

3 A.27 - LA UTILIZACION DE COMPUESTOS NATURALES COMO HERBICIDAS

A. Zabalza , L. Orcaray, M. Igal y M. Royuela
Departamento Ciencias del Medio Natural, Universidad Pública de Navarra,
Campus Arrosadía, E-31006 Pamplona. España.
E-mail: royuela@unavarra.es

Resumen: Los herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados provocan la acumulación de compuestos del metabolismo secundario provenientes de los aminoácidos aromáticos. Las acumulaciones más importantes correspondieron a los ácidos hidroxicinámicos: ferúlico y p-cumárico. Debido a que ambos compuestos ya habían sido descritos como fitotoxinas se planteó comparar los efectos de su adición exógena con los efectos provocados por los herbicidas, como forma de comprobar si estos compuestos pudieran mediar en el efecto tóxico de los herbicidas o incluso mimetizar su acción. Se trataron plantas de guisante con 1 mM de ácido ferúlico o p-cumárico. La cuantificación de la concentración endógena de estos ácidos mostró que ambos fueron absorbidos tras su aplicación exógena hasta niveles iguales o superiores a los acumulados por los tratamientos herbicidas referidos. La aplicación exógena de los dos hidroxicinámicos inhibió el crecimiento de las plantas al igual que hicieron los herbicidas, por lo que pueden considerarse como aleloquímicos. Además, presentan similitudes con el modo de acción de estos herbicidas, ya que también provocaron acumulación de carbohidratos e inducción de la ruta fermentativa etanólica. Estos resultados muestran, por una parte la importancia de estos ácidos hidroxicinámicos como desencadenantes de la toxicidad herbicida, y por otra su potencial como compuestos herbicidas en sí. Los herbicidas basados en compuestos naturales son mucho menos persistentes, aspecto muy importante desde el punto de vista medioambiental.

Palabras clave: ácido ferúlico, ácido p-cumárico, herbicidas, fitotoxinas.

INTRODUCCIÓN

Los herbicidas inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos ramificados, presentan como mecanismo de acción la inhibición de la actividad acetolactato sintasa (ALS). Uno de los efectos fisiológicos descritos para este tipo de inhibidores es la acumulación de ácidos hidroxicinámicos (SHUTTLE *et al.*, 1983, ORCARAY, 2008), pertenecientes al metabolismo secundario. En concreto, se detectó una importante acumulación de ácido ferúlico y ácido p-cumárico. Por otro lado, ambos compuestos habían sido descritos como sustancias fitotóxicas con anterioridad, comprobándose que su aplicación exógena inhibía el crecimiento (VAUGHAN y ORD, 1990).

Todo ello planteó la posibilidad de que la acumulación de ácido ferúlico y p-cumárico podía ser un efecto más del modo de acción de los inhibidores de ALS o estar directamente relacionada con la letalidad provocada por ellos. Para estudiarlo aplicamos exógenamente ambos compuestos, lo que permitiría además, evaluar si eran capaces de mimetizar los efectos causados por los herbicidas inhibidores de ALS.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) crecieron en cultivo hidropónico puro bajo condiciones controladas. Cuando las plantas contaban 12 días de edad los ácidos hidroxicinámicos

(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) se aplicaron a través de la solución nutritiva a una concentración de 1 mM y el imazetapir a 69 μM . Las determinaciones se realizaron justo antes de las aplicaciones de los tratamientos (tiempo 0) y transcurridos 1, 3, 7, 10 y 15 días. Se determinó crecimiento, contenido de ácido ferúlico y p-cumárico por HPLC (BECERRIL *et al.*, 1989), contenido en carbohidratos por electroforesis capilar (ZABALZA *et al.* 2004) y actividades enzimáticas de la ruta fermentativa etanólica espectrofotométricamente (GASTON *et al.*, 2002)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectó acumulación de ácido ferúlico y ácido p-cumárico en raíz tras su aplicación exógena (Figura 1), evidenciándose así que habían sido absorbidos por la planta. En concreto, se alcanzaron niveles endógenos de ambos compuestos que fueron iguales o superiores a los detectados tras el tratamiento con los herbicidas inhibidores de ALS: imazetapir (Figura 1), y clorsulfurón (ORCARAY, 2008).

