



Figura 1. Aspecto visual de las plantas de *Amaranthus palmeri* siete días después de aplicar los tratamientos. Las plantas fueron no tratadas (Control), o tratadas con Quinato, 0.25 la dosis recomendada en campo de glifosato de forma aislada (Glp 0.25DR) o en combinación con quinato (Glp 0.25DR+Q), y la dosis recomendada en campo de herbicida (Glp DR).

## Aproximación metabolómica para la mayor eficacia del glifosato tras su combinación con quinato en el control de *Amaranthus palmeri*

En este estudio se valora la posible utilización del quinato como potenciador del efecto fitotóxico del glifosato al aplicarlos de forma conjunta en la mala hierba *Amaranthus palmeri*. Se aplicó quinato, glifosato en dos dosis (recomendada y una cuarta parte de la misma) y quinato junto con la dosis baja de glifosato. Se evaluaron los efectos visuales y el perfil metabólico de la ruta del siquimato mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. El glifosato provocó acumulación de los compuestos previos a su diana, la enzima EPSPS. La aplicación conjunta de quinato y glifosato provocó una exacerbación de la acumulación de quinato y de cuatro derivados del mismo respecto a las aplicaciones aisladas. Este comportamiento podría estar relacionado con la mayor fitotoxicidad detectada en el tratamiento combinado, que resultó tan letal como la dosis alta de glifosato. Así, se puede plantear la aplicación conjunta para una reducción de las dosis empleadas en campo para el control de esta especie.

Palabras clave: *Amaranthus palmeri*, glifosato, quinato, ruta del siquimato, GC-MS, metabolómica.

**A. Zulet-González\***,  
**M. Barco Antoñanzas**,  
**M. Gil-Monreal**, **A. Zabalza** y **M. Royuela**

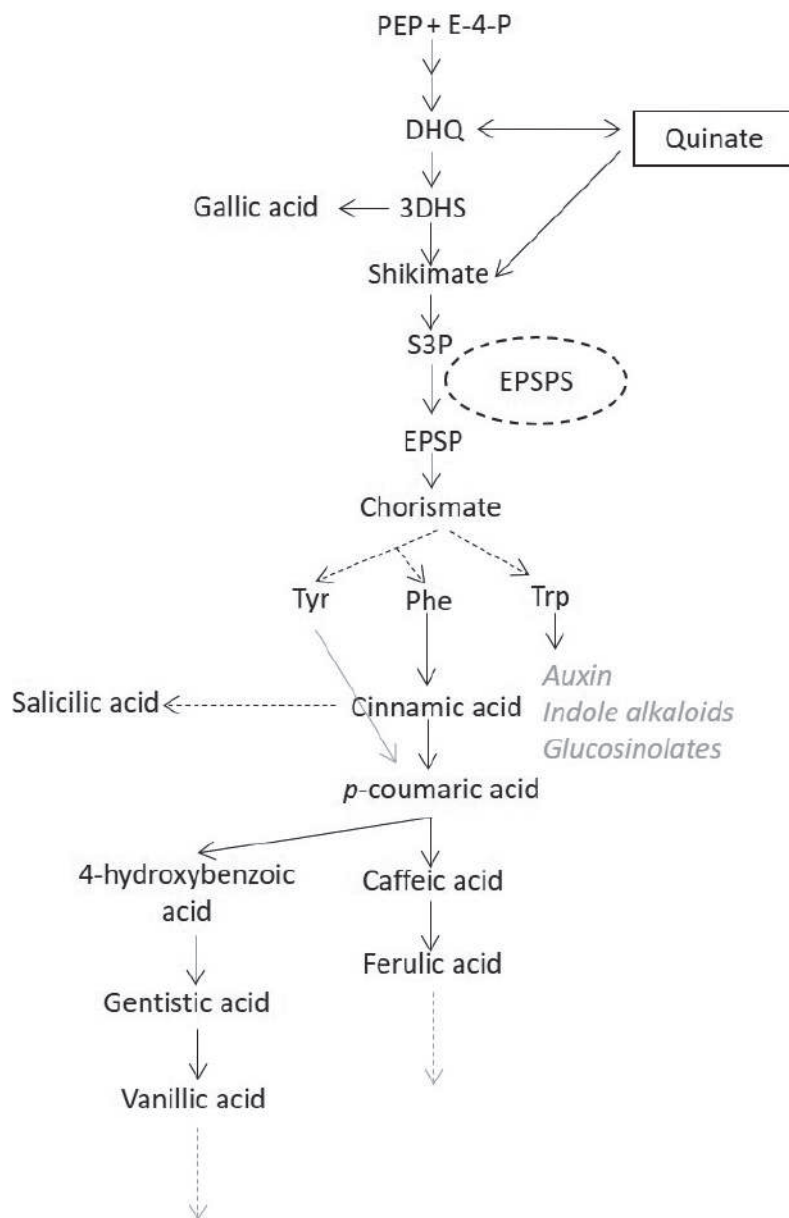
Institute for  
Multidisciplinary  
Research in Applied  
Biology, UPNA,  
Pamplona, Spain.  
\*ainhoa.zulet@  
unavarra.es

