en plantas con y sin Imazamox.

El estudio estadístico solo muestra interacción entre ambos factores el día 1 (figura 3.10.B). La figura 3.10.C muestra menor acumulación de glucosa a día 1 en los grupos prehipoxicos respecto a sus controles, lo cual mostraría un alivio del efecto del herbicida.

3.5.3 Contenido de sacarosa

A)



B)

	Día 1	Día 3	Día 7
Herbicida	0,020	0,000	0,000
Prehipoxia	0,756	0,013	0,337
Interacción	0,612	0,004	0,659

C)

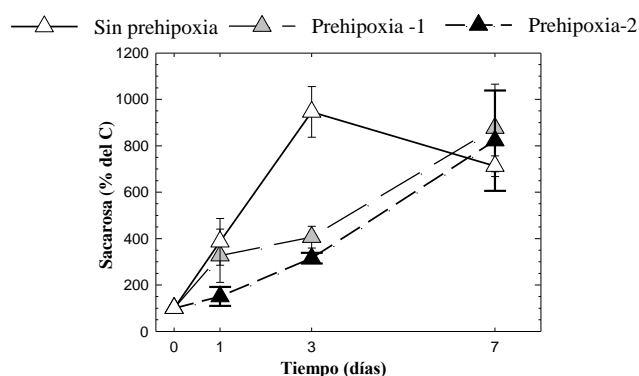


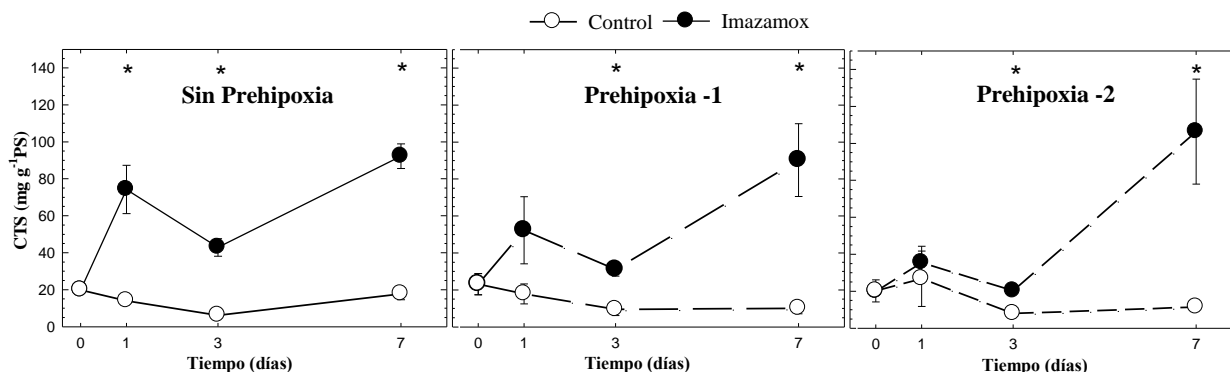
Figura 3.11 A) Efecto de los tratamientos en el contenido de sacarosa (mg g^{-1} PS) en raíz de guisante no tratadas (control) o tratadas con el herbicida Imazamox tras no haber o haber sido sometidas a una prehipoxia de 1 o 2 días. Media \pm ES (n=4). “*” indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los valores control y el tratamiento Imazamox para cada día de tratamiento. B) Significancias de los factores fijos herbicida y prehipoxia y su interacción tras la realización de análisis ANOVA de doble vía para cada uno de los días de estudio. Los valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) se muestran en negrita. C) Efecto del herbicida como porcentaje del control. Los cálculos son de cada día de estudio y grupo de prehipoxia. (los valores originales se muestran en el apartado A).

La prehipoxia como factor independiente únicamente fue significativa a día 3. Así, el comportamiento de los tres grupos fue similar: Las plantas control de los tres grupos, Sin prehipoxia, prehipoxia-1 y Prehipoxia -2 no presentaron variaciones en el contenido de sacarosa, mientras que con herbicida hubo una acumulación de sacarosa. En general se detectó que la aplicación de Imazamox provocaba acumulación de sacarosa, que es el carbohidrato soluble principal en raíces de guisante.