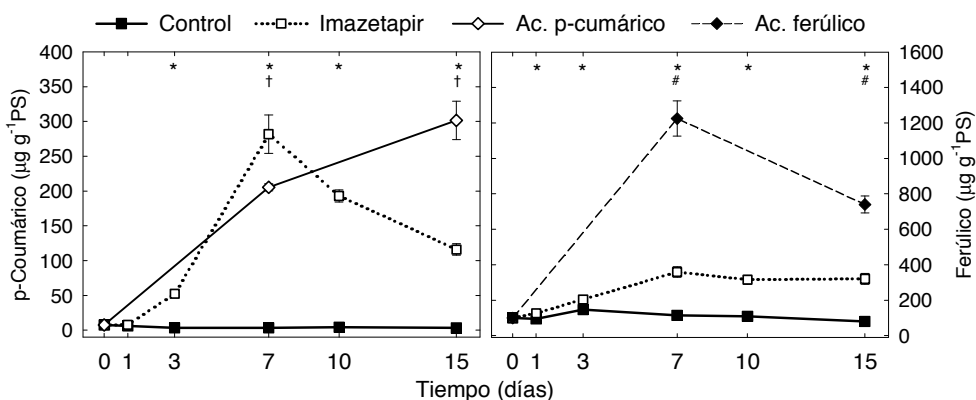


Figura 1. Efecto del herbicida imazetapir, ácido p-cumárico y ácido ferúlico sobre los contenidos de ácidos p-cumárico y ferúlico en raíces de guisante. Valor medio \pm error estándar ($n=5$). “*”, “†” y “#” indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los valores control y el tratamiento de imazetapir, ácido p-cumárico y ferúlico respectivamente.

Los dos tratamientos con hidroxicinámicos provocaron una inhibición del crecimiento similar al imazetapir deteniendo el crecimiento de la raíz desde el primer día de la aplicación. La inhibición en el crecimiento de la parte aérea fue observable a partir del día 10 en todos los casos.

En plantas tratadas con los ácidos hidroxicinámicos se acumularon carbohidratos de manera clara en hojas. Los niveles de carbohidratos solubles aumentaron desde el día 1 de tratamiento, y la concentración de almidón fue significativamente superior al control desde el día 7. Este patrón de acumulación de carbohidratos en hojas se mantiene respecto al descrito para herbicidas inhibidores de ALS en estas mismas plantas (ZABALZA *et al.*, 2004). Las raíces de las plantas tratadas no presentaron grandes modificaciones de su contenido de carbohidratos respecto a las raíces control.

Se evaluaron *in vitro* las actividades piruvato descarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH). La figura 3 muestra cómo ambos ácidos provocaron una activación de ambas enzimas, efecto que ya había sido descrito para los herbicidas inhibidores de ALS (GASTON *et al.*, 2002; ZABALZA *et al.*, 2005).

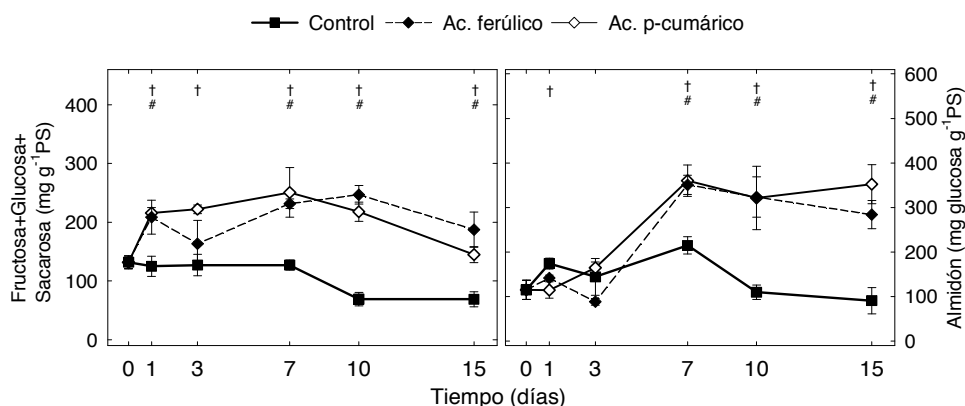


Figura 2. Efecto del ácido p-cumárico y ácido ferúlico en el contenido de carbohidratos de hojas de guisante. Valor medio \pm error estándar ($n=4$). “†” y “#” indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre los valores control y el tratamiento de ácido p-cumárico y ferúlico respectivamente.

