

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 893 201**

51 Int. Cl.:

A01N 57/20 (2006.01)

A01N 37/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2017** **PCT/GB2017/053082**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2018** **WO18069709**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2017** **E 17787560 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.09.2021** **EP 3525591**

54 Título: **Composiciones herbicidas**

30 Prioridad:

14.10.2016 GB 201617420

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.02.2022

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF DURHAM (100.0%)

Old Shire Hall

Durham DH1 3LE, GB

72 Inventor/es:

GONZÁLEZ-TORRALVA, FIDEL y

CHIVASA, STEPHEN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 893 201 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones herbicidas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones herbicidas que comprenden glifosato o compuestos relacionados junto con un agente adicional diseñado para potenciar los efectos del glifosato o los compuestos relacionados y/o reducir la cantidad de glifosato o los compuestos relacionados que se requieren para el efecto herbicida. Se proporciona también un método para tratar las plantas con una composición herbicida de acuerdo con la presente invención.

Antecedentes de la invención

El glifosato (N-[fosfonometil] glicina) hizo su debut comercial en el mercado de los agroquímicos en 1974 (Waltz, 2010) para usar como un herbicida no selectivo de amplio espectro contra malezas previo a la siembra o para la aplicación dirigida a cultivos (Owen y Zelaya 2005). La introducción en 1996 de cultivos resistentes al glifosato afianzó su dominio del mercado como el herbicida más vendido (Waltz, 2010) y se proyecta que las ventas globales alcancen los 879.000 millones de dólares en 2019 (Transparency Market Research, 2014). Debido a la expiración de la patente del glifosato de Monsanto en 2000, las principales compañías agroquímicas globales están fabricando diversas formulaciones de glifosato, con una salida global registrada de 718,6 kilotoneladas en 2012 (Transparency Market Research, 2014). Sin embargo, el éxito comercial del glifosato está ahora amenazado por la emergencia de malezas resistentes al glifosato (Waltz, 2010; Heap, 2015).

El glifosato es un potente inhibidor de la ruta del shikimato, uniéndose competitivamente e inhibiendo la 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) (EC 2.5.1.19) (Steinrücken y Amrhein, 1980). El fosfoenolpiruvato y el shikimato-3-fosfato se convierten en 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato en una reacción catalizada por EPSPS. La ruta del shikimato es una importante ruta metabólica primaria cuyo producto terminal, el corismato, es el principal metabolito intermedio del punto de ramificación que sirve como precursor de la síntesis de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano, fenilalanina) y diversos metabolitos secundarios, incluyendo quinonas e indoles. La fenilalanina entra en la ruta del fenilpropanoide para la síntesis de metabolitos secundarios adicionales, tales como flavonoides y ligninas. La ruta del shikimato se inicia mediante la reacción de condensación del fosfoenolpiruvato y la eritrosa 4-fosfato, que se derivan de la ruta de la glicolisis y de las pentosas fosfato, respectivamente (Fig. 1). Se sospecha que la privación de los aminoácidos aromáticos es fundamental para la fitotoxicidad del glifosato.

El éxito comercial del glifosato, que había sido espoleado por el uso excesivo y la dependencia excesiva de este único herbicida en aplicaciones agrícolas, ha llevado de manera inevitable al desarrollo de resistencia registrada ahora en 32 especies de malezas (Heap, 2015). Los mecanismos de resistencia conocidos (revisados en Sammons y Gaines, 2014) incluyen la mutación de restos clave en la enzima EPSPS (Kaundum *et al.*, 2011; Ng *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2015), la amplificación del gen EPSPS (Gaines *et al.*, 2010), y la translocación alterada del glifosato (Lorraine-Colwill *et al.*, 2002; Ge *et al.*, 2010). La industria está respondiendo apilando genes de resistencia a múltiples herbicidas en un único cultivo para controlar malezas usando más de un herbicida en el mismo cultivo por temporada (Nature Editorial, 2014). Por ejemplo, Monsanto ha lanzado soja con resistencia a glifosato/dicamba, Dow Agrosciences tiene algodón con resistencia a glifosato/2,4-D, y Bayer tiene algodón con resistencia a glifosato/glufosinato (Waltz, 2010). Por necesidad, también deben múltiples herbicidas utilizarse en aplicaciones no agrícolas, produciendo una erosión final de la dominancia del mercado del glifosato. Sin embargo, además del uso sensible de múltiples herbicidas para frenar la emergencia de las malezas resistentes a herbicidas, una mayor comprensión de cómo los herbicidas trabajan realmente puede proporcionar nuevas oportunidades para contrarrestar esta resistencia.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en estudios llevados a cabo por los inventores en las respuestas moleculares al glifosato. Los datos obtenidos permiten: (i) una reducción de la cantidad de principio activo usado en las formulaciones del glifosato y/o (ii) el control de malezas resistentes al glifosato.

En un primer aspecto se proporciona una composición herbicida o una combinación que comprende glifosato o una sal o sales del mismo adecuadas y al menos un metabolito o metabolitos de la ruta del shikimato o las rutas de las pentosas fosfato y/o de la glicolisis.

De acuerdo con la invención, el uno o más metabolitos de la ruta del shikimato se encuentran antes del punto de acción de la 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintasa (EPSP sintasa) (véase la Figura 1) y es el shikimato 3-fosfato, shikimato, 3-deshidroquinato, 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) procedentes de la ruta del shikimato o el ácido glucónico procedente de la ruta de las pentosas fosfato. En una realización, el metabolito es shikimato 3-fosfato.

Se pueden obtener metabolitos de la ruta del shikimato (o de la ruta anterior) a partir de varias fuentes. Es posible

synetizar los metabolitos químicamente; extraerlos de fuentes vegetales; expresar en exceso los genes y/o la ruta en microorganismos y aislar los metabolitos; y obtener los metabolitos mediante la conversión enzimática de precursores químicos.

- 5 Las composiciones herbicidas de la presente invención se pueden usar para controlar plantas o malezas no deseadas. Las composiciones herbicidas pueden ser selectivas en términos de controlar plantas o malezas no deseadas, aunque sin dañar una planta de cultivo deseada. La planta del cultivo puede ser naturalmente resistente a la composición herbicida o puede estar modificada genéticamente para que sea resistente a la composición herbicida. Las plantas del cultivo transformadas o seleccionadas genéticamente para tolerar el glifosato incluyen aquellas cuyas semillas son comercializadas por Monsanto Company o con licencia de Monsanto Company con la marca comercial Roundup Ready®. Estas incluyen variedades de trigo, césped y maíz. Pioneer y Bayer Crop Science, por ejemplo, han desarrollado otros cultivos resistentes al glifosato.

- 15 El glifosato (N-fosfonometilglicina) es bien conocido en la técnica y es un herbicida ampliamente usado para la postemergencia, el control no selectivo de malezas. La mayoría de herbicidas, incluyendo el glifosato, se aplican en un transportador acuoso, tal como mediante una mezcla para pulverización. Para ser eficaz, la composición herbicida, normalmente como una mezcla para pulverización, debe quedar retenida sobre la superficie de las hojas de maleza; la planta debe absorber el principio activo herbicida; y el herbicida debe translocarse al sitio de la acción.

- 20 El glifosato bloquea competitivamente la ruta del shikimato, uniéndose a la EPSP sintasa, que es común a virtualmente todas las plantas, pero que está ausente en animales. Aunque el glifosato es muy eficaz en la destrucción o el control del crecimiento de plantas no deseadas, la captación (es decir, la absorción) de glifosato por el tejido foliar de la planta y la translocación del glifosato a la totalidad de la planta es relativamente lenta. Los síntomas visuales de que una planta con glifosato se ha tratado pueden no aparecer hasta una semana o más después del tratamiento.

- 25 El glifosato es relativamente insoluble en agua (1,16 % en peso a 25 °C). Por este motivo, se formula normalmente como una sal soluble en agua. La sal de glifosato potásico tiene un peso molecular de 207. Se divulga esta sal, por ejemplo, por Franz en la patente de Estados Unidos n.º 4.405.531, como una de las sales de "metales alcalinos" de glifosato útiles como herbicidas, divulgándose específicamente con potasio como uno de los metales alcalinos, junto con litio, sodio, cesio y rubidio. Además de las sales de "metales alcalinos" de glifosato, otras sales agrícola-mente aceptables incluyen isopropilamina, diamonio, amonio, monoetanolamina, n-propilamina, metilamina, etilamina, hexametilendiamina, dimetilamina o las sales de trimetilsulfonio.

- 30 Se pueden proporcionar formas salinas individuales de glifosato o mezclas de formas salinas de acuerdo con la presente invención. Las formas salinas de glifosato son como se ha identificado anteriormente. Cuando se proporcionan dos o más formas salinas, se deben seleccionar las diversas sales de tal manera que no afecten negativamente a la viscosidad, el punto de turbidez, la falta de cristalización y/u otras propiedades de estabilidad de la composición.

- 40 Las composiciones herbicidas preparadas de acuerdo con la presente invención son muy eficaces como composición herbicida contra varias malezas. Se pueden usar las composiciones de la presente invención tal cual o combinadas con otros componentes que incluyen otros aditivos agrícola-mente aceptables usados comúnmente en los productos agrícolas formulados, tales como agentes antiespumantes, agentes compatibilizantes, agentes secuestrantes, agentes neutralizantes y tampones, inhibidores de la corrosión, colorantes, odorantes, auxiliares de penetración, agentes humectantes, agentes expansores, agentes de control de la deriva, agentes dispersantes, agentes espesantes, depesores del punto de congelación, agentes antimicrobianos, aceite de cultivo, otros componentes biológica y/o agrícola-mente activos y similares. Las composiciones agrícolas concentradas se diluyen normalmente en agua y se aplican a continuación con medios convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica.

- 50 Las formulaciones de la presente invención pueden comprender además adyuvante, tal como un tensioactivo y/o sulfato de amonio. Este puede incluirse directamente en la formulación y/o añadirse antes de la aplicación. Incluso si está presente en la formulación, a menudo se recomiendan un tensioactivo y/o sulfato de amonio adicionales. En la práctica, el tensioactivo y/o el sulfato de amonio y herbicida adicionales se añaden por separado al tanque pulverizador durante la preparación de la mezcla de pulverización.