La gráfica comparativa del efecto del herbicida como porcentaje de su respectivo control (Figura 3.11.C) muestra que la acumulación de sacarosa a día 3 de tratamiento es considerablemente menor en los grupos que tuvieron un tratamiento prehipóxico.

3.5.4 Contenido de carbohidratos totales

A)



B)

	Día 1	Día 3	Día 7
Herbicida	0,001	0,000	0,000
Prehipoxia	0,464	0,018	0,809
Interacción	0,078	0,005	0,761

C)

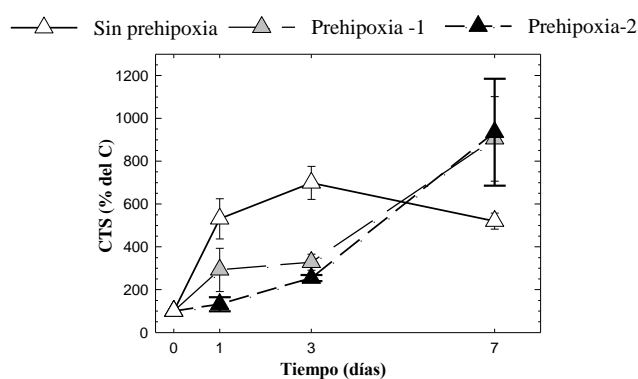


Figura 3.12 A) Efecto de los tratamientos en el contenido de carbohidratos totales (mg g⁻¹ PS) en raíz de guisante no tratadas (control) o tratadas con el herbicida Imazamox tras no haber o haber sido sometidas a una prehipoxia de 1 o 2 días. Media ± ES (n=4). “*” indica diferencias significativas (p≤0,05) entre los valores control y el tratamiento Imazamox para cada día de tratamiento. **B)** Significancias de los factores fijos herbicida y prehipoxia y su interacción tras la realización de análisis ANOVA de doble vía para cada uno de los días de estudio. Los valores significativamente diferentes (p<0,05) se muestran en negrita **C)** Efecto del herbicida como porcentaje del control. Los cálculos son de cada día de estudio y grupo de prehipoxia. (los valores originales se muestran en el apartado A).

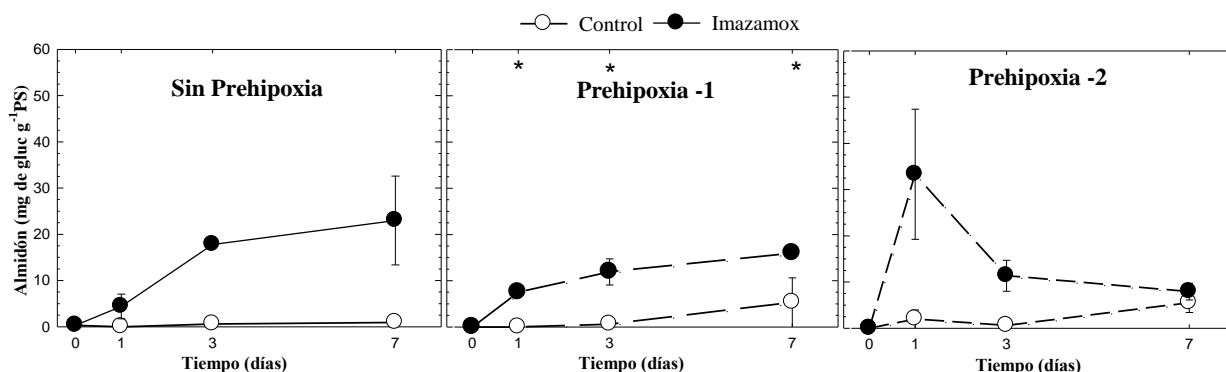
La suma de los tres carbohidratos solubles, refleja el carbohidrato mayoritario, que es la sacarosa. Las plantas a las que no se les aplicó el herbicida mostraron un contenido de carbohidratos parejo y continuo a lo largo de los 7 días (figura 3.12.A). Las plantas tratadas con el herbicida en cambio, sufrieron variaciones en el contenido de los mismos.

