

La sobreexpresión del gen *ALDH7B4* alivia los efectos provocados por herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos

Miriam Gil-Monreal^{1,✉}, Ana Zabalza¹, Tagnon D. Missihoun^{2,3}, Dorothea Bartels³, Mercedes Royuela¹

¹Departamento Ciencias del Medio Natural, Universidad Pública de Navarra, Campus Arrosadía, E-31006 Pamplona, Spain

^{2,3}Department of Biology, Rutgers University, Camden, New Jersey, United States of America

³Institute of Molecular Physiology and Biotechnology of Plants (IMBIO), University of Bonn, D-53115 Bonn, Germany

✉ miriam.gil@unavarra.es

Resumen: En este trabajo se ha profundizado en el conocimiento de los efectos fisiológicos provocados por los herbicidas imazamox y glifosato. En concreto, se ha estudiado el papel de la *ALDH7B4*, aldehído deshidrogenasa, que contribuye a la tolerancia de las plantas a diversos estreses. Se cultivaron plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y plantas que sobreexpresan el gen *ALDH7B4*, que fueron tratadas con dosis comparables de imazamox o glifosato. Se observó que ambos genotipos presentan valores similares de malondialdehído, indicando que la *ALDH7B4* no participa en la detoxificación de aldehídos derivados de la peroxidación lipídica. Por otro lado, se monitorizaron los principales efectos fisiológicos provocados por este tipo de herbicidas y se observó que los efectos de los herbicidas (contenido en carbohidratos y crecimiento) se atenúan en las plantas mutantes, indicando que la *ALDH7B4* contribuye a aliviar los efectos provocados por estos herbicidas.

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, carbohidratos, glifosato, imazamox, peroxidación lipídica.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el uso de herbicidas contribuye a mantener una alta producción en la agricultura, ya que permiten controlar las malas hierbas de una manera muy eficaz. Dentro de los herbicidas que encontramos en el mercado, el grupo de los herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos es el grupo más ampliamente utilizado a nivel mundial. En este grupo se encuentra el herbicida imazamox, herbicida que inhibe la acción del enzima acetolactato sintasa (ALS) en la ruta de biosíntesis de aminoácidos ramificados, y el glifosato, herbicida inhibidor de la acción del enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) en la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Duke, 1990). A pesar de que estos herbicidas inhiben rutas diferentes del metabolismo de las plantas, estudios previos han descrito que provocan efectos fisiológicos similares en las plantas tratadas, lo que sugiere que ambos compuestos provocan la muerte de las plantas por un mecanismo similar (Zulet et al., 2013; Zulet et al., 2015).

Uno de los efectos comunes provocados por los herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados y aromáticos ya descritos es la inducción de la expresión del gen *ALDH7B4* (Gil-Monreal et al., 2014). Este gen codifica una aldehído deshidrogenasa la cual se ha descrito que contribuye a la tolerancia de las plantas a diversos estreses, como la salinidad o la sequía, ya que ayuda a detoxificar los aldehídos derivados de la peroxidación lipídica provocada por dichos estreses (Kotchoni et al., 2006).

En este trabajo se ha profundizado en el conocimiento de los procesos fisiológicos comunes provocados por los herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados y aromáticos. El objetivo concreto de este trabajo es conocer el papel que cumple la *ALDH7B4* en la respuesta de las plantas a la aplicación de los herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos

ramificados y aromáticos, para esclarecer si su inducción forma parte del proceso de toxicidad de los herbicidas o es una respuesta de supervivencia de las plantas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajó con plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres (wt) y plantas mutantes que sobreexpresan el gen que codifica la ALDH7B4 (*ALDH7B4*) (Kotchoni et al., 2006). Se trabajó en cultivo hidropónico puro con aireación forzada y en condiciones controladas (Zulet et al., 2015). Cuando las plantas tenían 8 semanas, se aplicaron dosis comparables (en tiempo en causar la muerte y en intensidad de efectos) de los herbicidas imazamox o glifosato, a través de la solución nutritiva. En concreto, las dosis aplicadas fueron 1,5 mg L⁻¹ de imazamox (Pulsar[®]40, BASF Española SA, Barcelona, España) y 20 mg L⁻¹ de glifosato (Glyphos[®], Bayer CropScience, S.L, Paterna, Valencia, España). Un grupo de plantas de cada genotipo no fue tratado con herbicida y fue considerado como grupo control. Transcurridos tres días desde la aplicación de los herbicidas, se tomaron muestras de hojas y raíces de cada grupo de plantas. Se optó por esta duración de los tratamientos, ya que se buscaba un tiempo lo suficientemente corto como para que hubiera efectos de los tratamientos, pero no excesivamente largo como para que aparecieran reacciones secundarias que pudieran no ser debidas directamente a los herbicidas. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

2.1. Medida de peroxidación lipídica. Se determinó el nivel de peroxidación lipídica en raíces y hojas (0,1 g PF) mediante el método propuesto por Hodges et al. (1999). Básicamente, el método consiste en determinar el contenido en malondialdehído, compuesto que indica la existencia de peroxidación lipídica al formarse a partir de la descomposición de los ácidos grasos presentes en las membranas celulares. La peroxidación lipídica se expresa como nmol de malondialdehído, por unidad de peso fresco.

2.2. Determinación del contenido en carbohidratos. Se determinó el contenido en carbohidratos solubles en etanol (fructosa, glucosa y sacarosa) y de almidón en raíces y hojas (0,1 g PF) por electroforesis capilar (Zabalza et al., 2004). Los resultados se expresan como mg de carbohidratos por unidad de peso fresco.

2.3. Crecimiento de plantas en placas con agar. Se germinaron plantas de *A. thaliana* silvestres y plantas mutantes que sobreexpresan el gen ALDH7B4 en placas de petri con agar al 0,7%. A los 4 días tras su germinación, se trasplantaron a placas cuadradas (12 cm x 12 cm) con agar al 0,9% y medio Murashige & Skoog enriquecido con sacarosa al 1% (se colocaron 8 plántulas por placa). Las plantas se dividieron en 3 grupos, a uno de ellos se le añadió imazamox (Pulsar[®]40, BASF Española SA, Barcelona, España) al medio de cultivo en una concentración de 0,005 mg L⁻¹, a otro grupo se le incorporó glifosato (Glyphos[®], Bayer CropScience, S.L, Paterna, Valencia, España) en una concentración de 0,4 mg L⁻¹ y el otro grupo de plantas no fue tratado con herbicidas y fue el grupo control. Se realizaron tres réplicas de cada tratamiento. Se midió el crecimiento de las raíces a los 15 días tras ser trasplantadas a las placas y, para cada genotipo, se calculó el porcentaje de crecimiento de las plantas tratadas respecto a las no tratadas.

2.4. Análisis estadístico. Se compararon los efectos de los herbicidas con su respectivo control dentro de cada genotipo. Los resultados se analizaron aplicando un análisis de la varianza

(ANOVA) de una vía. La comparación de medias se realizó con la prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS). Los resultados significativamente diferentes para una $p < 0,05$ se indican en las gráficas con símbolos diferentes para cada tratamiento. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS Statistics (v22) para Windows.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. La inducción de la expresión del gen *ALDH7B4* no está relacionada con la detoxificación de los aldehídos producidos en la peroxidación lipídica. Estudios previos de nuestro grupo de investigación han descrito una inducción de la expresión del gen *ALDH7B4* por los herbicidas imazamox y glifosato (Gil-Monreal et al., 2014). La *ALDH7B4* tiene un papel protector en las plantas frente a diversos estreses ya que contribuye a detoxificar los aldehídos producidos en la peroxidación lipídica provocada en esas condiciones (Kotchoni et al., 2006). Para conocer si la inducción del gen *ALDH7B4* en plantas tratadas con herbicidas está relacionada con la detoxificación de aldehídos por parte de la *ALDH7B4*, se midió el contenido en malondialdehído como indicador del nivel de peroxidación lipídica presente en las plantas (Fig. 1).