**D. Scheel y K. Gorzolka**  
Leibniz Institute for  
Plant Biochemistry,  
Halle (Saale),  
Germany.

El glifosato es el herbicida más utilizado a nivel mundial. Es un herbicida total, del grupo de las glicinas, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), enzima clave en la ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (Figura 1). Como consecuencia del bloqueo de la EPSPS se produce un aumento en la ruta de ciertos metabolitos, como el siquimato (De Maria y col., 2006), y el quinato (Orcaray y col., 2010). El quinato es un metabolito formado en una ramificación lateral de la misma ruta (ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos), el cual se ha demostrado que se incorpora a la ruta si se aplica exógenamente (Zulet y col., 2013). Con estos antecedentes se planteó el estudio del posible efecto potenciador de la toxicidad del glifosato con la aplicación posterior de quinato aplicado exógenamente. Se trata de bloquear la ruta del siquimato con una dosis reducida de herbicida e inmediatamente re-alimentarla con quinato. En este ensayo se aborda dicho objetivo desde una perspectiva metabólica sobre la posible utilización en *Amaranthus palmeri*, una de las peores malas hierbas a nivel mundial en la actualidad.

## Material y Métodos

Las plantas de *A. palmeri* (facilitadas por el Dr. Todd A. Gaines; Colorado State University, Fort Collins, CO, USA) se cultivaron en cultivo hidropónico (Fernández-Escalada y col., 2016). Se pulverizaron los siguientes tratamientos a plantas de 21 días: el quinato se aplicó a una dosis de 400 mM y el glifosato se aplicó de manera aislada a dos diferentes dosis: 0,25x y 1x la dosis recomendada en campo (DR) de 0.84 kg/ha. El tratamiento combinado se llevó a cabo aplicando quinato 24 h después de la dosis baja (0,25 DR), para poder valorar si el quinato produce un efecto potenciador (Zulet-González y col., 2019). Se realizó un seguimiento visual del estado de las plantas durante quince días y las hojas de las plantas fueron cosechadas tres días después de la aplicación del herbicida y fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta su análisis.



Esquema 1. Representación simplificada de la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Fosfoenol piruvato (PEP); eritrosa-4-fosfato (E-4-P); dehidroquinato (DHQ); 3-dehidrosiquimato (3DHS); siquimato-3-fosfato (S3P); 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS); enolpirilsiquimato-3-fosfato (EPSP). Tirosina (Tyr), Fenilalanina (Phe), Triptófano (Trp).

Se llevó a cabo una determinación de los metabolitos mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS) según el método descrito por Gorzalka y col. (2012).

## Resultados y Discusión

Se realizó un seguimiento del estado de las plantas y se evaluó la letalidad para cada uno de los tratamientos durante los quince días posteriores a aplicarlos. El tratamiento de quinato aplicado de forma aislada no produjo ningún efecto letal sobre las plantas,

si bien en el momento del muestreo (tres días) las plantas presentaban unas manchas ya descritas anteriormente en otros estudios en *Pisum sativum* (Zulet y col., 2013).