Las diferencias en los niveles de carbohidratos totales entre las plantas control e Imazamox fueron significativas durante todo el periodo de estudio (mg en el grupo Sin prehipoxia, mientras que en los otros grupos lo fue a partir del día 3.

El análisis estadístico realizado muestra interacción entre ambos factores el día 3 de estudio. El contenido de carbohidratos totales sigue una tendencia muy similar (figura 3.12.C) en los grupos prehipóxicos, y la acumulación provocada por el herbicida es menor en estos grupos que en el grupo Sin prehipoxia. Parece así que la acumulación provocada por el herbicida se aliviaría en las plantas sometidas a prehipoxia (lo cual justifica la interacción significativa detectada).

3.5.5 Contenido de almidón

A)



B)

	Día 1	Día 3	Día 7
Herbicida	0,034	,000	0,008
Prehipoxia	0,151	,996	0,364
Interacción	0,193	,625	0,080

C)

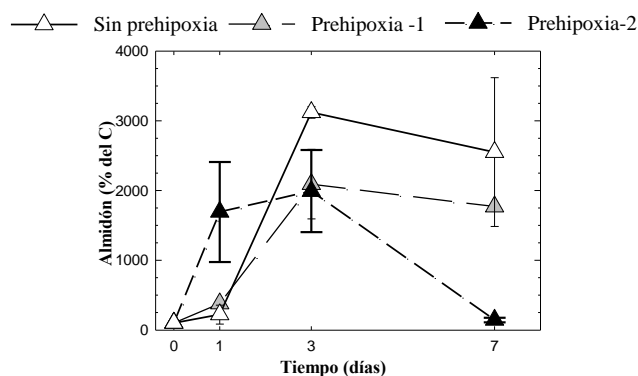


Figura 3.13 **A)** Efecto de los tratamientos en el contenido de almidón (mg de glucosa g⁻¹ PS) en raíz de guisante no tratadas (control) o tratadas con el herbicida Imazamox tras no haber o haber sido sometidas a una prehipoxia de 1 o 2 días. Media ± ES (n=4). “*” indica diferencias significativas (p≤0,05) entre los valores control y el tratamiento Imazamox para cada día de tratamiento. **B)** Significancias de los factores fijos herbicida y prehipoxia y su interacción tras la realización de análisis ANOVA de doble vía para cada uno de los días de estudio. Los valores significativamente diferentes (p<0,05) se muestran en negrita. **C)** Efecto del herbicida como porcentaje del control. Los cálculos son de cada día de estudio y grupo de prehipoxia. (los valores originales se muestran en el apartado A).

Las plantas tratadas con herbicidas inhibidores de ALS suelen presentar una acumulación de almidón (Abell, 1996; Gaston et al., 2002; Zabalza et al., 2004), debido a la inhibición del transporte de fotoasimilados. La inhibición del enzima ALS impide el uso de carbohidratos en las raíces, provocando su acumulación y anulando el gradiente necesario para el transporte de estos a largas distancias (Zabalza et al., 2004).

De manera similar también se ha producido acumulación de almidón en las plantas de los tres grupos tratadas con herbicida. Así el factor herbicida fue significativo en los tres días de estudio. Sin embargo se pudo comprobar que la acumulación provocada por el herbicida fue más significativa en las plantas Sin prehipoxia que en las sometidas a un pretratamiento de hipoxia.

3.6 DISCUSION GENERAL

El crecimiento de la parte aérea fue muy similar en los grupos estudiados. El análisis de doble vía mostró que ninguno de los factores fijos ni su interacción resultaron significativos.

