

Alteraciones en el sistema hormonal inducidas por los herbicidas inhibidores de la síntesis de aminoácidos en *Amaranthus palmeri*

Alterations in the hormonal system induced by amino acid synthesis-inhibiting herbicides in *Amaranthus palmeri*

Mikel V. Eceiza^{1,*}, Clara Jiménez-Martínez¹, Miriam Gil-Monreal¹, Michiel Huybretch², Ann Cuypers², Ana Zabalza¹ & Mercedes Royuela¹

¹ Institute for Multidisciplinary Research in Applied Biology (IMAB), Universidad Pública de Navarra, Campus Arrosadía s/n, 31006, Pamplona, España

² Centre of Environmental Sciences, University of Hasselt, Diepenbeek, Belgium

(*E-mail: mikel.vicente@unavarra.es)

<https://doi.org/10.19084/rca.34979>

Recibido/received: 2024.01.15

Aceptado/accepted: 2024.02.28

RESUMEN

El glifosato y los inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS), herbicidas inhibidores de la síntesis de aminoácidos, presentan varios efectos fisiológicos comunes en su modo de acción. Sin embargo, la señalización hormonal inducida por estos grupos de herbicidas no se ha estudiado. El objetivo principal fue comparar la señalización hormonal inducida por el glifosato y la inducida por los inhibidores de la ALS, y conocer la influencia de la resistencia *target-site* a estos herbicidas en la respuesta hormonal a los mismos. Se trabajó con cuatro poblaciones de la mala hierba *Amaranthus palmeri* (sensible a glifosato, resistente a glifosato, sensible a inhibidores de la ALS, resistente a inhibidores de la ALS), que se trataron con diferentes dosis de glifosato o del inhibidor de la ALS nicosulfurón, y en las que se analizó por cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento el contenido de las diferentes hormonas. Los resultados mostraron respuestas hormonales diferentes a ambos herbicidas. En el caso del glifosato, se indujo la síntesis de ácido abscísico, tanto en plantas sensibles como resistentes. Es una hormona muy ligada a la respuesta al estrés abiótico, relacionada con una reducción del crecimiento. Este resultado evidencia que a pesar de no resultar letales las dosis de glifosato en las plantas resistentes, estas llegaron a sufrir cierto estrés. En cambio, el nicosulfurón indujo, en las plantas sensibles, la síntesis de las giberelinas y las auxinas, hormonas promotoras del crecimiento. Se concluye que, a pesar de la similitud en el modo de acción de ambos herbicidas, existe una clara disparidad en la señalización hormonal que inducen.

Palabras clave: hormonas, glifosato, nicosulfurón, resistencia *target-site*, *Amaranthus palmeri*.

ABSTRACT

Glyphosate and acetolactate synthase (ALS) inhibitors, amino acid synthesis inhibiting herbicides, share several common physiological effects in their mode of action. Nevertheless, hormonal signalling induced by these herbicide groups has not been studied. Aiming at comparing the hormonal signalling induced by glyphosate and by the ALS inhibitors, and knowing the influence of the target-site resistance to both groups of herbicides on the hormonal response to these herbicides, the content of different hormones has been analysed by ultra-performance liquid chromatography in four *Amaranthus palmeri* populations (glyphosate-sensitive, glyphosate-resistant, ALS-inhibitor sensitive, and ALS-inhibitor resistant) treated with different doses of glyphosate or the ALS inhibitor nicosulfuron. Results showed different hormonal responses to both herbicides. In the case of glyphosate, abscisic acid synthesis was induced in both sensitive and resistant plants. This hormone is linked to the response to abiotic stress, and is related with growth arrest. This result evidences that, even though herbicide doses were not lethal in resistant plants, they suffered a mild stress. On the other hand, nicosulfuron induced gibberellins and auxins, growth-promoting hormones, in sensitive plants. In summary, despite the similarity in the mode of action of both herbicides, there is a clear disparity in the hormonal signalling they induce.

Keywords: hormones, glyphosate, nicosulfuron, target-site resistance, *Amaranthus palmeri*.