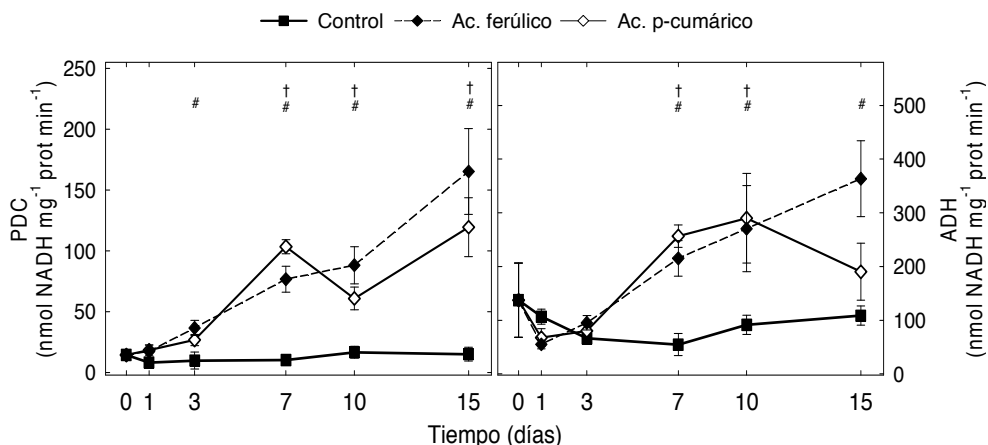


Figura 3. Efecto del ácido p-cumárico y ácido ferúlico sobre las actividades piruvato descarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH) de raíces de guisante. Valor medio \pm error estándar ($n=4$). “†” y “#” indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre los valores control y el tratamiento de ácido p-cumárico y ferúlico respectivamente.

Estas similitudes encontradas entre el efecto de los ácidos ferúlico y p-cumárico y los herbicidas inhibidores de ALS, tanto en el crecimiento como en algunos de los parámetros fisiológicos que más caracterizan la acción de estos herbicidas (acumulación de carbohidratos, actividad fermentativa y acumulación de metabolitos secundarios) plantean que la acumulación de ácido ferúlico y p-cumárico tras el tratamiento herbicida podría estar relacionada con la letalidad de los inhibidores de ALS. Por otra parte, estos resultados evidencian la potencialidad de estos compuestos del propio metabolismo de la planta como posibles herbicidas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL-2007-61134/AGR.

BIBLIOGRAFÍA

- BECERRIL, J.M., DUKE, S.O., LYDON, J. (1989). Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf. *Phytochemistry* 28, 695-699.
- GASTON, S.; ZABALZA, A.; GONZÁLEZ E.M.; ARRESE-IGOR C.; APARICIO-TEJO P.M.; ROYUELA M. (2002). Imazethapyr, an inhibitor of the branched-chain amino acid biosynthesis, induces aerobic fermentation in pea plants. *Physiologia Plantarum* 114, 524-532.
- ORCARAY, L. (2008). Fisiología de la letalidad en plantas inducida por herbicidas y su mimetización con compuestos naturales. Tesis doctoral, Universidad Pública de Navarra.
- SUTTLE, J.C.; SWANSON, H.R.; SCHREINER, D.R. (1983). Effect of chlorsulfuron on phenylpropanoid metabolism in sunflower seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation* 2, 137-149.
- VAUGHAN, D.; ORD, B. (1990). Influence of phenolic acids on morphological changes in roots of *Pisum sativum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 52, 289-299.
- 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* 52, 7601-7606.
- ZABALZA, A., GONZÁLEZ, E.M., 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7486-7493.

Summary: Herbicides inhibiting the biosynthesis of branched-chain amino acids cause accumulation of several secondary compounds derived from aromatic amino acids. Two hydroxycinnamic acids were mainly accumulated: ferulic and p-coumaric. Taking into account that both compounds had already been described as phytotoxins, they were applied exogenously in order to verify if these compounds might mediate in the toxic effects of the herbicides or even they could mimic its action. Pea plants were treated with 1 mM ferulic or p-coumaric acid. By evaluating endogenous concentration of both compounds it was showed that both were absorbed after exogenous application and that they reached internal values equal or greater than those accumulated after herbicide treatment. Exogenous application of both compounds inhibited plant growth, similarly to the herbicide treatments, evidencing their alelochemical effect. In addition, they also caused carbohydrate accumulation and induction of the ethanolic pathway, two effects previously reported in the mode of action of the herbicides inhibiting the biosynthesis of branched-chain amino acids. All these results indicate, on one hand that accumulation of ferulic and p-coumaric acids (plant's metabolites) can trigger the toxic effect of the herbicide treatments, and on the other hand its own ability to mimic the herbicide effect. Herbicides based on natural compounds are much less persistent, a very important aspect from an environmental point of view.

Keywords: ferulic acid, coumaric acid, herbicides, phytotoxins