La dosis de herbicida de 0.25DR no resultó letal, mientras que la DR provocó la muerte de las plantas en siete días (Figura 1). El tratamiento combinado de la dosis baja de herbicida con quinato fue letal ya a los siete días, siendo la respuesta similar a la dosis DR de glifosato (Figura 1). La aplicación exógena de quinato con-

vierte en letal una dosis de herbicida que aplicada de forma aislada no lo es, por lo que esta combinación podría ser un método de control válido en esta especie, reduciendo un 75% la dosis de herbicida a aplicar.

En este estudio se ha realizado un perfil metabólico no dirigido que permitió detectar 130 metabolitos en las hojas, de los cuales fueron identificados 106. De todos los metabolitos identificados en el estudio metabolómico, a continuación se presentan el quinato y sus derivados (Figura 2) y los intermediarios de la ruta del siquimato anteriores a la enzima diana del glifosato (EPSPS) (Figura 3). El alto contenido de quinato detectado en los tratamientos en los cuales se aportó exógenamente demostró que el compuesto es absorbido por la planta (Figura 2A). De los tratamientos que sólo llevaban glifosato (GLY0, 25RD y GLYDR) fue la dosis letal (DR) la que produjo un incremento significativo del contenido de quinato en las plantas, resultado que concuerda con estudios realizados anteriormente en otras especies (Orcaray y col., 2010; Serra y col., 2015). La mayor acumulación de quinato se detectó en el tratamiento combinado, lo que parece indicar que la inhibición previa de la enzima EPSPS por el glifosato dificulta la incorporación del compuesto en la ruta metabólica. Este mismo patrón fue detectado en tres de los cuatro metabolitos derivados del quinato (Figura 2B, C, D, E). La concentración de los derivados tres y cuatro del quinato fue muy superior en el tratamiento combinado que en el resto de tratamientos.

Se ha descrito en la bibliografía que la inhibición de la enzima EPSPS por el glifosato provoca una gran acumulación de los metabolitos previos a esta enzima en hojas (Esquema 1), principalmente siquimato, y ácido gálico (Lydon y Duke, 1988; Becerril y col., 1989; Hernandez y col., 1999; Orcaray y col., 2010, 2012) y también de siquimato 3-fosfato (Siehl, 1997). En concordancia con ello, en este ensayo se detectó un incremento tras el tratamiento con glifosato en los tres metabolitos de la ruta principal: siquimato, 3-dehidrosiquimato y siquimato-3-fosfato y en el metabolito secundario ácido