INTRODUCCIÓN

El glifosato y los inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) son herbicidas que inhiben la síntesis de aminoácidos en su mecanismo de acción: el glifosato inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos y los inhibidores de la ALS, la de aminoácidos ramificados. Ambos presentan bastantes efectos fisiológicos comunes en su mecanismo de acción: la acumulación de aminoácidos, la disminución de proteína soluble (Zulet *et al.*, 2013) y el estrés oxidativo (Eceiza *et al.*, 2022, 2023).

Las plantas han desarrollado sistemas de señalización molecular en respuesta al estrés causado por las condiciones ambientales adversas, como los herbicidas. Uno de los sistemas de señalización más importantes es el sistema hormonal, que se encarga de la regulación y coordinación mediante la producción de las hormonas. Las hormonas vegetales o fitohormonas se difunden pasando de célula a célula y se requieren en cantidades mínimas para realizar su función: control del crecimiento y el desarrollo, afectando a la división, el alargamiento y a la diferenciación celular. Los grupos clásicos de hormonas incluyen las auxinas, las giberelinas (GAs), las citoquininas (CKs), el ácido abscísico (ABA) y el etileno; aunque, actualmente, también se consideran como principales otras hormonas como el jasmonato (JA). La inducción de cada grupo de hormonas cumple funciones diferentes. Así, el ABA reprime el crecimiento de las plantas induciendo el cierre estomático, mientras que el etileno promueve la senescencia y abscisión foliares; la sobreproducción de ambas hormonas es una respuesta muy común ante diferentes estreses ambientales. Por el contrario, las auxinas (sobre todo el ácido indolacético, IAA) protegen a la planta del estrés oxidativo e inducen el crecimiento, igual que las GAs y las CKs (Lecube *et al.*, 2014; Majid & Abbas, 2018).

A pesar de que el glifosato y los inhibidores de la ALS son herbicidas ampliamente utilizados y estudiados, hay muy pocos estudios sobre las posibles alteraciones en el contenido de las hormonas en respuesta a dichos herbicidas. En este trabajo, se ha tratado de elucidar la implicación del sistema hormonal en el modo de acción de los herbicidas glifosato y nicosulfurón (inhibidor de la ALS), en individuos sensibles y resistentes *target-site*

de *Amaranthus palmeri* S. Watson, una de las malas hierbas de mayor interés a nivel mundial en la actualidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y tratamientos

Las poblaciones sensible y resistente a glifosato (GLS y GLR), originarias de Carolina del Norte, EE. UU., fueron cedidas por el Dr. Gaines (Universidad Estatal de Colorado, CO, EE. UU.). Las poblaciones sensible y resistente a inhibidores de la ALS (AIS y AIR), originarias de Lleida, fueron cedidas por el Dr. Torra (Universidad de Lleida). Estudios previos caracterizaron los mecanismos de resistencia *target-site* frente a glifosato (Fernández-Escalada *et al.*, 2016) y a inhibidores de la ALS (Torra *et al.*, 2020; Eceiza *et al.*, 2023) en las respectivas poblaciones resistentes. En el caso de la población GLR, la resistencia venía dada por una amplificación génica de la 5-enolpiruvil-3-fosfato sintasa (EPSPS), enzima diana del glifosato. Las plantas de la población AIR contenían una mutación en la posición Trp-574 del gen ALS.

Las plantas fueron crecidas en cultivo hidropónico puro con aireación forzada (Fernández-Escalada *et al.*, 2016) y fueron tratadas a los 19-22 días de edad. Sobre las poblaciones GLS y GLR, se aplicó el herbicida glifosato (Fortin Green®) en dos dosis: dosis recomendada (DR) equivalente a 0,84 kg m.a. ha⁻¹ y 3 veces la dosis recomendada; sobre las poblaciones GLS y GLR, se aplicó el herbicida nicosulfurón (SAMSON®) en dos dosis: dosis recomendada equivalente a 0,06 kg m.a. ha⁻¹ y 3 veces la dosis recomendada. Se dejaron algunas plantas sin tratar (controles) en todas las poblaciones. Se muestrearon las hojas a los tres días en el caso del glifosato y de siete días en el caso del nicosulfurón.