La longitud de la raíz fue similar en todos los grupos hasta el día 3, día en el que el crecimiento de la raíz principal se detuvo en las plantas tratadas con Imazamox (figura 3.2). Esto causó diferencias significativas en la longitud de la raíz el día 7 entre las plantas control e Imazamox tanto en las plantas Sin prehipoxia como con prehipoxia-1 y -2. En las plantas en las que se aplicó herbicida se inhibió el crecimiento de las raíces secundarias y las raíces adoptaron un color marronáceo. La inhibición del crecimiento de la raíz que provocó el herbicida fue menos acusada en las plantas sometidas a una prehipoxia de 48 h, siendo solo significativa a día 7.

En cuanto a los indicadores del metabolismo del nitrógeno, las plantas tratadas con Imazamox mostraron acumulación de aminoácidos libres en todos los grupos de manera similar. A partir del tercer día de tratamiento del herbicida, la acumulación de aminoácidos provocada en las plantas Sin prehipoxia fue levemente mayor a la provocada en las plantas sometidas a prehipoxia (Figura 3.3). Los herbicidas inhibidores de la actividad ALS provocan una disminución del contenido de proteína soluble aunque este efecto solo fue detectado de manera no significativa, en las plantas Sin prehipoxia y Prehipoxia -1 (Figura 3.4).

Se estudiaron las actividades de los enzimas fermentativos PDC y ADH. En las plantas Sin prehipoxia se detectó la ya conocida inducción de ambas actividades. Las plantas de ambos niveles de prehipoxia presentaron una inducción similar en el momento de aplicación del herbicida. En las prehipóxicas que no fueron tratadas con herbicida las actividades fermentativas disminuyeron a niveles basales para el tercer día de tratamiento, mientras que en el caso de las plantas con herbicida las actividades enzimáticas se mantuvieron en niveles superiores a las prehipóxicas no tratadas a lo largo del tratamiento.

La acumulación de carbohidratos solubles es una característica de los herbicidas IBAR. En el experimento realizado solo se detectó acumulación significativa de los carbohidratos solubles totales, debido a la sacarosa (que es el azúcar mayoritario) ya que ni la fructosa ni la glucosa mostraron un patrón claro. La acumulación de carbohidratos solubles totales que provocó el herbicida a día 1 y día 3 fue menor en las plantas sometidas a prehipoxia, evidenciándose así un alivio en el efecto herbicida.

En los tres grupos, las plantas tratadas con el herbicida mostraron una acumulación de almidón similar, siendo este efecto característico de los herbicidas IBAR. La acumulación provocada por el herbicida fue mayor en las plantas Sin prehipoxia que en las sometidas al pretratamiento prehipoxico.