- 55 Se sabe bien que el sulfato de amonio actúa sinérgicamente sobre el efecto biológico del glifosato. Por ejemplo, la bibliografía de patentes contiene muchos ejemplos de combinaciones de glifosato y sulfato de amonio, y, en la práctica, se añade usualmente sulfato de amonio adicional al diluir el glifosato para el uso. Se puede añadir sulfato de amonio en una cantidad de 4 - 8 kg por 400-500 l de mezcla del tanque

- 60 Los tensioactivos convenientes incluyen tensioactivos catiónicos, tensioactivos aniónicos, tensioactivos no iónicos, tensioactivos iónicos y tensioactivos anfóteros. De acuerdo con la invención, el tensioactivo puede ser cualquier tensioactivo o combinación de dos o más tensioactivos útiles para facilitar la disolución de los compuestos herbicidas comprendidos en la formulación.

- 65 Los ejemplos de algunos tensioactivos preferidos incluyen tensioactivos catiónicos, no iónicos y aniónicos. De estos,

algunos tipos incluso más específicos de tensioactivos preferidos incluyen tensioactivos de alcohol etoxilado no iónicos, lineales o ramificados, tensioactivos aniónicos de ésteres de ácido fosfórico (denominados algunas veces tensioactivos de "ésteres de fosfato") y tensioactivos de aminas de sebo etoxilado catiónicos. Se pueden seleccionar tensioactivos adicionales del grupo que consiste en aminas secundarias o terciarias, sales de amonio cuaternario dialcoxiladas, por ejemplo, sales de amonio cuaternario monoalcoxiladas, sales de amonio cuaternario, éter aminas, óxidos de amina, aminas dialcoxiladas, alcoholes aminados alcoxilados, fosfatos de alquilo alcoxilados y alquilpoliglicósidos. Se divulgan detalles adicionales de los tensioactivos en el documento US20060019828 al que se debe dirigir el lector experto.

Se puede usar un adyuvante como mezcla del tanque, cuando se añade el adyuvante a un tanque pulverizador como producto separado junto con agua y composición herbicida. La cantidad de adyuvante añadida al tanque pulverizador puede ajustarse de forma independiente de la tasa del herbicida teniendo en cuenta, por ejemplo, la dureza del agua, las especies de maleza, el volumen de pulverización y las condiciones ambientales. Como alternativa, el adyuvante puede mezclarse con la composición herbicida para formar una composición completa de herbicida-adyuvante.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para controlar las malezas y/o la vegetación indeseable aplicando una composición herbicida para pulverizar posterior a la emergencia o una mezcla de tanque de acuerdo con la presente invención para malezas y/u otra vegetación indeseada. Se puede aplicar la composición herbicida para pulverizar o la mezcla del tanque a poblaciones de malezas que sean sensibles al glifosato de manera que se pueda requerir menos glifosato, o a poblaciones de malezas que han desarrollado una resistencia al glifosato, de modo que dichas malezas que son resistentes solo al glifosato, se vuelvan sensibles al glifosato o sensibles a concentraciones más bajas de glifosato cuando se aplica en solitario.

Se proporciona también el uso de una mezcla o combinación de glifosato o una sal o sales adecuadas del mismo y un metabolito de la ruta del shikimato, o la ruta anterior como se ha descrito anteriormente en el presente documento, para controlar las malezas y/o la vegetación indeseable.

Normalmente las composiciones, la mezcla y/o las mezclas del tanque de la presente invención son para aplicarse después de la emergencia, es decir, después que las malezas y/o la vegetación indeseable hayan emergido del suelo y las hojas sean visibles.

Una composición de la mezcla del tanque comprende agua como vehículo acuoso, en una cantidad adecuada para la aplicación a una planta y/o superficie del suelo mediante pulverización, más concretamente, en una cantidad adecuada para la administración de composiciones herbicidas a, por ejemplo, malezas, que deben destruirse o controlarse.

Las composiciones herbicidas de la presente invención pueden comprender además uno o más herbicidas adicionales, tales como ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 4-(2,4-diclorofenoxi)butanoico (2,4-DB), dicloroprop, ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético (MCPA), 4-(4-cloro-2-metilfenoxi)butanoico (MCPB), mecoprop, dicamba, picloram, quinclorac, sales o ésteres agrícolamente aceptables de cualquiera de estos herbicidas y mezclas de los mismos.

En otra realización de la presente invención, las composiciones herbicidas de la invención pueden incluir glifosato a 5 g ae./l (gramos de ácido equivalente por litro) a 600 g de glifosato ae./l, preferentemente de 65 a aproximadamente 600, de aproximadamente 75 a aproximadamente 600, de aproximadamente 100 a aproximadamente 600, de aproximadamente 150 a aproximadamente 600, de aproximadamente 200 a aproximadamente 600, de aproximadamente 250 a aproximadamente 600, de glifosato g ae./l.

Normalmente, antes de la administración, la composición herbicida puede estar en una forma concentrada que requiere dilución antes de la aplicación. En forma concentrada, las composiciones herbicidas de la invención pueden incluir glifosato desde aproximadamente 100 a aproximadamente 600, de aproximadamente 150 a aproximadamente 600, de aproximadamente 200 a aproximadamente 600, de aproximadamente 250 a aproximadamente 600, de glifosato g ae./l. Una concentración común de glifosato es 360 g ae./l, pero está disponible también a mayores concentraciones, tales como 450, 480, 500 y 540 g ae./l. Antes del uso, la composición herbicida se puede diluir de manera que el glifosato se puede aplicar en una forma más diluida.

Normalmente, la relación molar de glifosato a los metabolitos de la ruta del shikimato, o a los metabolitos de la ruta de las pentosas fosfato, según se defina, tales como shikimato 3-fosfato es aproximadamente 1:7,5 - 1:100, tales como 1:8 - 1:75, o 1:10 - 1:50.

Cuando está presente un herbicida adicional, la relación en peso de glifosato a herbicida adicional es de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 200:1, de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 200:1; más preferentemente, de aproximadamente 40:1 a aproximadamente 100:1; particularmente, de aproximadamente 50:1 a aproximadamente 100:1.

La selección de las tasas de aplicación que son herbicidamente eficaces para una composición de la invención están comprendidas en los conocimientos del técnico agrícola normalmente experto. Los expertos en la técnica reconocerán que las condiciones de las plantas individuales, las condiciones climáticas y de crecimiento, así como los principios

activos específicos y su relación en peso en la composición, alteran el grado de eficacia herbicida conseguido en la práctica de la presente invención. Se pueden determinar tasas de aplicación típicas de las composiciones herbicidas de la presente invención. Un experto en la técnica entenderá que cuando el crecimiento de la maleza es intenso o denso o cuando las malezas están creciendo en un área sin alterar, puede ser necesaria una tasa de aplicación mayor para conseguir un control de la maleza aceptable. Además, para malezas que son difíciles de controlar, puede ser necesaria una tasa de aplicación mayor para un control adecuado de las malezas.

Los presentes inventores han observado que la inclusión de un metabolito de la ruta del shikimato, tal como el ácido shikímico, permite una reducción en la cantidad de glifosato que puede requerirse para ser eficaz. Dependiendo de las malezas que se van a tratar, puede ser posible emplear al menos 10 %, 15 %, 25 %, 50 %, 60 % o más, menos glifosato de lo que se necesitaría para controlar las malezas en ausencia de los metabolitos de la ruta del shikimato (o la ruta anterior), tales como ácido shikímico (o shikimato en su forma aniónica) o shikimato-3-fosfato

Una composición para el tratamiento de plantas se diluye de forma preferente lo suficiente para pulverizarse fácilmente usando equipo de pulverización agrícola convencional. Las cantidades de agua se expresan usualmente en términos de "volumen de pulverización", es decir, el volumen de solución para pulverización (que es principalmente agua, que constituye el resto después de tener en cuenta las composiciones herbicidas y otros aditivos opcionales que se describen en el presente documento) que se va a aplicar a un área de suelo unidad. El volumen de pulverización se puede expresar en cualquier unidad adecuada tal como litros/hectárea (l/ha) o galones/acre. Más habitualmente, los volúmenes de pulverización útiles para las composiciones de mezcla del tanque de la presente invención se seleccionarán en un intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 1.000 l/ha, por ejemplo, de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 l/ha.

De forma deseable, las composiciones herbicidas de la presente invención son estables en almacenamiento. Por "estable en almacenamiento", en el contexto de la presente invención, se entiende que no presenta separación de fases al exponerse a temperaturas de hasta aproximadamente 50 °C, y preferentemente no forman cristales de glifosato o una sal del mismo tras exposición a una temperatura de aproximadamente 0 °C, durante un periodo de hasta aproximadamente 7 días (es decir, la composición debe tener un punto de cristalización de 0 °C o inferior). Para los concentrados en solución acuosa, la estabilidad en almacenamiento a alta temperatura se indica a menudo por un punto de turbidez de aproximadamente 50 °C o más. El punto de turbidez de una composición está normalmente determinado por el calentamiento de la composición hasta que la solución se enturbia y dejando a continuación que la composición se enfríe, con agitación, aunque su temperatura se vigile continuamente. Una lectura de temperatura tomada cuando la solución se aclara es una medida del punto de turbidez. Un punto de turbidez de 50 °C o más se considera normalmente aceptable para la mayoría de fines comerciales para una formulación de glifosato SL. Idealmente el punto de turbidez debe ser de 60 °C o más, y la composición debe soportar temperaturas tan bajas como aproximadamente -10 °C, preferentemente tan bajas como aproximadamente -20 °C, más preferentemente tan bajas como aproximadamente -30 °C, durante hasta aproximadamente 7 días sin separación de fases (es decir, sin separación de agua congelada o tensioactivo insoluble u otros componentes de la composición) y sin crecimiento cristalino (incluso en presencia de cristales de siembra de la sal de glifosato).

Descripción detallada

La presente invención se describirá ahora adicionalmente a modo de ejemplo con referencia a las figuras que muestran:

La Figura 1 muestra una representación esquemática de la ruta del shikimato de las plantas.