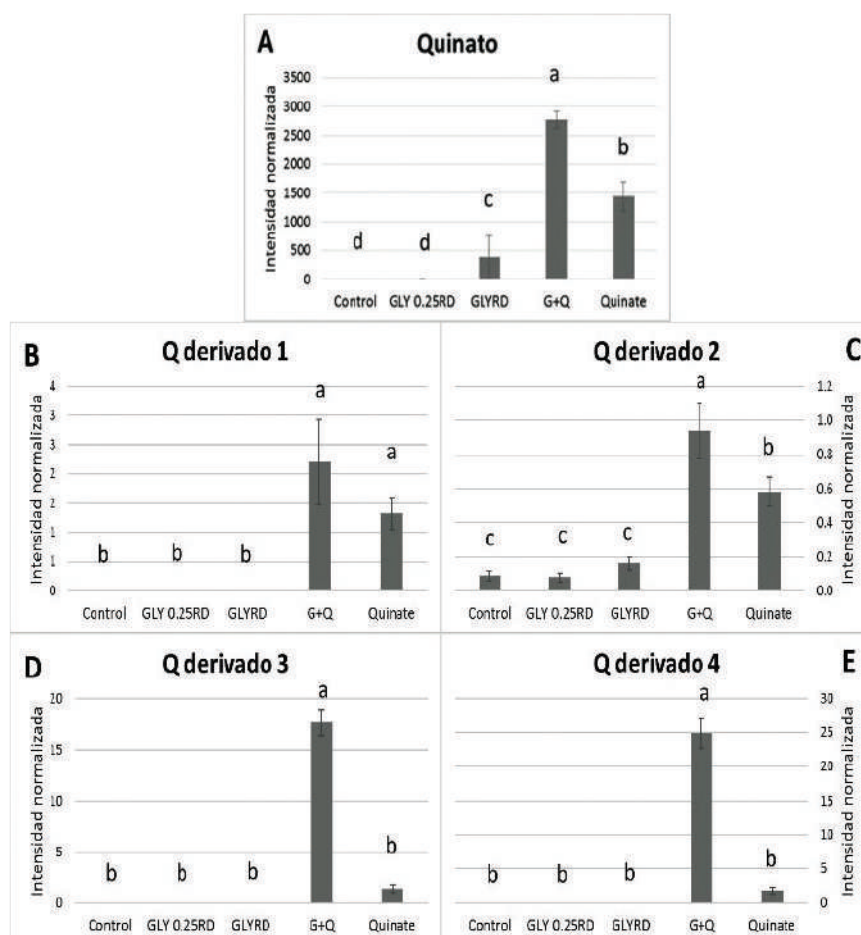


Figura 2. Contenido en quinato (A) y cuatro derivados del mismo (B, C, D, E), expresado como valores de intensidad normalizada, en plantas de *Amaranthus palmeri* no tratadas (Control) o muestreadas tres días después de aplicar los tratamientos: Glifosato a 0,25 o una vez la dosis recomendada en campo (GLY 0.25DR; GLY DR); tratamiento combinado de Glifosato a 0,25 DR y Quinato (G+Q) y Quinato (Q). Letras diferentes significan diferencias significativas para una  $p < 0.05$ .

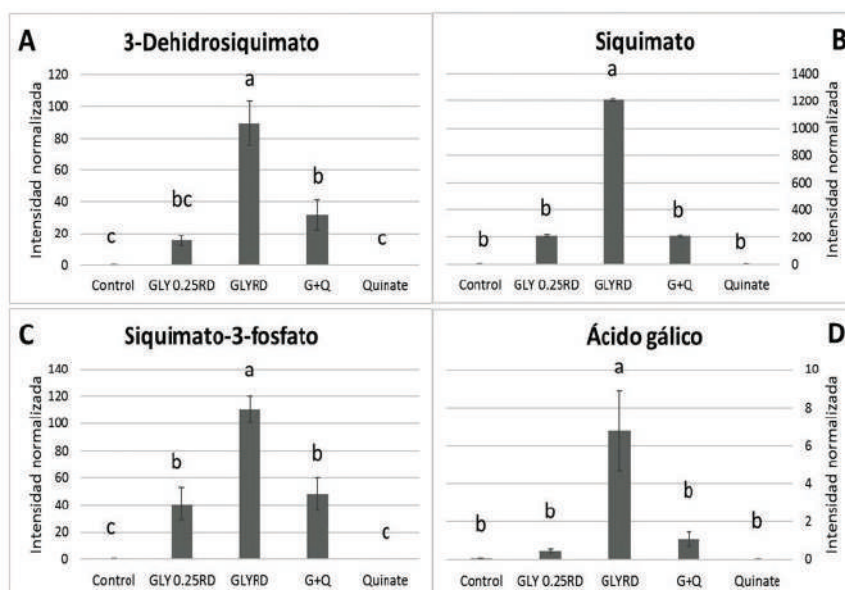


Figura 3. Contenido en 3-dehidrosiquimato (A), siquimato (B), siquimato-3-fosfato (C) y ácido gálico (D) expresado como valores de intensidad normalizada, en plantas de *Amaranthus palmeri* tres días después de aplicar los tratamientos: Biopower (Control); Glifosato a 0,25 o una vez la dosis recomendada en campo (GLY 0.25DR; GLY DR); tratamiento combinado de Glifosato a 0,25DR y Quinato (G+Q) y Quinato (Q). Letras diferentes significan diferencias significativas para una  $p < 0.05$ .



gálico (Figura 3B y D). Para los cuatro intermediarios de la ruta del siquimato, el incremento detectado fue proporcional a la dosis de herbicida aplicada, siendo así mayor el incremento con la DR que con la 0.25DR para todos los compuestos. El mayor nivel de inhibición de la enzima parece que sería la causa de esta mayor acumulación con la dosis alta de glifosato. La aplicación de quinato no modificó el contenido de estos compuestos, ni al ser aplicado de manera aislada ni modificando el efecto del herbicida al aplicarlo de manera conjunta con éste.