4. CONCLUSIONES GENERALES

- Tanto el herbicida como la prehipoxia inhibieron el crecimiento de la raíz, pero no hubo interacción entre ambos factores. La inhibición del crecimiento que provoca el herbicida es menos acusada en las plantas sometidas a una prehipoxia de 48 h.
- Los grupos de plantas tratadas con el herbicida mostraron un aumento en el contenido de aminoácidos libres totales. La acumulación de aminoácidos provocada por el herbicida menor, aunque de manera no significativa en las plantas sometidas a 2 días de prehipoxia.
- Los grupos de plantas que se mantuvieron en condiciones de hipoxia tuvieron un metabolismo fermentativo más activo durante los 3 primeros días del periodo de estudio, validándose así el diseño experimental, ya que se consiguieron las condiciones deseadas para la realización del experimento. Con el tratamiento herbicida, las actividades fermentativas fueron superiores a las de las plantas no tratadas también en los casos de prehipoxia.
- Las plantas tratadas con herbicida mostraron un incremento del contenido de carbohidratos solubles y almidón. Este incremento fue menor en las plantas sometidas a prehipoxia.
- Los indicadores del efecto herbicida (inhibición del crecimiento, acumulación de aminoácidos libres y acumulación de carbohidratos) son menos acusados si las plantas se someten a una hipoxia lo suficientemente severa (48 h en nuestro estudio).
- Las plantas con el metabolismo fermentativo activado en el momento de aplicación del herbicida presentan una atenuación de los efectos fisiológicos del herbicida Imazamox, apuntando así a un cierto alivio del mismo. Este resultado sugeriría que la respuesta fermentativa es un efecto fisiológico que ayuda a la supervivencia de la plantas tratadas con un herbicidas inhibidores de la actividad ALS.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abell LM** (1996) Weed Science Society of America Biochemical Approaches to Herbicide Discovery : Advances in Enzyme Target Identification and Inhibitor Design Biochemical Approaches to Herbicide Discovery : Advances in Enzyme Target Identification and Inhibitor Design '. **44**: 734–742
- Anderson PC, Hibberd KA** (1985) Evidence for the Interaction of an Imidazolinone Herbicide with Leucine, Valine, and Isoleucine Metabolism. *Weed Sci* **33**: 479–483
- Christie PJ, Hahn M, Walbot V** (1991) Low-Temperature Accumulation of Alcohol Dehydrogenase- 1 mRNA and Protein Activity in Maize and Rice Seedlings1. 699–706
- Van Dongen JT, Licausi F** (2014) *Low-Oxygen Stress in Plants*. Springer, Heidelberg
- Dumas R, Joyard J, Douce R** (1989) Purification and characterization of acetoxyacid reductoisomerase from spinach chloroplasts. *Biochem J* **262**: 971–976
- Dumas R, Lebrun M, Douce R** (1991) Isolation, characterization and sequence analysis of a full-length cDNA clone encoding acetoxy acid reductoisomerase from spinach chloroplasts. *Biochem J* **277** (Pt 2): 469–75
- EU Pesticide Database** (2015) EU Pesticide Database.
http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm,
- Gaston S, Ribas-Carbo M, Busquets S, Berry J, Zabalza A, Royuela M** (2002) Changes in mitochondrial electron partitioning in response to herbicides inhibiting branched-chain amino acid biosynthesis in soybean. *Physiol Plant* **114**: 524–532
- Heap I** (2015) Chronological increase in Resistant Weeds Globally.
- Kato-Noguchi H** (2000) Osmotic stress increases alcohol dehydrogenase activity in maize seedlings. *Biol Plant* **43**: 621–623
- Kimmerer TW, Kozlowski TT** (1982) Ethylene, Ethane, Acetaldehyde, and Ethanol Production By Plants under Stress. *PLANT Physiol* **69**: 840–847
- Kursteiner O, Dupuis I, Kuhlemeier C** (2003) The Pyruvate decarboxylase1 gene of Arabidopsis is required during anoxia but not other environmental stresses. *Plant Physiol* **132**: 968–978
- Mazur BJ, Chui CF, Smith JK** (1987) Isolation and Characterization of Plant Genes-Coding for Acetolactate Synthase, the Target Enzyme for 2 Classes of Herbicides. *Plant Physiol* **85**: 1110–1117