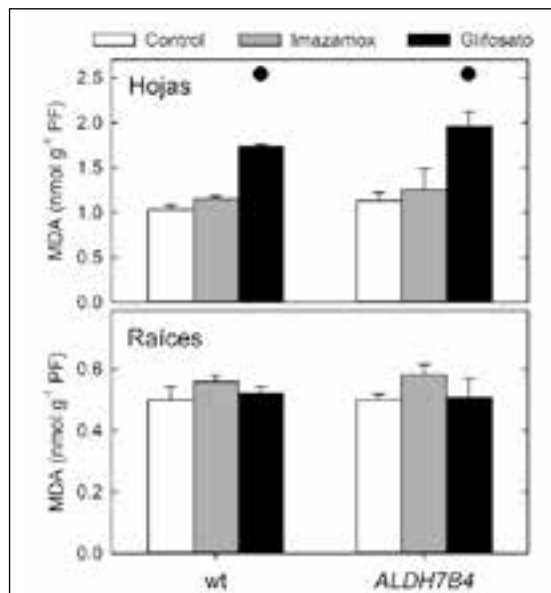


Figura 1. Efecto de los herbicidas imazamox y glifosato en el contenido de malondialdehído (MDA) en hojas y raíces de plantas silvestres (wt) de *Arabidopsis thaliana* y plantas mutantes que sobreexpresan el gen *ALDH7B4* (*ALDH7B4*), 3 días tras la aplicación de los tratamientos. • indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el valor de las plantas control y las tratadas con glifosato, para cada genotipo.

Los resultados mostraron que los herbicidas imazamox y glifosato no provocan peroxidación lipídica en las plantas tratadas, a excepción de las hojas de plantas tratadas con glifosato. Por otro lado, la sobreexpresión del gen *ALDH7B4* no modifica los niveles de malondialdehído presente

en las hojas y raíces de las plantas tratadas, ya que las plantas mutantes presentaron valores de malondialdehído muy similares a las plantas silvestres. Estos resultados indican que, al contrario de lo observado en otros estreses, la *ALDH7B4* no parece estar relacionada con el alivio de un estrés oxidativo en plantas tratadas con herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos.

3.2 Alivio del efecto de los herbicidas en plantas que sobreexpresan el gen *ALDH7B4*. Uno de los objetivos del presente trabajo es esclarecer si el aumento de la expresión del gen *ALDH7B4* forma parte de la toxicidad del herbicida o es un mecanismo de las plantas para sobrevivir al estrés provocado por el herbicida. Con tal efecto, se midió el contenido en carbohidratos, cuya acumulación es un indicador del efecto de los herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos (Zabalza et al., 2004). La figura 2 muestra el contenido en carbohidratos solubles totales (fructosa, glucosa y sacarosa) y almidón en hojas y raíces de plantas silvestres (wt) de *A. thaliana* y plantas mutantes que sobreexpresan el gen que codifica para la *ALDH7B4* (*ALDH7B4*), sin tratar (control) y tratadas con imazamox o glifosato durante 3 días.