La ruta del shikimato atrae metabolitos de las rutas de la glicolisis y de las pentosas fosfato, dando como resultado la producción de corismato, que pasa a la biosíntesis de aminoácidos y metabolitos secundarios.

La Figura 2 muestra la toxicidad del glifosato y la acumulación del shikimato requiere luz.

Discos foliares de *Conyza sumatrensis* se hicieron flotar en agua (que sirve como control) o concentraciones indicadas de glifosato. Los discos se incubaron en condiciones de luz u oscuridad. (A) Aspecto de discos foliares del control y tratados con glifosato 100 µM 14 días después del tratamiento. (B) Acumulación de ácido shikímico en los discos foliares una semana después del tratamiento. Las barras representan la media ± SD ($n = 3$). (C) Una concentración superior de glifosato (1 mM) sigue necesitando luz para la fitotoxicidad. Se tomó la fotografía 3 días después del tratamiento.

La Figura 3 muestra la respuesta de los biotipos de *C. sumatrensis* resistentes y susceptibles al glifosato.

Los discos foliares procedentes de biotipos de *Conyza sumatrensis* resistentes y susceptibles al glifosato se hicieron flotar en las soluciones indicadas. (A) Se fotografió el aspecto de los discos 14 días después del tratamiento. (B) Se midió la acumulación de ácido shikímico en los discos una semana después del tratamiento. Las barras representan la media ± SD ($n = 3$). El glifosato activa la acumulación del shikimato y la muerte celular en los biotipos susceptibles pero no resistentes.

La Figura 4 muestra que la adición del shikimato rompe la resistencia al glifosato.

(A) Los discos foliares de plantas de *C. sumatrensis* resistentes y susceptibles al glifosato se trataron con glifosato

100 μM solo o combinado con ácido shikímico 5 mM. Se tomó la fotografía 14 días después. Se eliminó la resistencia al glifosato mediante la adición de ácido shikímico. (B) Se tomó la fotografía de los discos foliares 7 días después del tratamiento con las combinaciones indicadas de compuestos. Más (+) denota la presencia de un compuesto; menos (-) denota la ausencia de un compuesto en el tratamiento. Particularmente, por sí solo, el ácido shikímico no era fitotóxico, pero activó la muerte celular en presencia de glifosato.

La Figura 5 muestra la luz que estimula la acumulación de ácido shikímico inducida por glifosato.

Discos foliares de *Arabidopsis* se hicieron flotar en glifosato 25 μM y se incubaron en condiciones de luz u oscuridad, se recogieron en los puntos temporales adecuados para la determinación del contenido de ácido shikímico. Las barras representan la media $\pm$ SD ($n = 3$).

La Figura 6 muestra el análisis mediante PCR en tiempo real de los genes de *Arabidopsis* seleccionados.

Se hicieron flotar los discos foliares en glifosato 50 μM en condiciones de luz u oscuridad y se recogieron las muestras para determinar el contenido de ARN en los tiempos indicados. Las barras representan la media $\pm$ SD ($n = 3$). Se proporcionan las abreviaturas de los genes en la Tabla 1.

La Figura 7 muestra que el shikimato-3-fosfato potencia la toxicidad del glifosato en *Arabidopsis*.

(A) Aparición de síntomas cloróticos en los tejidos meristemáticos apicales 4 días después de la exposición a glifosato. El meristemo eventualmente muere. (B) Respuesta de plantas expuestas a concentraciones crecientes de glifosato. (C) Respuesta de la planta a shikimato-3-fosfato mezclado con las cantidades indicadas de glifosato. Se tomaron fotografías en (B) y (C) 3 semanas después de la pulverización. Gli = glifosato a las tasas indicadas; S3P = shikimato-3-fosfato 500 μM .

La Figura 8 desvela que el ácido glucónico rompe la resistencia al glifosato en *Conyza sumatrensis*.

Se hicieron germinar plantas de *C. sumatrensis* resistentes (GR) y susceptibles al glifosato (GS) en suelo y se transfirieron a soluciones de glifosato 100 μM con o sin ácido glucónico 5 mM. Diez días después de la exposición solo a glifosato, las plantas GS estaban atrofiadas y cloróticas, mientras que las plantas GR equivalentes crecieron con hojas verdes y sanas expandidas. Cuando se añadió ácido glucónico al glifosato, se retrasó también el crecimiento de las plantas GR y los síntomas de clorosis fueron muy distintos. Esto indica que el ácido glucónico vuelve las plantas GR sensibles al glifosato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal - Se usó *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 en todos los experimentos que utilizaron *Arabidopsis*. Para los experimentos de pulverización, se sembraron muchas semillas en abono orgánico dentro de macetas con un área de la base de 36 m^2 . Las plantas se trataron con las formulaciones herbicidas pulverizándolas cuando tuvieron 2-3 semanas de edad. Para obtener discos foliares, se sembraron plantas individuales en macetas individuales y se hicieron crecer durante 4 semanas. Se extrajeron discos foliares de 1 cm de diámetro a partir de hojas completamente extendidas. Se obtuvieron biotipos de *Conyza sumatrensis* [(Retz.) E. Walker] resistentes y susceptibles a glifosato de un olivar en Italia. Para los experimentos de pulverización, se sembraron muchas plantas en abono orgánico dentro de macetas con un área de la base de 81 cm^2 . Se trataron las plantas mediante pulverización a las 2 semanas de la siembra. Para los experimentos con discos foliares, se sembraron plantas individuales en macetas individuales y se hicieron crecer durante 8 semanas antes de extraer los discos foliares de 1 cm de diámetro a partir de hojas completamente expandidas. Se hicieron crecer todas las plantas en un fotoperiodo de 16 h (-200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a 22 $^{\circ}\text{C}$.

Productos químicos - Se adquirieron ácido shikímico y glifosato puro de Sigma-Aldrich (Dorset, Reino Unido). Estos se usaron para preparar disoluciones madre en agua que se ajustaron a pH 5,5 y se usaron para el tratamiento de los discos foliares. Se adquirió sal trisódica de shikimato-3-fosfato de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas). Gallup® 360 (Barclay Chemicals Manufacturing Ltd, Dublín, Irlanda), una formulación de 360 g/l de glifosato, se usó para tratamientos de pulverización tras diluir a la tasa deseada.

Tratamientos - Se extrajeron discos foliares de 1 cm de diámetro de plantas y se hicieron flotar en soluciones de 10 ml en el interior de placas Petri. Se usaron un mínimo de 5 discos replicados por tratamiento de los que surgieron 5 plantas independientes. Para la incubación en la oscuridad, las placas Petri se envolvieron en una hoja de aluminio para excluir la luz. Se recogieron discos foliares en los puntos temporales indicados en las leyendas de las Figuras para fotografiar o para el análisis del ácido shikímico. Para los tratamientos de pulverización, se formuló glifosato en 3 ml con suficiente Gallup® para conseguir la tasa deseada en un área superficial de 36 cm^2 o en macetas de 81 cm^2 . Se añadió un activador-G™ comercial potenciador de herbicida (Agrigem Ltd., Market Rasen, Reino Unido) como adyuvante para pulverizar a una tasa final de 1 l/ha. Se añadió shikimato-3-fosfato a una concentración final de 500 μM en los 3 ml. Se pulverizaron las plantas del control con agua que contenía solo activador-G. Se tomaron fotografías de las plantas pulverizadas y los puntos temporales indicados en las leyendas de las Figuras.

Análisis del ácido shikímico - Se secaron los discos foliares que flotaban en soluciones de tratamiento, añadidos a los tubos de microcentrifuga que contenían 125 μl de HCl 0,25 N antes de una congelación instantánea de nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 $^{\circ}\text{C}$. Se descongelaron las muestras a temperatura ambiente, se sometieron a

vortización durante 5 min, y a continuación se incubaron a 60 °C durante 15 min. Se retiraron alícuotas de 25 µl y se mezclaron con 100 µl de ácido periódico al 0,25 % (p/v)/m-peryodato al 0,25 % en tubos de microcentrifuga frescos. Tras una incubación de 30 min a 37 °C, se añadieron 100 µl de NaOH 0,6 N /Na₂SO₃ 0,22 M y se constituyó el volumen hasta 1 ml con agua destilada. Se determinó el ácido shikímico en las muestras con mediciones espectrofotométricas a 382 nm frente a un blanco solo de reactivo y usando una curva de calibración de patrones de ácido shikímico. Se calculó el ácido shikímico que se acumulaba en respuesta al tratamiento con glifosato como la diferencia entre la lectura de los discos foliares del control tratados de forma simulada y de los discos tratados con glifosato. Se expresaron los valores como µg/ml de ácido shikímico.

Análisis de la expresión génica - Se extrajo el ARN de los tejidos foliares usando el kit Spectrum Plant Total RNA (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada muestra era una combinación de cinco discos foliares de 1 cm de diámetro de los que surgieron 5 plantas independientes. Se llevó a cabo la primera síntesis de una hebra de ADN usando 4 µg de ARN total y oligod(T) usando el sistema de transcripción inversa GoScript (Southampton, Reino Unido) de Promega. Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real usando el kit reactivo SensiFast (Bioline, Londres, Reino Unido) en un Rotorgene-Q (Qiagen, Crawley, Reino Unido). Cada reacción de 20 µl contenía 10 µl de reactivo SensiFast, 5 µl de plantilla de ADNc que se habían diluido 1:8, y 8 pmoles de cada cebador (cebadores directo e inverso). Las condiciones de ciclación utilizadas fueron las siguientes: desnaturalización a 95 °C durante 2 min seguida por 40 ciclos de 95 °C durante 10 s, hibridación a 56 °C durante 15 s, y extensión a 72 °C durante 25 s. Se llevó a cabo el análisis de los datos REST2009 (Qiagen, Crawley, Reino Unido) usando *ACTIN2* (At3g18780) y *EIF4* (At3g13920) como genes de control de referencia. En la Tabla 2 se proporcionan los cebadores usados para el análisis. Se analizaron muestras por triplicado, por tratamiento y punto temporal, para calcular la media y la desviación estándar.