## Conclusiones

El glifosato aplicado de forma aislada provocó en las plantas tratadas una acumulación proporcional a la dosis aplicada de los metabolitos de la ruta anteriores a su diana: quinato, siquimato, 3-dehidrosiquimato, siquimato-3-fosfato y ácido gallico. El tratamiento conjunto de quinato con un cuarto de la dosis recomendada de glifosato fue tan letal como la dosis recomendada de herbicida y dicho incremento de la fitotoxicidad

del herbicida podría estar relacionado con un incremento en el contenido de quinato y sus compuestos derivados, ya que su acumulación fue máxima en la aplicación conjunta. Así, el bloqueo de la enzima EPSPS previa a la aplicación de quinato podría estar generando que el quinato se transforme en sus derivados y fuera esta la causa del incremento de su concentración y quizá de la mayor toxicidad del herbicida.

## Agradecimientos

A Z-G y M B-A son beneficiarias de una beca predoctoral de la UPNA. Proyecto financiado con el proyecto AGL2016-77531-R. La movilidad fue financiada por la Escuela de Doctorado de Navarra y ERASMUS+. Agradecemos la colaboración de Julia Taubert, su asistencia técnica, y al Leibniz Institute for Plant Biochemistry (Halle (Saale), Alemania) todas las facilidades para este estudio.

## Abstract

In this study, the possible use of quinate as an enhancer of glyphosate efficacy was evaluated on *Amaran-*

*thus palmeri* weed plants. Plants were treated with quinate, two different glyphosate doses (the quarter or the full recommended field dose) and the combination of quinate and the lower glyphosate dose. Visual effects were assessed and metabolites of the shikimate pathway were investigated by gas chromatography-mass spectrometry. A dose dependent increase of the metabolites upstream EPSPS was observed after glyphosate applied alone. The combined treatment provoked an enhancement of quinate and four quinate derivatives accumulated in comparison with the individual treatments. This might be related to higher toxicity of the combined treatment, which was as lethal as the recommended dose of glyphosate. Therefore, quinate would be an enhancer of glyphosate efficacy and lethality, and could be used to reduce the doses applied to control this weed.

## Bibliografía

- ! Becerril J.M., Duke S.O. & Lydon J. (1989). Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvet-leaf. *Phytochemistry*, **28**, 695-699.
- De María N, Becerril J, García-Plazaola J, Hrenández A, Defelipe MR & Fernández Pascual M. (2006). New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: Role of shikimate accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 2621-2628.
- Fernández-Escalada M., Gil-Monreal M., Zabalza A. & Royuela M. (2016). Characterization of the *Amaranthus palmeri* physiological response to glyphosate in susceptible and resistant populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **64**, 95-106.
- Gorzolka K, Lissel M, Kessler N, Loch-Ahring S & Niehaus K. (2012). Metabolite fingerprinting of barley whole seeds, endosperms, and embryos during industrial malting. *Journal of Biotechnology*, **159**, 177-187.
- Lydon J. & Duke S.O. (1988). Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **36**, 813-818.
- Hernández A, García-Plazaola J.I. & Becerril J.M. (1999). Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 2920-2925.
- 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 Management Science*, **66**, 262-269.
- Orcaray L, Zulet A., Zabalza A. & Royuela M. (2012). Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. *Journal of Plant Physiology*, **169**, 27-33.
- Serra A, Couée I, Renault D, Gouesbet G & Sulmon C. (2015) Metabolic profiling of *Lolium perenne* shows functional integration of metabolic responses to diverse subtoxic conditions of chemical stress. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 1801-1816.
- Siehl, D. L. (1997). Herbicide activity: Toxicology, biochemistry and molecular biology. (Roe RM, Burton JD & Kuhr RJ), 37-67. IOS Press, Amsterdam, Netherlands.
- Zulet A, Zabalza A & Royuela M. (2013). Phytotoxic and metabolic effects of exogenous quinate on *Pisum sativum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, **3**, 779-788.
- Zulet-González A, Fernández-Escalada M, Zabalza A & Royuela M. (2019). Enhancement of glyphosate efficacy on *Amaranthus palmeri* by exogenous quinate application. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **158**, 1-11.