Contenido de hormonas

Se analizaron las auxinas (IAA y su forma conjugada, IAAC), el ABA, las GAs, las CKs, el JA y los compuestos de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). El método aplicado para el análisis de las hormonas está basado en Qian *et al.* (2021); el contenido de todas ellas fue determinado

mediante cromatografía de líquidos de ultra-alto rendimiento.

Análisis estadístico

Las plantas de las poblaciones GLS y GLR no se compararon con las de AIS y AIR, en ningún caso: los experimentos con glifosato y con nicosulfurón fueron experimentos paralelos separados. Las diferencias entre los controles GLS y GLR y entre los controles AIS y AIR se evaluaron mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$). Las diferencias entre tratamientos dentro de una misma población se evaluaron mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba posthoc HSD de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las plantas sensibles (GLS y AIS) tratadas con los herbicidas, el crecimiento se redujo y poco después murieron (aún vivían en el momento del muestreo), aunque la acción del glifosato fue más rápida que la del nicosulfurón. Las plantas resistentes (GLR y AIR) sobrevivieron a todos los tratamientos; en las plantas GLR tratadas con la mayor dosis de glifosato se observaron algunos efectos visuales y una ligera reducción del crecimiento, que no se observó en las plantas AIR tratadas con nicosulfurón.

La Figura 1 muestra el contenido de hormonas ligadas al estrés (JA, ABA, IAA e IAAC). En respuesta al glifosato, destaca el incremento del ABA, tanto en plantas sensibles como en resistentes, junto con el