Tabla 1. Secuencias de cebadores usadas para el análisis de la PCR cuantitativa. Nota - los nombres abreviados corresponden a nombres de los genes proporcionados en la Tabla 2.

AGI	Nombre del gen	Cebador directo	Cebador inverso
At3g18780	<i>ACTIN2</i>	GTGGTCGTACAACCGGTATTG	TCACGTCCAGCAAGGTCAAG
At3g 13920	<i>ELF4A</i>	ATGAGAGGATGCTCTGCCTTCG	GCAGAGCAAACACAGCAACAG
At1g2241 0	<i>DAHPS</i>	ACCACCGTCAACCAAACCTTC	TGAAGCAGCTGGTGTITTTTG
At4g39980	<i>DAHPS</i>	TCCAGAGTCAGAGAAAATCTG	GCTTGGACGGTGAGAAAGAT
At4g33510	<i>DAHPS</i>	GGAGTCTAGAGAACAAGAA	CAAGCTCATTTAACTTGGAAC
At5g66120	<i>DHQS</i>	GCCTTTATTGCTCCACCAAC	CCTGGAAGAGTCGTGGAAG
At2g21940	<i>SK1</i>	TTTTTGTGTTGGAAGCTTGAG	TTTTCAAAATTGACAAGATCG
At4g39540	<i>SK2</i>	CTCCATTTGATGAAGAACAACAG	CGCATTCACGAGGAACTGTTC
At3g26900	<i>SKL1</i>	GAGATCTTCTCTGCGTCTGCTTCT	TTGCAGAGAGTAGTTCGAGCT
At2g35500	<i>SKL2</i>	CTTCTGGTTTGGCTATAATCTTCAAC	ATCCACTGAAAACGCGAGGA
At2g16790	<i>GntK</i>	TCCTGATTACAAACCGGGAA	CTTCCTCGGAAGCTCTCTTCT
At2g45300	<i>EPSPS</i>	TGATAACTCCGCCCAAAAAG	CAGCACAAGCTGCAAGAGAG
At1g48860	<i>EPSPS</i>	GTGCCTCGGATGAGAGAGAG	TTAGCGTTGACACGAACAGG
At1g48850	<i>CS</i>	TGGTGGCTCTAGTTCTTGTTG	GGCTGCTCTATCTGGAGAGG

Mientras estudiaban la muerte celular programada, los inventores observaron que la luz era un factor fundamental en la activación de la muerte celular de la planta (Chivasa *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2014). Los inventores se preguntaron si la privación de luz podría bloquear también la toxicidad del glifosato. Para investigar esto, los inventores usaron un ensayo *in vitro* anteriormente publicado (Teaster y Hoagland, 2013) en que los discos foliares se hicieron flotar sobre soluciones de glifosato de concentración deseada. Los inventores encontraron que los tejidos incubados en oscuridad completa estaban protegidos de los efectos fitotóxicos del glifosato (Fig. 2A). Este resultado demostró que se requiere luz para la activación de la muerte celular tras la exposición a glifosato. Cuando los inventores usaron concentraciones mucho mayores de glifosato a las usadas normalmente para experimentos similares, los inventores descubrieron que la incubación suprimía los efectos fitotóxicos (Fig. 2C), demostrando que la luz es un importante factor que controla las respuestas de las plantas al glifosato.

La inhibición de EPSPS agota el combinado de aminoácidos aromáticos y la aplicación del glifosato es atendida por un combinado de shikimato (Amrhein *et al.*, 1980; Herman, 1995). Por consiguiente, un aumento de ácido shikímico tras la aplicación del glifosato se usa de forma rutinaria como marcador bioquímico para la sensibilidad del glifosato, aunque la supresión de la respuesta del ácido shikímico indica resistencia al glifosato (por ejemplo, Kaundun *et al.*, 2014). Los inventores midieron el nivel de acumulación de ácido shikímico en los tejidos foliares tratados con glifosato antes de la muerte celular. Como se esperaba, se produjo un aumento masivo de concentración de ácido shikímico

en tejidos incubados en el ciclo de luz-oscuridad (Fig. 2B). Sin embargo, la incubación en oscuridad continua suprimió la acumulación de ácido shikímico (Fig. 2B) lo que se correlaciona con la ausencia de muerte celular (Fig. 2A, C). La supresión de la acumulación de ácido shikímico inducida por glifosato en incubación en oscuridad se ha notificado anteriormente en numerosas especies de plantas (Amrhein *et al.*, 1980; Tokhver y Pal'm, 1986; Shaner *et al.*, 2005).

Los resultados de acumulación de ácido shikímico pueden explicarse por al menos dos posibilidades; (i) que el glifosato en la oscuridad no consigue bloquear la ruta del shikimato o (ii) que el flujo a través de la ruta de shikimato es mucho menor en la oscuridad que en la luz. Puesto que el glifosato es un sustrato (fosfoenolpiruvato) mimético y un inhibidor competitivo de EPSPS (Boocock y Coggins, 1983), es impensable la existencia de una o varias modificaciones posteriores a la traducción en EPSPS que reduzcan su afinidad por el glifosato pero manteniendo la afinidad por el sustrato. Esto hace que el primer punto sea muy improbable. Sin embargo, el apagado de la ruta del shikimato en la oscuridad es una explicación más probable por al menos tres motivos. En primer lugar, numerosos genes de la ruta del shikimato se expresan de forma diferencial entre la oscuridad y la luz (Henstrand *et al.*, 1992; Reinbothe *et al.*, 1994) y hay evidencias de que la luz también estimula la actividad enzimática (Weaver y Herrmann, 1994). Por consiguiente, la enzima que cataliza la etapa que compromete la ruta del shikimato (3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato sintasa) se estimula con luz a través del sistema ferredoxina/tiorredoxina de los cloroplastos (Entus *et al.*, 2002). En segundo lugar, también hay evidencias que sugieren un flujo reducido a través de la ruta del shikimato en la oscuridad, en comparación con el flujo a través de la ruta con luz. La fenilalanina se sintetiza a partir de corismato, el metabolito en el cual se ramifica la ruta del shikimato. La inhibición de la fenilalanina amonio liasa (PAL), que cataliza la conversión de fenilalanina en ácido cinámico, da como resultado la acumulación de fenilalanina - algo parecido al flujo de la ruta del shikimato. La inhibición de PAL en trigo sarraceno usando ácido L- α -aminooxi- β -fenilpropiónico se consigue mediante una acumulación de fenilalanina tres veces mayor en la luz que en la oscuridad (Holländer *et al.*, 1979). En tercer lugar, un estudio anterior demostró que la luz estimula directamente la producción de ácido shikímico (Amrhein *et al.*, 1980). Por lo tanto, el flujo reducido de la ruta del shikimato en la oscuridad representa, con mayor probabilidad, la baja acumulación de ácido shikímico en los tejidos tratados con glifosato incubados en la oscuridad.

Puesto que no se produce muerte del tejido en respuesta al glifosato en condiciones de oscuridad, los inventores proponen que la muerte celular requiera factores dependientes de la luz activados por glifosato. Confirmando esta hipótesis, un estudio reciente ha desvelado que los mutantes de *Arabidopsis* que carecen de una copia funcional del receptor rojo mayor y el receptor rojo claro de PHYB son resistentes al glifosato (Sharkhuu *et al.*, 2014). De este modo, la alteración de la percepción de la luz y la señalización pueden bloquear la toxicidad del glifosato. En malezas, el ácido shikímico y el shikimato-3-fosfato son los metabolitos principales que se acumulan en los biotipos susceptibles a glifosato, pero están suprimidos en gran medida en los biotipos resistentes al glifosato. La identificación de los metabolitos que se acumulan en niveles desproporcionadamente elevados a la luz que en la oscuridad después del tratamiento con glifosato podría proporcionar pistas útiles necesarias para superar la resistencia al glifosato en malezas. En primer lugar, los inventores decidieron investigar si el ácido shikímico podría tener un papel fundamental en la modulación de la toxicidad inducida por glifosato.

Los inventores obtuvieron biotipos de *Conyza sumatrensis* susceptibles y resistentes al glifosato de una plantación de olivos del sur de Italia. La respuesta al glifosato de estos biotipos puede demostrarse *in vitro* para concentraciones de glifosato en el intervalo de 25-200 μ M (Fig. 3A). Como se esperaba, el biotipo susceptible acumuló niveles significativamente más elevados de ácido shikímico que el biotipo resistente (Fig. 3B). Esto demuestra que en el ensayo *in vitro* utilizado en este estudio refleja lo que ocurre en condiciones de campo. En un plazo de 3 días de exposición al glifosato, la concentración máxima de ácido shikímico acumulada en *C. sumatrensis* susceptible estaba en el intervalo de 10-15 mM. Un estudio anterior estimó que el ácido shikímico celular alcanzaba 20-23 mM en células de *Galium mollugo* tratadas con glifosato (Amrhein *et al.*, 1980). De este modo, se podrían usar concentraciones comprendidas en este intervalo para investigar la posibilidad de utilizar ácido shikímico exógeno para controlar las malezas resistentes a glifosato.

Los inventores trataron *C. sumatrensis* resistente y susceptible con ácido shikímico premezclado con glifosato. Mientras que glifosato 100 μ M por sí mismo no afecta a la viabilidad del biotipo resistente, la adición de ácido shikímico 5 mM al glifosato eliminó drásticamente la resistencia al herbicida (Fig. 4A). Cuando los discos foliares procedentes del biotipo susceptible se flotaron en glifosato, se produce un inicio muy gradual de la muerte celular, precedida por clorosis y posterior pardeamiento de los tejidos, que se ve con facilidad 10-14 días después. Sin embargo, los discos del biotipo resistente tratados con glifosato + ácido shikímico presentaron una extensa muerte celular en un plazo de 5 días de tratamiento. Esto muestra claramente que la incorporación de ácido shikímico como aditivo a las formulaciones de glifosato sortea el mecanismo genético que ha evolucionado en la maleza. Es importante destacar que, el ácido shikímico por sí solo no produce fitotoxicidad ninguna, incluso cuando aumenta hasta 15 mM, la concentración fisiológica que los inventores descubrieron que se acumulaba en el biotipo susceptible tras la exposición a glifosato. Se produce un efecto dependiente de la dosis de ácido shikímico, permitiendo concentraciones en el intervalo de 1-5 mM anular la resistencia al glifosato en un plazo de 7 días de la aplicación y sin que concentraciones menores puedan hacerlo (Fig. 4B). Estos resultados demuestran que los intermedios de la ruta del shikimato (al menos, el ácido shikímico) se puede usar como opción viable para la eliminación de la resistencia al glifosato en malezas.