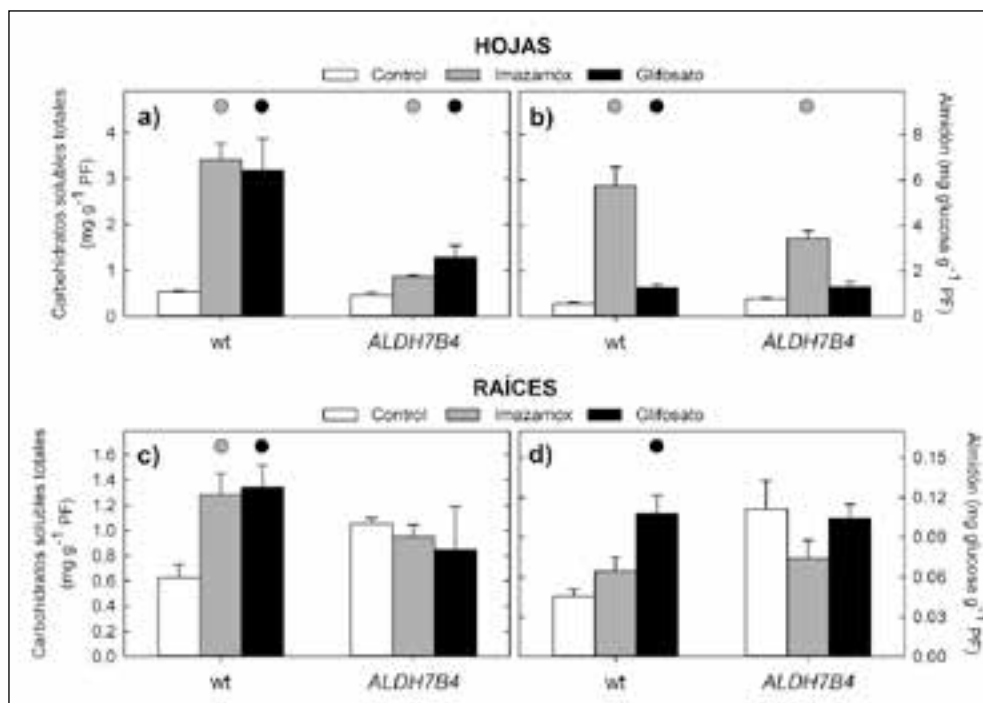


Figura 2. Efecto de los herbicidas imazamox y glifosato en el contenido en carbohidratos solubles totales (a y c) y almidón (b y d) en hojas y raíces de plantas silvestres (wt) de *Arabidopsis thaliana* y plantas mutantes que sobreexpresan el gen *ALDH7B4* (*ALDH7B4*), 3 días tras la aplicación de los tratamientos. • y • indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el valor de las plantas control y las tratadas con imazamox o glifosato, respectivamente, para cada genotipo.

Los resultados confirmaron la acumulación de carbohidratos solubles totales y almidón en hojas y raíces de las plantas silvestres tratadas con imazamox o glifosato. Sin embargo, se observó que dicha acumulación se atenúa notablemente en las plantas que sobreexpresan el gen

ALDH7B4. Estos resultados indican que la *ALDH7B4* parece contribuir a aliviar los efectos que estos herbicidas provocan en el metabolismo del carbono.

Por otro lado, se monitorizó el efecto de los herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos en el crecimiento de las plantas. Para ello se cultivaron plantas silvestres de *A. thaliana* y mutantes que sobreexpresan el gen *ALDH7B4* en placas de agar con o sin herbicida (Fig. 3). Se calculó el porcentaje de crecimiento de las plantas tratadas con herbicidas, respecto a las plantas no tratadas, para cada genotipo.

La inhibición del crecimiento por los herbicidas fue menor en las plantas mutantes. En el caso del imazamox, mientras que las plantas silvestres crecieron un 37,2% respecto al crecimiento de las plantas control, en las plantas mutantes las plantas tratadas con imazamox crecieron un 55,8% respecto a su control. En cuanto a las plantas tratadas con glifosato, las plantas silvestres crecieron un 8% respecto a las plantas silvestres control, y las plantas mutantes *ALDH7B4* crecieron un 14,6% respecto a su control. Estos resultados demuestran que la sobreexpresión del gen *ALDH7B4* ayuda a las plantas a tolerar mejor el estrés provocado por los herbicidas.