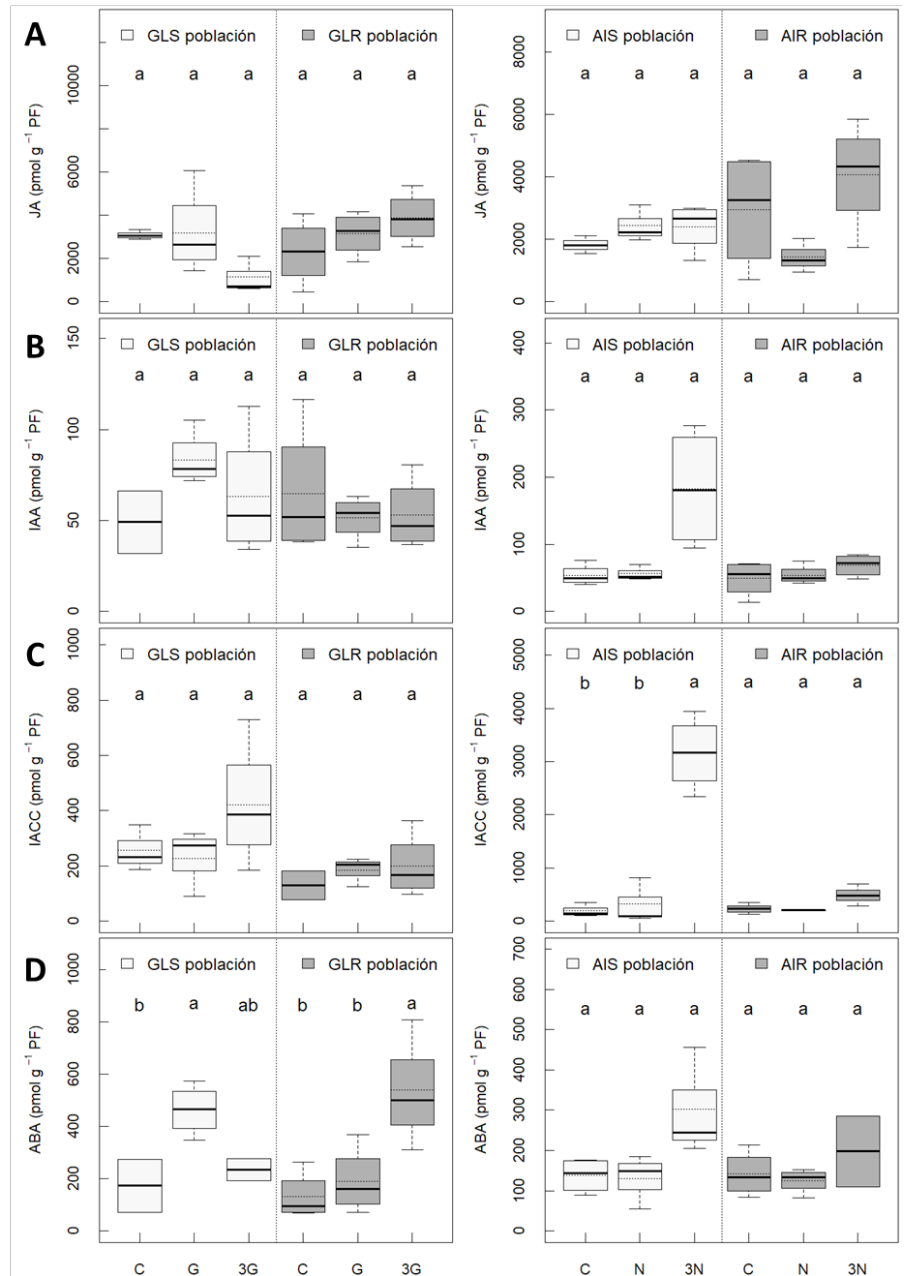


Figura 1 - Contenido en ácido jasmónico (JA, A), indolacético (IAA, B), indolacético conjugado (IAA, C) y abscísico (ABA, D) en poblaciones de *Amaranthus palmeri* sensible a glifosato (GLS), resistente a glifosato (GLR), sensible a inhibidores de ALS (AIS) y resistente a inhibidores de ALS (AIR). Tratamientos: sin tratar (control, C), dosis recomendada de glifosato (G) o nicosulfurón (N), y 3 veces la dosis recomendada de glifosato (3G) o nicosulfurón (3N). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey, $p < 0,05$).

descenso del JA. Sin embargo, en respuesta al nicosulfurón, los incrementos más significativos se observaron en las auxinas (IAA, IAAC) en la población sensible. Así, se muestra una respuesta contraria de las plantas a los herbicidas glifosato y nicosulfurón.

Con respecto a las GAs, se obtuvieron datos representativos de la GA7, la GA15 y la GA19 (datos no mostrados) y la GA7, mostró un ligero incremento significativo en la población AIS tratada con la dosis más alta de nicosulfurón.

El ABA, inducido por el glifosato, es una respuesta clásica a muchos tipos de estreses, e induce el cierre estomático, que se traduce finalmente en una reducción del crecimiento. Tanto las plantas sensibles como las resistentes incrementan el ABA en respuesta al glifosato, lo que indica que, a pesar de la resistencia, el glifosato genera cierta respuesta en las plantas resistentes. Sin embargo, en el caso del nicosulfurón, se induce la síntesis de hormonas del crecimiento: las auxinas y las GAs. Una posible hipótesis es que esta diferencia en la señalización hormonal esté relacionada con el hecho de que el glifosato lleve a las plantas a la muerte mucho más rápidamente que los inhibidores de la ALS.

El etileno no pudo medirse con los recursos disponibles, pero sí se midió su precursor inmediato, el ACC, y sus formas de reserva principales, jasmonil-ACC (JA-ACC) y malonil-ACC (MACC); y el aminoácido metionina, precursor del ACC. Las poblaciones

sensibles sin tratar presentaron mayor contenido en metionina que las resistentes. En respuesta al glifosato, se incrementó el MACC en la población GLS, pero disminuyó el JA-ACC, resultando en