¿Cómo potencia el ácido shikímico la fitotoxicidad del glifosato y cuáles son las implicaciones? El ácido shikímico es un metabolito intermedio de la ruta del shikimato, que proporciona precursores de las principales rutas metabólicas

secundarias. Cuando el glifosato inhibe EPSPS, el ácido shikímico puede seguirse convirtiendo en shikimato-3-fosfato. Curiosamente, se acumula más cantidad de ácido shikímico que de shikimato-3-fosfato en los tejidos tratados con glifosato y se ha propuesto que esto es un reflejo del equilibrio de reacción, desfavorable para la acumulación de shikimato-3-fosfato (Amrhein *et al.*, 1980). Investigaciones adicionales sobre esta intrigante observación podrían proporcionar pistas importantes sobre cómo el glifosato produce fitotoxicidad. Por lo tanto, los investigadores exploraron esto en Arabidopsis y estudiaron la respuesta de todos sus genes para las enzimas de la ruta del shikimato. Se identificaron un total de 13 genes en la ruta del shikimato en el genoma de Arabidopsis (Tabla 1).

Tabla 2. Posibles genes de la ruta del shikimato en Arabidopsis identificados usando búsquedas BLAST

Enzima	Genes	ID del gen
3-Desoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato sintasa (DAHPS)	3	At1g22410 At4g39980 At4g33510
3-Deshidroquinato sintasa (DHQS)	1	At5g66120
3-Deshidroquinato deshidratasa/shikimato deshidrogenasa (DHQ-SDH)	1	At3g06350
Shikimato cinasa (SK)	5	At2g21940 At4g39540 At3g26900 At2g35500 At2g16790
5-Enoilpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS)	2	At2g45300 At1g48860
Corismato sintasa (CS)	1	At1g48850

Discos foliares de Arabidopsis se hicieron flotar en soluciones de glifosato 25 μ M y se incubaron a la luz o en la oscuridad total. Se tomaron muestras en diferentes intervalos en un plazo de 72 h de tratamiento para cuantificar el ácido shikímico y el análisis de la expresión génica usando PCR cuantitativa en tiempo real. Se produjo una acumulación significativa de ácido shikímico en respuesta al glifosato cuando los tejidos de la planta se incubaron con luz (Fig. 5). La incubación en la oscuridad suprimió la acumulación de ácido shikímico (Fig. 5). A la luz, el glifosato indujo cambios significativos en la expresión de los genes que codifican las enzimas de la etapa que compromete la ruta metabólica del shikimato (DAHPS), la shikimato cinasa (SK), la proteína diana del glifosato 5-enoilpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) y la corismato sintasa (CS). Los tres genes DAPS se regularon diferencialmente, solamente uno de los cinco genes putativos SK respondieron al glifosato, ambos genes de EPSPS respondieron y los genes de la corismato sintasa (CS) también respondieron (Fig. 6). La regulación en exceso de los componentes de la ruta metabólica del shikimato desencadenada por el bloqueo del flujo con glifosato es una respuesta metabólica típica.

Sin embargo, los inventores se sorprendieron de que el mayor cambio en la expresión génica se produjera en el posible gen de la shikimato cinasa (At2g16790), que fue de más de 30 veces, mientras que el resto de los genes estuvieron por debajo de 6 veces (Fig. 6). Lo que es más sorprendente es que, aunque la incubación en la oscuridad suprimió la estimulación inducida por glifosato de otros genes, At2g16790 también se estimulaba en la oscuridad (Fig. 6). Esto sugiere que este gen no se estimula por una acumulación de los intermedios de la ruta del shikimato, sino que, más probablemente, por la presencia del glifosato. El hecho de que At2g16790 sea el gen más sensible pero que la acumulación de shikimato-3-fosfato no sobrepase el ácido shikímico es intrigante. Aunque las búsquedas BLAST identificaron este gen por tener una elevada homología con las shikimato cinasas de Arabidopsis, este resultado indica que es posible que la proteína no tenga actividad shikimato cinasa. De los cinco genes "SK" de Arabidopsis que identificaron los inventores, las proteínas recombinantes de dos genes (At2g2140 y At4g39540) tienen actividad shikimato cinasa comprobada experimentalmente, sin actividad enzimática detectable en proteínas recombinantes derivadas de los otros dos genes (At3g26900 y At2g35500) (Fucile *et al.*, 2008). Estas dos últimas se han denominado AtSK LIKE1 (AtSKL1) y AtSKL2, respectivamente. Aunque las proteínas AtSK1, AtSK2, AtSKL1 y AtSKL2 tienen una secuencia dirigida a cloroplastos, At2g16790 no tiene un péptido de direccionamiento a cloroplasto distintivo, y es probable que tenga una ubicación celular diferente, aunque esto requerirá la verificación experimental.

Los restos de aminoácidos de las enzimas shikimato cinasa implicadas en la unión al shikimato, ATP o análogos de ATP y Mg^{2+} se han identificado y todos ellos están conservados en las secuencias de AtSK1 y AtSK2 (Fucile *et al.*, 2008). En la secuencia de la proteína At2g16790, 11 de 16 de estos restos están conservados, con todo el bucle P de unión al ATP intacto, así como los residuos de unión a iones Mg^{2+} . Algunos de los restos de unión a shikimato faltan, especialmente la secuencia consenso RPLL conservada (Gu *et al.*, 2002; Leippe *et al.*, 2003) para la cual se ha propuesto que arginina tiene un papel fundamental en la transferencia de fosfato desde el ATP al shikimato (Cheng *et al.*, 2005). Por lo tanto, At2g16790 potencialmente se une al ATP, Mg^{2+} y al shikimato, pero con mayor probabilidad no tiene actividad shikimato cinasa. De hecho, At2g16790 se ha clasificado como una gluconato cinasa (GntK; EC 2.7.1.12), que funciona en la ruta de la pentosas fosfato (Fucile *et al.*, 2008). Eritrosa-4-fosfato, uno de los dos sustratos

de la primera ruta metabólica del shikimato, procede de la ruta de las pentosas fosfato. La activación de este gen tras la exposición a glifosato en condiciones tanto de luz como de oscuridad destaca la posibilidad de que los intermedios de la ruta metabólica de la pentosa fosfato también se pudieran acumular en presencia de glifosato y posiblemente se deriven para producir metabolitos aún no caracterizados que pueden representar la toxicidad del glifosato. Esto supone un respaldo adicional para la estrategia de enriquecer las formulaciones de glifosato con metabolitos intermedios adecuados cadena arriba como forma de eliminar la resistencia al glifosato.

A continuación los inventores dirigieron su atención al inexplicable retraso de la conversión del shikimato a shikimato-3-fosfato durante la exposición a glifosato. Los inventores proponen la hipótesis de que shikimato-3-fosfato es un componente fundamental necesario para que el glifosato sea fitotóxico y que las plantas susceptibles a glifosato intenten bloquear su formación para evitar su destrucción. Los inventores pulverizaron plantas de *Arabidopsis* de 2 semanas de edad con una formulación de glifosato a diferentes tasas, con o sin shikimato-3-fosfato como aditivo. La aplicación foliar de glifosato mediante pulverización produce clorosis y, a continuación, muerte celular de los meristemas apicales. En un plazo de tres días de la aplicación, las nuevas hojas emergidas aparecen de color amarillo, y esto se extiende a las hojas más viejas, dependiendo de la cantidad de glifosato aplicado (Fig. 7A). Esto detiene inmediatamente el crecimiento de la planta, aunque las hojas bajas mucho más viejas pueden seguir verdes algún tiempo antes de que toda la planta muera. Las tasas del glifosato (18-90 g/ha) seleccionadas van desde las concentraciones que no alteran el crecimiento de las plantas hasta concentraciones que son fitotóxicas. El glifosato a 18 g/ha no mostró efectos sobre el crecimiento de las plantas, mientras que 36 g/ha tuvieron efectos muy modestos sobre *Arabidopsis* (Fig. 7B). Sin embargo, la inclusión de shikimato-3-fosfato en estas tasas de glifosato transformó las formulaciones a un cóctel herbicida letal que detuvo el crecimiento de *Arabidopsis* (Fig. 7C). Por sí mismo, el shikimato-3-fosfato no tiene ningún efecto adverso sobre *Arabidopsis* (Fig. 7C). Esto demuestra claramente que la potencia del glifosato se puede potenciar en gran medida por el shikimato-3-fosfato.

Puesto que el gen de la ruta metabólica de las pentosas fosfato *GntK* es sensible al glifosato, los inventores estudiaron si la ruta metabólica también alteraría la toxicidad del glifosato (Fig. 8). *Conyza sumatrensis* resistente a glifosato (GR) y susceptible a glifosato (GS) se germinaron en suelo y los brotes se cortaron por la base del tallo y se introdujeron en 2 ml de glifosato 100 μ M con o sin ácido glucónico en diferentes concentraciones. Como se esperaba, las plantas GS tratadas con glifosato dejaron de crecer y desarrollaron clorosis, lo que eventualmente produjo la muerte tisular. Las plantas GR en glifosato permanecieron saludables y verdes, incluso creciendo y desarrollando hojas nuevas en los compartimentos de las placas petri. Sin embargo, cuando el glifosato se mezcló con ácido glucónico, las plantas GR dejaron de crecer y también desarrollaron clorosis y eventual muerte tisular. El cese del crecimiento y el desarrollo de clorosis son los hitos clave de la toxicidad del glifosato. Estos resultados muestran que los intermedios de las rutas anteriores a la ruta del shikimato también se pueden usar para eliminar la resistencia al glifosato.