- MMARM** (2009) Ministerio Medio Ambiente Medio Rural y Marino. Informe sobre el nuevo reglamento de comercialización de los productos fitosanitarios. DG recursos agrícolas y ganaderos, SDG medios de producción.
- Narsai R, Rocha M, Geigenberger P, Whelan J, van Dongen JT** (2011) Comparative analysis between plant species of transcriptional and metabolic responses to hypoxia. *New Phytol* **190**: 472–87
- 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**: 262–9
- Perata P, Alpi A** (1993) Plant-Responses to Anaerobiosis. *Plant Sci* **93**: 1–17
- Rhodes D, Hogan AL, Deal L, Jamieson GC, Haworth P** (1987) Amino-Acid-Metabolism of Lemna-Minor-L .2. Responses to Chlorsulfuron. *Plant Physiol* **84**: 775–780
- Ricard B, Couee I, Raymond P, Saglio PH, Saintges V, Pradet A** (1994) Plant-Metabolism Under Hypoxia and Anoxia. *Plant Physiol Biochem* **32**: 1–10
- Rocha M, Licausi F, Araújo WL, Nunes-Nesi A, Sodek L, Fernie AR, van Dongen JT** (2010) Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **152**: 1501–13
- Rost TL, Gladish D, Steffen J, Robbins J** (1990) Is there a Relationship between Branched Amino-Acid Pool Size and Cell-Cycle Inhibition in Roots Treated with Imidazolinone Herbicides. *J Plant Growth Regul* **9**: 227–232
- Royuela M, Arrese-Igor C, Munoz-Rueda A, Gonzalez-Murua C** (1991) In vitro and In vivo Effects of Chlorsulfuron in Sensitive and Tolerant Plants. *J Plant Physiol* **139**: 235–239
- SchulzeSiebert D, Heineke D, Scharf H, Schultz G** (1984) Pyruvate-Derived Amino-Acids in Spinach-Chloroplasts - Synthesis and Regulation during Photosynthetic Carbon Metabolism. *Plant Physiol* **76**: 465–471
- Shaner DL, Reider ML** (1986) Physiological-Responses of Corn (*Zea-Mays*) to Ac 243,997 in Combination with Valine, Leucine, and Isoleucine. *Pestic Biochem Physiol* **25**: 248–257
- Shaner DL, Singh BK** (1991) Imidazolinone-Induced Loss of Acetohydroxyacid Synthase Activity in Maize is Not due to the Enzyme Degradation. *Plant Physiol* **97**: 1339–1341
- Singh BK** (1999) Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine. *In* BK Singh, ed, *Plant Amin. acids Biochem. Biotechnol.* Marcel Dekker, New York, pp 227–247

- Tadege M, Dupuis I, Kuhlemeier C** (1999) Ethanolic fermentation: new functions for an old pathway. *Trends Plant Sci* **1385**: 2–7
- Taiz L, Zeiger E** (2010) *Plant physiology*, Second edi. 782
- Tan S, Evans RR, Dahmer ML, Singh BK, Shaner DL** (2005) Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag Sci* **61**: 246–257
- Wiersma PA, Schmiemann MG, Condie JA, Crosby WL, Moloney MM** (1989) Isolation, Expression and Phylogenetic Inheritance of an Acetolactate Synthase Gene from Brassica-Napus. *Mol Gen Genet* **219**: 413–420
- Wittenbach V, Abell L** (1999) Inhibition of valine, leucine and isoleucine biosynthesis. *In* BK Singh, ed, *Plant Amin. acids Biochem. Biotechnol.* Marcel Dekker, New York, pp 385–416
- Zabalza A, Gaston S, Ribas-Carbó M, Orcaray L, Igal M, Royuela M** (2006) Nitrogen assimilation studies using ¹⁵N in soybean plants treated with imazethapyr, an inhibitor of branched-chain amino acid biosynthesis. *J Agric Food Chem* **54**: 8818–8823
- Zabalza A, González EM, Arrese-Igor C, Royuela M** (2005) Fermentative metabolism is induced by inhibiting different enzymes of the branched-chain amino acid biosynthesis pathway in pea plants. *J Agric Food Chem* **53**: 7486–7493
- Zabalza A, Orcaray L, Gaston S, Royuela M** (2004) Carbohydrate accumulation in leaves of plants treated with the herbicide chlorsulfuron or Imazethapyr is due to a decrease in sink strength. *Journal of agricultural and food chemistry* 7601–7606
- Zulet A, Gil-Monreal M, Villamor JG, Zabalza A, Van der Hoorn RAL, Royuela M** (2013) Proteolytic pathways induced by herbicides that inhibit amino acid biosynthesis. **8**: e73847

OTRAS FUENTES:

Herbicide Resistance Action Committee:

<http://www.hracglobal.com/Publications/ClassificationofHerbicideModeofAction/tabid/222/Default.aspx>

www.weedscience.org