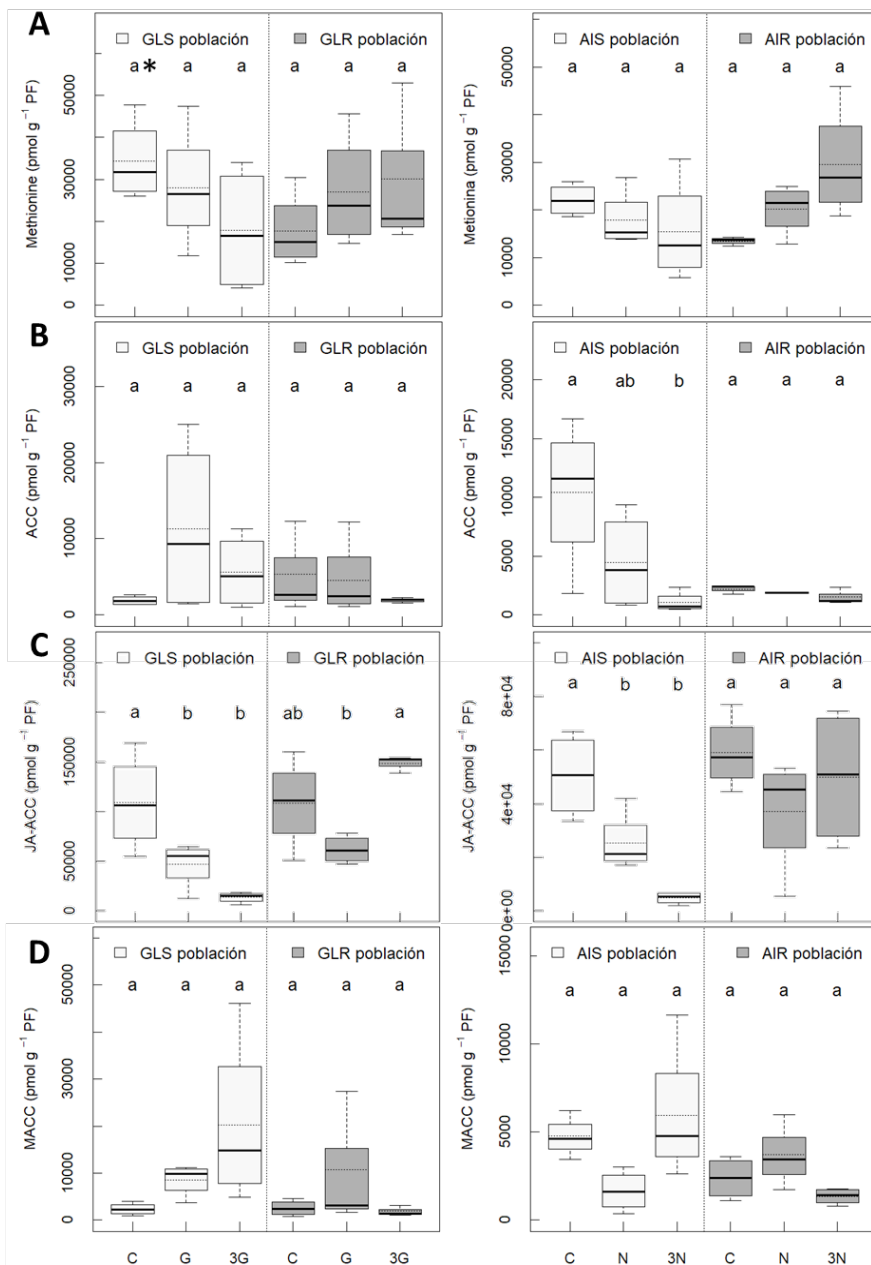


Figura 2 - Contenido en metionina (A), ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC, B), jasmonil-ACC (JA-ACC, C) y malonil-ACC (MACC, D), en poblaciones de *Amaranthus palmeri* sensible a glifosato (GLS), resistente a glifosato (GLR), sensible a inhibidores de ALS (AIS) y resistente a inhibidores de ALS (AIR). Tratamientos: sin tratar (control, C), dosis recomendada de glifosato (G) o nicosulfurón (N), y 3 veces la dosis recomendada de glifosato (3G) o nicosulfurón (3N). Asteriscos indican diferencias significativas en plantas sin tratar de dos poblaciones (t de Student, $p < 0,05$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey, $p < 0,05$).

una disminución global de ACC. En respuesta al nicosulfurón, el contenido en todas las formas de ACC descendió en la población sensible. En ninguna de las poblaciones resistentes (GLS y AIR) tratadas se observaron cambios en los compuestos relacionados con el etileno (Figura 2). Esto parece indicar un incremento del etileno en respuesta a ambos herbicidas en las poblaciones sensibles, y una variación no significativa en las resistentes, lo que, además, sería coherente con estudios realizados en otras especies (Burns *et al.*, 1999; Einhardt *et al.*, 2020).