En su conjunto, los inventores proponen que aumentar los niveles celulares de ácido glucónico, ácido shikímico o shikimato-3-fosfato mediante su inclusión en las formulaciones de glifosato tendrá al menos dos efectos deseados. En primer lugar, se aumenta la potencia del glifosato, lo que conduce a una reducción de un compuesto químico sintético en la cadena alimentaria y sustituyéndolo por un metabolito vegetal de origen natural. Esto podría mejorar la calidad de los alimentos y abordar preocupaciones ambientales relativas a residuos agroquímicos en el suelo. En segundo lugar, las plantas resistentes a glifosato normalmente evitan la acumulación de estos intermedios, pero la introducción de estos metabolitos mediante pulverización en una mezcla compuesta con glifosato elimina su resistencia. Aunque el mecanismo exacto de esto sigue sin estar claro, los inventores especulan que, quizás, el procesamiento metabólico de estos intermedios en rutas metabólicas aún desconocidas podría producir productos letales que llevarán a la inhibición del crecimiento y la muerte celular. En plantas susceptibles, shikimato-3-fosfato también puede potenciar la potencia del glifosato haciendo que más moléculas de la enzima EPSPS estén disponibles para su inhibición mediante glifosato. Esto se debe a que el glifosato solamente se une a un complejo EPSPS:shikimato-3-fosfato (Boocock y Coggins, 1983).

REFERENCIAS

1. Amrhein N, Deus B, Gehrke P, Steinrücken HC. (1980). The Site of the Inhibition of the Shikimate Pathway by Glyphosate. II. Interference of Glyphosate with Chorismate Formation *in vivo* and *in vitro*. *Plant Physiol* 66, 830-834.
2. Boocock MR, Coggins JR. (1983). Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS Lett* 154, 127-133.
3. Cheng W, Chang Y, Wang W. (2005). Structural basis for shikimate-binding specificity of *Helicobacter pylori* shikimate kinase. *J Bacteriol* 187, 8156-8163.
4. Chivasa S, Murphy AM, Hamilton JM, Lindsey K, Carr JP, Slabas AR. (2009). Extracellular ATP is a regulator of pathogen defence in plants. *Plant J* 60, 436-448.
5. Entus R, Poling M, Herrmann KM. (2002). Redox regulation of *Arabidopsis* 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. *Plant Physiol* 129, 1866-1871.
6. Fucile G, Falconer S, Christendat D. (2008). Evolutionary diversification of plant shikimate kinase gene duplicates. *PLoS Genet* 4, e1000292.
7. Gaines TA, Zhang W, Wang D, Bukun B, Chisholm ST, Shaner DL, Nissen SJ, Patzoldt WL, Tranel PJ, Culpepper AS, *et al.* (2010). Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proc Natl Acad Sci USA*

107, 1029-1034.

8. Ge X, d'Avignon DA, Ackerman JJH, Sammons RD. (2010). Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Manag. Sci.* 66, 345-348.

9. Gu Y, Reshetnikova L, Li Y, Wu Y, Yan H, *et al.* (2002). Crystal structure of α -shikimate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals the dynamic role of the LID domain in catalysis. *J Mol Biol* 319, 779-89.

10. Heap I. (2015). International Survey of Herbicide Resistant Weeds. En línea. www.weedscience.com (25 de enero de 2015).

11. Henstrand JM, McCue KF, Brink K, Handa AK, Herrmann KM, Conn EE. (1992). Light and fungal elicitor induce 3-deoxy- D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase mRNA in suspension cultured cells of parsley (*Petroselinum crispum* L.). *Plant Physiol.* 98, 761-763

12. Herrmann KM. (1995). The Shikimate Pathway as an Entry to Aromatic Secondary Metabolism. *Plant Physiol* 107, 7-12.

13. Holländer H, Kiltz HH, Amrhein N. (1979). Interference of L- α -amino-oxy- β -phenylpropionic acid with phenylalanine metabolism in buckwheat. *Z Naturforschung* 34C, 1162-1173.

14. Kaundun SS, Dale RP, Zelaya IA, Dinelli G, Marotti I, McIndoe E, Cairns A. (2011). A novel P106L mutation in EPSPS and an unknown mechanism(s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African *Lolium rigidum* population. *J Agric Food Chem* 59, 3227-3233.

15. Kaundun SS, Hutchings S-J, Harris SC, Jackson LV, Shashi-Kiran R, Dale RP, McIndoe E. (2014). A simple in-season bioassay for detecting glyphosate resistance in grass and broadleaf weeds prior to herbicide application in the field. *Weed Science* 62, 597-607.

16. Leipe DD, Koonin EV, Aravind L. (2003). Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins. *J Mol Biol* 333, 781-815.

17. Lorraine-Colwill DF, Powles SB, Hawkes TR, Hollinshead PH, Warner SAJ, Preston C. (2002). Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. *Pestic Biochem Physiol* 74, 62-72.

18. Nature Editorial (2014). A growing problem. *Nature* 510, 187.

19. Ng C, Wickneswary R, Salmijah S, Teng YT, Ismail BS. (2004). Glyphosate resistance in *Eleusine indica* (L.) Gaertn. from different origins and polymerase chain reaction amplification of specific alleles. *Aust J Agric Res* 55, 407-414.

20. Owen MDK, Zelaya IA. (2005). Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Manag Sci* 61, 301-311.

21. Reinbothe C, Ortel B, Parthier B, Reinbothe S. (1994). Cytosolic and plastid forms of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Euglena gracilis* are differentially expressed during light-induced chloroplast development. *Mol. Gen. Genet.* 245, 616-622.

22. Sammons RD, Gaines TA. (2014). Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Manag Sci* 70, 1367-1377.

23. Shaner DL, Nadler-Hassar T, Henry WB, Koger CH. (2005). A rapid *in vivo* shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science* 53, 769-774.

24. Sharkhuu A, Narasimhan ML, Merzaban JS, Bressan RA, Weller S, Gehring C. (2014). A red and far-red light receptor mutation confers resistance to the herbicide glyphosate. *Plant J* 78, 916-26.

25. Smith SJ, Wang Y, Slabas AR, Chivasa S. (2014). Light regulation of cadmium-induced cell death in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* 9, e27578.

26. Steinrücken HC, Amrhein N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 94, 1207-1212.

27. Teaster ND, Hoagland RE. (2013). Varying tolerance to glyphosate in a population of Palmer amaranth with low EPSPS gene copy number. *American J Plant Sci* 4, 2400-2408.

28. Tokhver AK, Pal'm EV. (1986). Light-dependence of the inhibiting action of glyphosate on the shikimate pathway in cotyledon leaves of buckwheat seedlings. *Soviet Plant Physiol.* 33, 748-753.

29. Transparency Market Research (2014). Glyphosate market for genetically modified and conventional crops - global industry analysis, size, share, growth, trends and forecast 2013-2019. <http://www.transparencymarketresearch.com/glyphosate-market.html>

30. Waltz E. (2010). Glyphosate resistance threatens Roundup hegemony. *Nature Biotechnology* 28, 537-538.

31. Wang Y, Slabas AR, Chivasa S. (2012). Proteomic analysis of dark response in *Arabidopsis* cell suspension cultures. *J Plant Physiol.* 169, 1690-7.

32. Weaver LM, Herrmann KM. (1994). Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends Plant Sci.* 9, 346-351.

33. Yu Q, Jalaludin A, Han H, Chen M, Sammons RD, Powles PB. (2015). Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance. *Plant Physiol* 167, 1440-1447.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Durham

<120> Composición herbicida

<130> PE957961WO

<150> GB 1617420.3

<151> 14-10-2016
 <160> 28
 5 <170> PatentIn, versión 3.5
 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 1
 gtggctgtac aaccggtatt g 21
 15 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana
 20 <400> 2
 tcacgtccag caaggtcaag20
 <210> 3
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 3
 atgagaggat gctctgcctt cg 22
 30 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana
 35 <400> 4
 gcagagcaaa cacagcaaca g 21
 40 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana
 45 <400> 5
 accaccgtca accaaacttc 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 6
 tgaagcagct ggtgttttg 20
 55 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana
 60 <400> 7
 tccagagtca gagaaaatct g 21
 <210> 8
 <211> 20
 65 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

	<400> 8		
	gcttggacgg tgagaaagat20		
5	<210> 9		
	< 211> 19		
	< 212> ADN		
	<213> Arabidopsis thaliana		
10	<400> 9		
	ggagtctaga gaacaagaa19		
	<210> 10		
	< 211> 22		
15	< 212> ADN		
	<213> Arabidopsis thaliana		
	<400> 10		
20	caagctcatt taactggca ac	22	
	<210> 11		
	< 211> 20		
	< 212> ADN		
	<213> Arabidopsis thaliana		
25	<400> 11		
	gcctttattg ctccaacaac 20		
	<210> 12		
30	< 211> 20		
	< 212> ADN		
	<213> Arabidopsis thaliana		
	<400> 12		
35	cctggaaaga gtcgtggaag	20	
	<210> 13		
	< 211> 21		
	< 212> ADN		
40	<213> Arabidopsis thaliana		
	<400> 13		
	ttttgttg gaagcttgga g 21		
45	<210> 14		
	< 211> 22		
	< 212> ADN		
	<213> Arabidopsis thaliana		
50	<400> 14		
	tttcaaaaa ttgacaagat cg	22	
	<210> 15		
	< 211> 23		
55	< 212> ADN		
	<213> Arabidopsis thaliana		
	<400> 15		
60	ctccatttga tgaagaacaa cag	23	
	<210> 16		
	< 211> 22		
	< 212> ADN		
	<213> Arabidopsis thaliana		
65	<400> 16		

	cgcatcacg aggaaactgt tc	22
5	<210> 17 < 211> 24 < 212> ADN <213> Arabidopsis thaliana	
10	<400> 17 gagatcttct ctgcgtctgc ttct	24
15	<210> 18 < 211> 21 < 212> ADN <213> Arabidopsis thaliana	
	<400> 18 ttgcagagag tagttcgagc t	21
20	<210> 19 < 211> 26 < 212> ADN <213> Arabidopsis thaliana	
25	<400> 19 cttctgggtt ggctataatc ttcaac	26
30	<210> 20 < 211> 20 < 212> ADN <213> Arabidopsis thaliana	
	<400> 20 atccactgaa aacgcgagga	20
35	<210> 21 < 211> 20 < 212> ADN <213> Arabidopsis thaliana	
40	<400> 21 tcctgattac aaaccgggaa 20	
45	<210> 22 < 211> 21 < 212> ADN <213> Arabidopsis thaliana	
50	<400> 22 cttcctcgga agctctcttc t 21	
55	<210> 23 < 211> 20 < 212> ADN <213> Arabidopsis thaliana	
	<400> 23 tgataactcc gcccaaaaag20	
60	<210> 24 < 211> 20 < 212> ADN <213> Arabidopsis thaliana	
65	<400> 24 cagcacaagc tgcaagagag	20