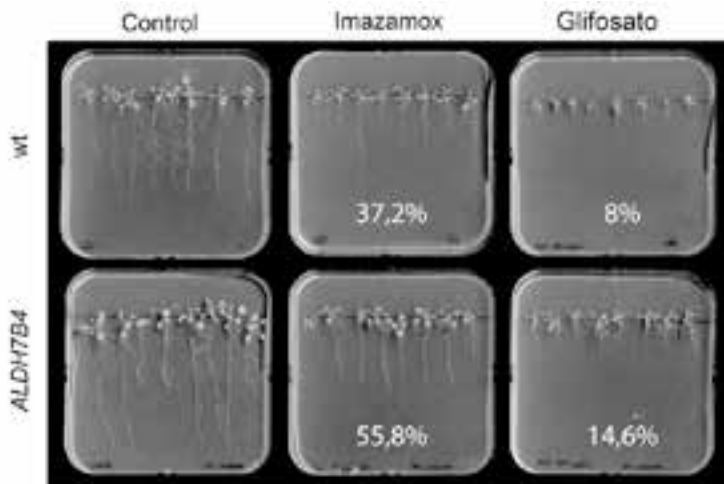


Figura 3. Efecto de los herbicidas imazamox y glifosato en el crecimiento de plantas silvestres (wt) de *Arabidopsis thaliana* y plantas mutantes que sobreexpresan el gen *ALDH7B4* (*ALDH7B4*), 15 días tras la aplicación de los tratamientos. El porcentaje insertado en cada fotografía indica el % medio de crecimiento de las plantas tratadas respecto a su control no tratado, en cada genotipo.

En conclusión, el presente estudio muestra que la *ALDH7B4* participa en el mecanismo de defensa de las plantas frente a la aplicación de herbicidas, pero, al contrario de lo que se ha observado en otros estreses, su papel no está relacionado con el alivio de la peroxidación lipídica.

4. AGRADECIMIENTOS

La investigación presentada ha sido financiada por el proyecto AGL2013-40567R. Miriam Gil-Monreal ha recibido una beca predoctoral y una beca de movilidad de la Universidad Pública de Navarra.

5. REFERENCIAS

- Duke SO (1990). Overview of herbicide mechanisms of action. *Environmental Health Perspectives*, 87, 263-271.
- Gil-Monreal M, Missihoun TD, Bartels D, Zabalza A and Royuela M (2014). Aldehyde dehydrogenases in the mode of action of amino acid biosynthesis inhibiting herbicides. *Plant Biology Europe FESP/EPPO 2014 Congress*. Convention Centre Dublin (Ireland).
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF and Prange RK (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 604-611.
- Kotchoni SO, Kuhns C, Ditzer A, Kirch H-H and Bartels D (2006). Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant, Cell & Environment*, 29, 1033-1048.
- Zabalza A, Orcaray L, Gaston S and 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*, 52, 7601-7606.
- Zulet A, Gil-Monreal M, Villamor JG, Zabalza A, van der Hoorn R a L and Royuela M (2013). Proteolytic pathways induced by herbicides that inhibit amino acid biosynthesis. *PLoS ONE*, 8, e73847.
- Zulet A, Gil-Monreal M, Zabalza A, van Dongen JT and Royuela M (2015). Fermentation and alternative oxidase contribute to the action of amino acid biosynthesis-inhibiting herbicides. *Journal of Plant Physiology*, 175, 102-112.

ALDH7B4 gene overexpression alleviates the effects induced by amino acid biosynthesis-inhibiting herbicides

Summary: The present work focuses on the effects provoked by the amino acid biosynthesis-inhibiting herbicides in plants. We evaluated the role of the *ALDH7B4*, one aldehyde dehydrogenase that contributes to different stress tolerance. Wild-type *Arabidopsis thaliana* plants and mutants overexpressing the *ALDH7B4* gene were grown and treated with imazamox or glyphosate. Similar levels of malondialdehyde were observed in both studied mutants, indicating that the *ALDH7B4* is not involved in the detoxification of the aldehydes derived from lipid peroxidation in plants treated with herbicides. Additionally, the main physiological effects provoked by this type of herbicides were monitored. The results shown that the effects of herbicides on the carbohydrate content and growth of plants were alleviated on plants overexpressing the *ALDH7B4* gene, suggesting that the *ALDH7B4* contributes to the tolerance of the stress provoked by these herbicides.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, carbohydrates, glyphosate, imazamox, lipid peroxidation.