CONCLUSIONES

En resumen, el glifosato y los inhibidores de la ALS como el nicosulfurón provocan efectos

fisiológicos similares en su modo de acción, pero este estudio realizado en *Amaranthus palmeri* ha mostrado que la respuesta hormonal que inducen es diferente. Mientras que el glifosato induce la síntesis de hormonas supresoras del crecimiento, el nicosulfurón induce las promotoras. En respuesta a ambos herbicidas, por tanto, hay señalización del estrés, pero de forma contrapuesta.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PID 2020 117723-RB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación. Contrato de Clara Jimenez mediante el Programa Investigo (Gobierno de Navarra/UPNA).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Burns, J.K.; Hartmond, U. & Kender, W.J. (1999) - Acetolactate synthase inhibitors increase ethylene production and cause fruit drop in citrus. *HortScience*, vol. 34, n. 5, p. 908-910.
- Eceiza, M.V.; Barco-Antoñanzas, M.; Gil-Monreal, M.; Huybrechts, M.; Zabalza, A.; Cuyppers, A. & Royuela, M. (2023) - Role of oxidative stress in the physiology of sensitive and resistant *Amaranthus palmeri* populations treated with herbicides inhibiting acetolactate synthase. *Frontiers in Plant Science*, vol. 13, art. 1040456. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1040456>
- Eceiza, M.V.; Gil-Monreal, M.; Barco-Antoñanzas, M.; Zabalza, A. & Royuela, M. (2022) - The moderate oxidative stress induced by glyphosate is not detected in *Amaranthus palmeri* plants overexpressing EPSPS. *Journal of Plant Physiology*, vol. 274, art. 153720. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153720>
- Einhardt, A.M.; Ferreira, S.; Oliveira, L.M.; Ribeiro, D.M. & Rodrigues, F.Á. (2020) - Glyphosate and nickel differently affect photosynthesis and ethylene in glyphosate-resistant soybean plants infected by *Phakopsora pachyrhizi*. *Physiologia Plantarum*, vol. 170, n. 4, p. 592-606. <https://doi.org/10.1111/pp1.13195>
- 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*, vol. 64, n. 1, p. 95-106. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04916>
- Lecube, M.L.; Noriega, G.O.; Santa Cruz, D.M.; Tomaro, M.L.; Batlle, A. & Balestrasse, K.B. (2014) - Indole acetic acid is responsible for protection against oxidative stress caused by drought in soybean plants: The role of heme oxygenase induction. *Redox Report*, vol. 19, n. 6, p. 242-250. <https://doi.org/10.1179/1351000214Y.0000000095>
- Majid, I. & Abbas, N. (2018) - Signal transduction in leaf senescence: An overview. *In: Sarwat, M. & Tuteja, N. (Eds.) - Senescence Signalling and Control in Plants*. Academic Press. ISBN 9780128131879, p. 41-59. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813187-9.00004-4>
- Qian, M.; Rosenqvist, E.; Prinsen, E.; Pescheck, F.; Flygare, A.M.; Kalbina, I.; Jansen, M.A.K. & Strid, A. (2021) - Downsizing in plants—UV light induces pronounced morphological changes in the absence of stress. *Plant Physiology*, vol. 187, n. 1, p. 378-395. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab262>
- Torra, J.; Royo-Esnal, A.; Romano, Y.; Osuna, M.D.; León, R.G. & Recasens, J. (2020) - *Amaranthus palmeri* a new invasive weed in Spain with herbicide resistant biotypes. *Agronomy*, vol. 10, n. 7, art. 993. <https://doi.org/10.3390/agronomy10070993>
- Zulet, A.; Gil-Monreal, M.; Villamor, J.G.; Zabalza, A.; van der Hoorn, R.A.L. & Royuela, M. (2013) - Proteolytic pathways induced by herbicides that inhibit amino acid biosynthesis. *PLoS ONE*, vol. 8, n. 9, art. e73847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073847>