	<210> 25	
	< 211> 20	
	< 212> ADN	
	<213> Arabidopsis thaliana	
5	<400> 25	
	gtgcctcgga tgagagagag	20
10	<210> 26	
	< 211> 20	
	< 212> ADN	
	<213> Arabidopsis thaliana	
15	<400> 26	
	ttagcgttga cacgaacagg	20
20	<210> 27	
	< 211> 21	
	< 212> ADN	
	<213> Arabidopsis thaliana	
	<400> 27	
	tggtggctct agttctgtg g	21
25	<210> 28	
	< 211> 20	
	< 212> ADN	
	<213> Arabidopsis thaliana	
30	<400> 28	
	ggctgctcta tctggagagg	20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición herbicida que comprende glifosato o una sal o sales adecuadas del mismo y al menos uno de shikimato-3-fosfato, shikimato o ácido shikímico, 3-deshidroquinato o 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) o ácido glucónico.
- 10 2. Una composición herbicida de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende glifosato o una sal o sales adecuadas y al menos uno de shikimato-3-fosfato, shikimato o ácido shikímico, 3-deshidroquinato o 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP).
3. La composición herbicida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el metabolito es shikimato-3-fosfato.
- 15 4. La composición herbicida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende, además, uno o más aditivos o adyuvantes agrícolamente aceptables.
5. La composición herbicida de acuerdo con la reivindicación 6 en donde el adyuvante es un tensioactivo y/o sulfato de amonio.
- 20 6. La composición herbicida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además uno o más agentes herbicidas adicionales.
- 25 7. La composición herbicida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la relación molar de glifosato a shikimato/ácido shikímico, shikimato-3-fosfato, 3-deshidroquinato, 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) o ácido glucónico es 1:7,5 - 1:100, 1:8 - 1:75 o 1:10-1:50.
8. La composición herbicida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en una forma concentrada o mezcla de tanque.
- 30 9. Un método para controlar malezas aplicando una composición herbicida para pulverizar posterior a la emergencia o una mezcla de tanque de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores a malezas y/u otra vegetación no deseable.
- 35 10. Uso de una composición herbicida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para controlar malezas y/o vegetación no deseable.
11. El método o el uso de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10 para usar en el tratamiento de malezas y/o vegetación que se han vuelto resistentes al glifosato.
- 40 12. El método o el uso de acuerdo con las reivindicaciones 9-12 en donde la cantidad de glifosato necesaria para controlar malezas y/u otra vegetación no deseada es al menos de un 10 %, 15 %, 25 %, 50 %, 60 % o más, menos glifosato de lo que se necesitaría para controlar malezas y/u otra vegetación no deseada en ausencia de dicho shikimato o metabolito(s) de la ruta metabólica de las pentosas fosfato.
- 45 13. Uso de al menos un shikimato-3-fosfato, shikimato o ácido shikímico, 3-deshidroquinato o 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) o ácido glucónico para potenciar la actividad del glifosato y/o reducir la cantidad de glifosato necesaria para controlar malezas.
- 50 14. Un método para potenciar la actividad del glifosato y/o reducir la cantidad de glifosato necesaria para controlar malezas, comprendiendo el método incluir al menos uno de shikimato-3-fosfato, shikimato o ácido shikímico, 3-deshidroquinato o 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) o ácido glucónico en un método para controlar malezas usando glifosato.

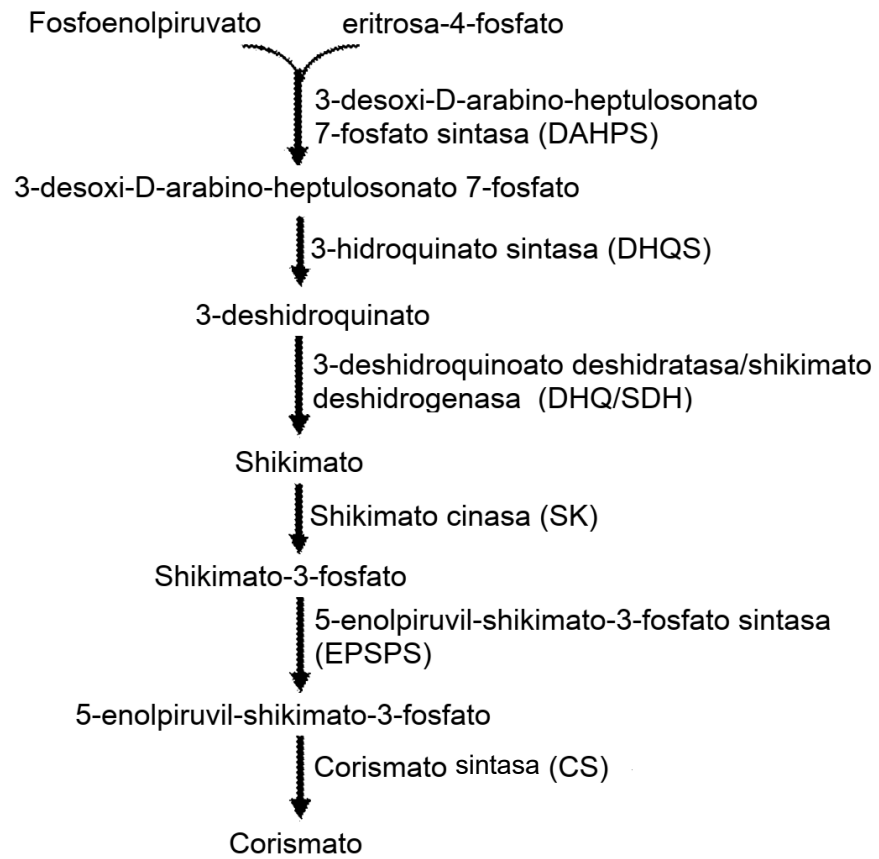


Figura 1

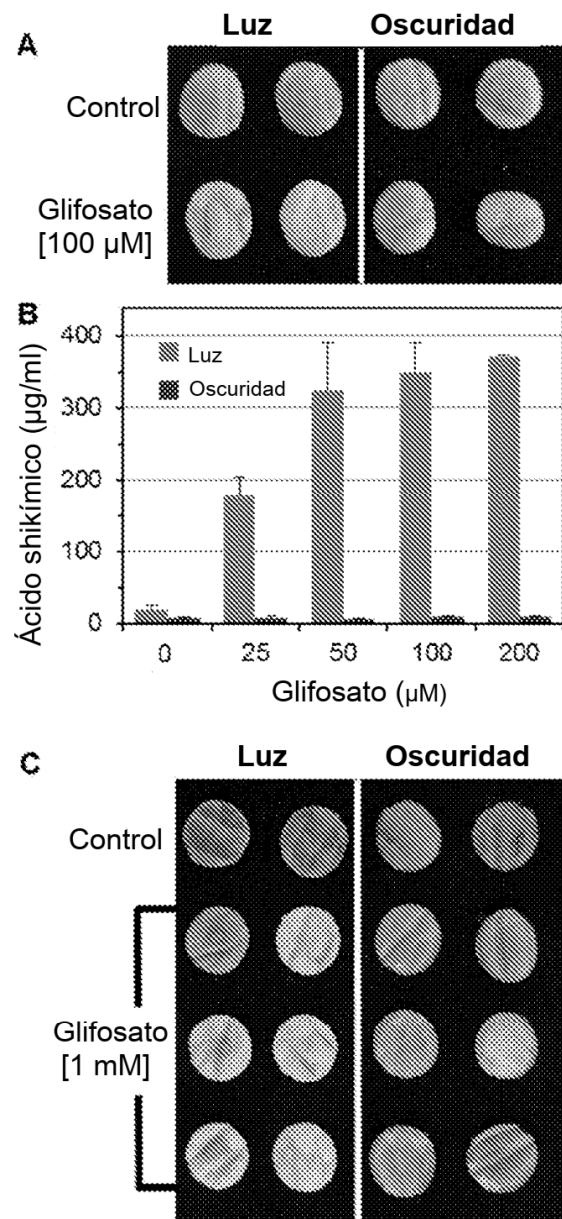


Figura 2

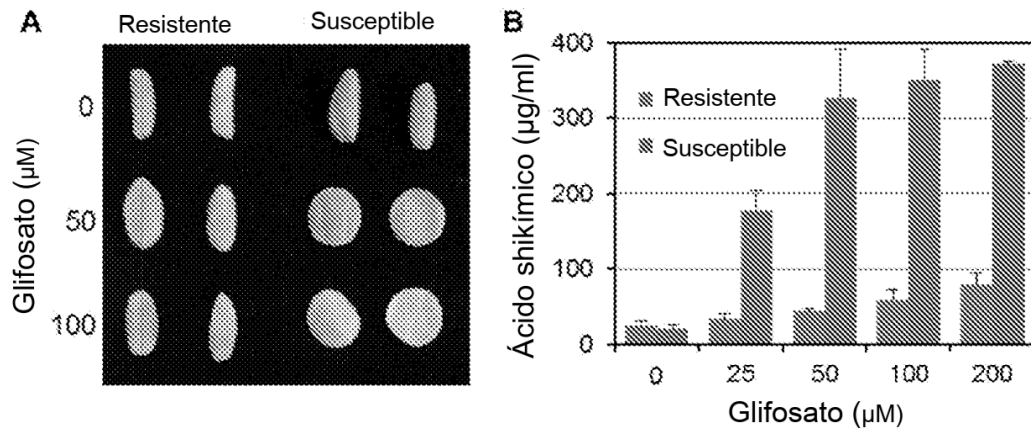


Figura 3

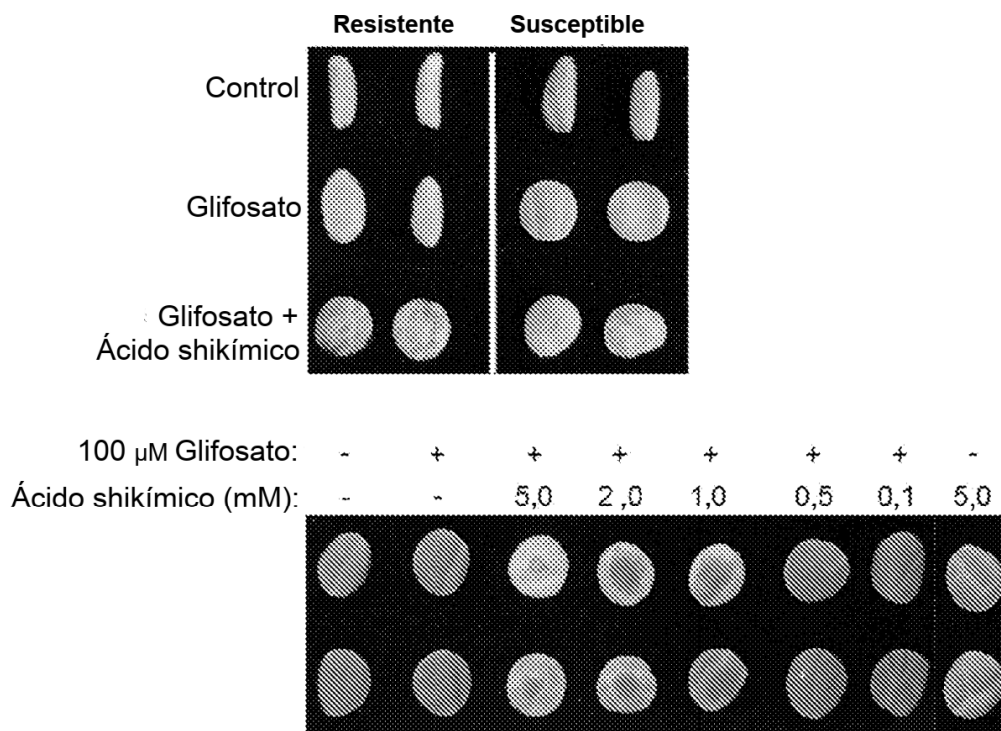


Figura 4

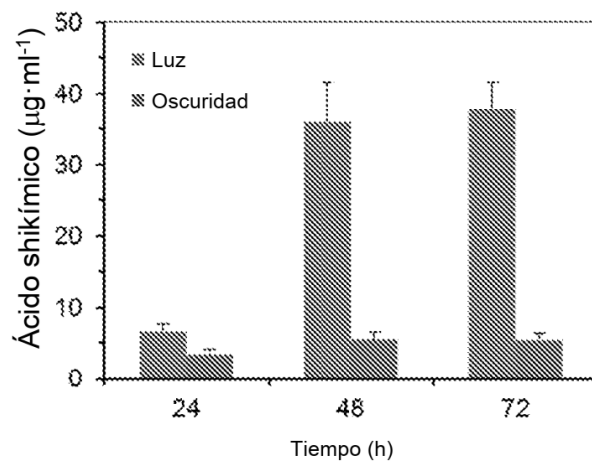


Figura 5

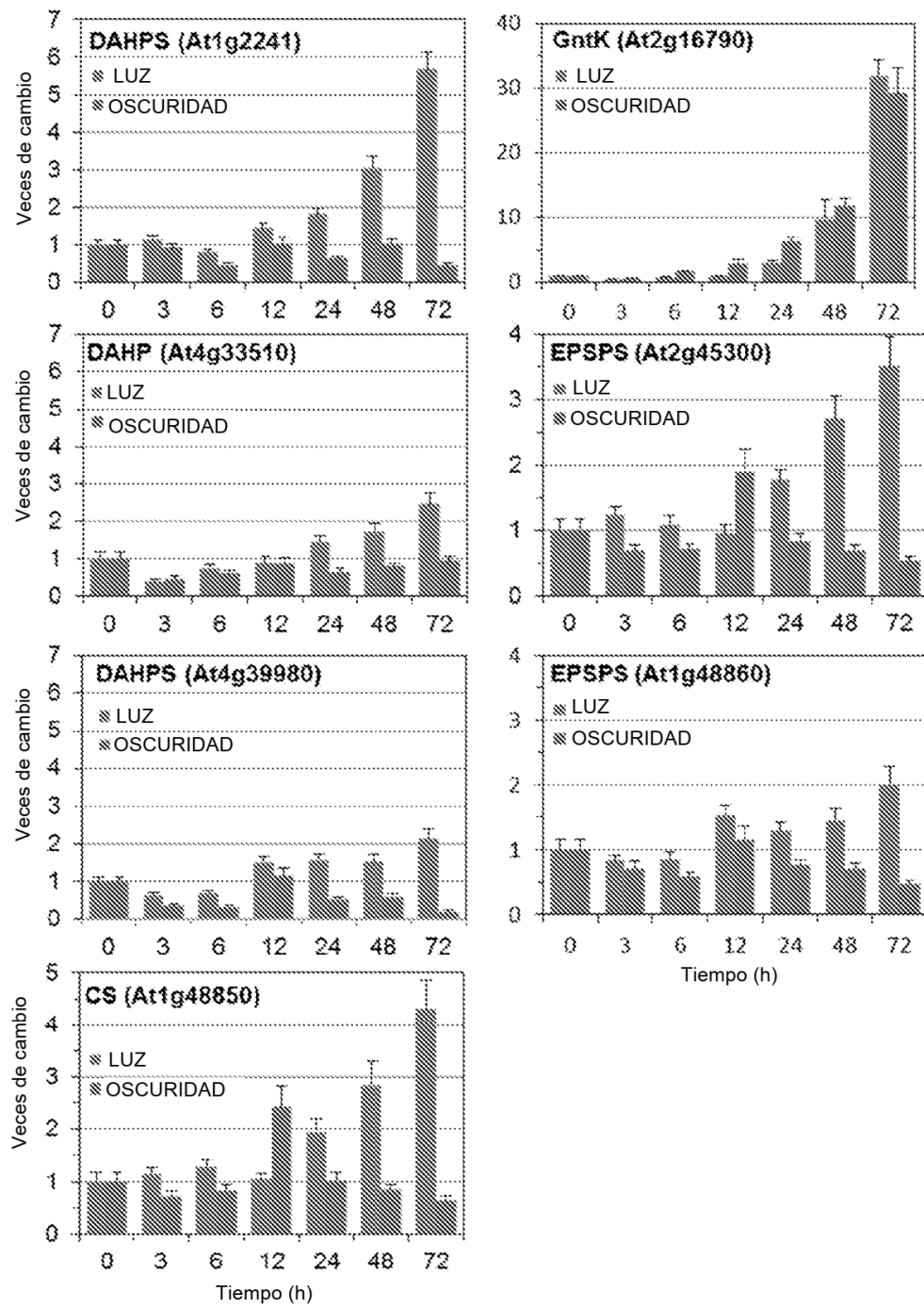


Figura 6

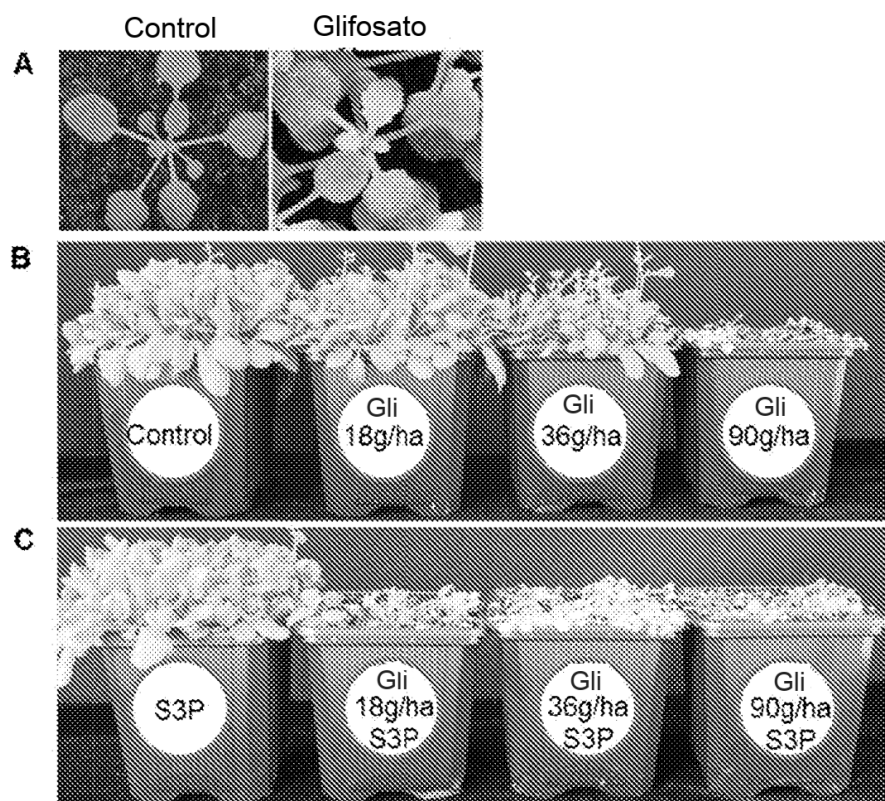


Figura 7

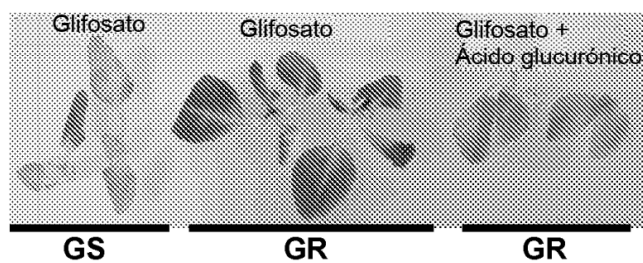


Figura 8