

Modo de acción del ácido pelargónico, un ácido graso con capacidad bioherbicida

Pelargonic acid, a fatty acid with bioherbicidal capacity

David López-González^{1,2,†,*}, Marta Muñoz Usero^{3,†}, José M. Hermida-Ramón^{4,5}, Marta Teijeira^{5,6}, Fabrizio Araniti⁷, Adela M. Sánchez-Moreiras^{1,2} y Mercedes Verdeguer³

¹Departamento de Biología Vegetal e Ciencia do Solo, Facultade de Biología, Universidade de Vigo, 36310 Vigo, Spain

²Instituto de Agroecoloxía e Alimentación (IAA), Universidade de Vigo, Campus Auga, 32004 Ourense, Spain

³Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain

⁴Departamento de Química Física, Facultade de Química, Universidade de Vigo, 36310 Vigo, Spain

⁵Biologically Active Organic Compounds and Ionic Liquids Group (BIOILS), Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur, (IIS Galicia Sur). SERGAS-UVIGO, Spain

⁶Departamento de Química Orgánica, Facultade de Química, Universidade de Vigo, Vigo, Spain

⁷Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali – Produzione, Territorio, Agroenergia, Università Statale di Milano, Via Celoria n°2, 20133 Milano, Italy

[†]Ambos autores contribuyeron de igual forma al trabajo: David López-González y Marta Muñoz Usero

(*E-mail: davidlopez@uvigo.gal)

<https://doi.org/10.19084/rca.34969>

Recibido/received: 2024.01.15

Aceptado/accepted: 2024.02.28

RESUMEN

El ácido pelargónico (AP) es un ácido graso saturado que puede encontrarse en diversos organismos vegetales y presenta múltiples usos, entre ellos, su uso como herbicida. A pesar de ser una de las primeras moléculas de origen natural con actividad bioherbicida reconocida, no se conoce su modo de acción sobre el metabolismo vegetal, por lo que el objetivo de este trabajo es estudiar los efectos del AP sobre el metabolismo de plántulas de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Como resultado, el AP redujo la longitud radicular, aumentó el número de raíces adventicias, y provocó fenómenos de torsión en las plántulas tratadas. A nivel ultraestructural, el compuesto causó alteraciones en los microtúbulos, así como alteraciones en la actividad de las proteínas PIN que intervienen en el transporte de la fitohormona auxina y que sugieren que el AP estaría causando un desajuste hormonal, lo cual se confirmó con un bioensayo con el antiauxínico PCIB. Para indagar más sobre la interacción del AP con las auxinas, se realizaron ensayos *in silico* que demostraron que el AP es capaz de interactuar de forma estable en el tiempo con la proteína PIN1, siendo la interacción AP-PIN1 más estable energéticamente que la interacción AP-IAA en condiciones intracelulares. Estos resultados sugieren que el AP actuaría como un compuesto que mimetiza a la auxina, haciendo que la planta reconozca al AP como un exceso de auxinas, desencadenando todos los efectos observados que resultarían en la inhibición del crecimiento, y que permitirían al AP actuar como un bioherbicida.

Palabras clave: Ácido pelargónico, *Arabidopsis thaliana*, auxinas, proteínas PIN, *docking* molecular.

ABSTRACT

Pelargonic acid (PA) is a saturated fatty acid that can be found in various plant organisms and has multiple uses, including herbicidal capacity. Despite being one of the first molecules of natural origin with recognised bioherbicidal activity, its mode of action on plant metabolism is not known. Therefore, the aim of this work was to study the effects of PA on the metabolism of seedlings of the model species *Arabidopsis thaliana*. PA reduced root length, increased the number of adventitious roots, and caused torsion in the treated seedlings. At the ultrastructural level, the compound caused alterations in microtubules and alterations in the activity of PIN proteins involved in the transport of the phytohormone auxin, suggesting that PA is causing a hormonal imbalance, which was confirmed by a bioassay with the antiauxinic PCIB. To further investigate the interaction of PA with auxins, *in silico* assays were performed and showed that PA is able to stably interact with the PIN1 protein, and that the PA-PIN1 interaction is energetically more stable than the PA-IAA interaction under intracellular conditions. These results suggest that PA would act as an auxin mimicking compound, causing auxin excess and triggering all the observed effects that would result in plant growth inhibition, and bioherbicide activity.

Keywords: Pelargonic acid, *Arabidopsis thaliana*, auxin, PIN proteins, molecular docking.

INTRODUCCIÓN

El manejo de las malezas es uno de los principales problemas de la agricultura, ya que provocan importantes pérdidas económicas para los agricultores (Dayan *et al.*, 2009). Si bien el uso de herbicidas químicos es la solución más rápida y económica, son altamente contaminantes, y el número limitado de dianas moleculares de estos herbicidas favorece la aparición de malas hierbas resistentes (López-González *et al.*, 2020). Dada esta situación, se están buscando sustancias de origen natural con capacidad herbicida, ya que estas poseen una mayor diversidad estructural y pueden presentar modos de acción novedosos (Duke *et al.*, 2000).

El ácido pelargónico (AP) es un ácido graso saturado de 9 carbonos cuyo uso como herbicida está actualmente autorizado en muchos países, siendo un bioherbicida de contacto no selectivo, de estadíos tempranos y de aplicación foliar (Muñoz *et al.*, 2022). Sin embargo, a pesar de su amplia aceptación, su modo de acción todavía no se conoce con detalle. Hasta hace unos años, se pensaba que el AP actúa sobre los lípidos de membrana, desestabilizando la membrana plasmática y modificando su estructura, pero según Lebecque *et al.* (2019), en un estudio utilizando simulaciones de dinámica molecular, el efecto fitotóxico del PA asociado a su incrustación en la bicapa lipídica no podría justificarse, ya que no tiene una cadena alquílica lo suficientemente larga como para causar la desestabilización lipídica de la membrana.

Por ello, este trabajo tiene como objetivo estudiar el modo de acción del bioherbicida AP sobre la fisiología vegetal de plántulas de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Curva dosis-respuesta

Se esterilizaron semillas de *A. thaliana* en EtOH al 50% durante 3 min y NaOCl al 0,5% durante otros 3 min y se dejaron en agar al 0,1% durante 72 h en nevera. Posteriormente, se sembraron 24 semillas en medio agar vegetal con una mezcla de macro y micronutrientes y sacarosa al 1% en placas Petri, con 5 réplicas por tratamiento. El AP se disolvió en

diferentes concentraciones en el medio (0, 10, 20, 40, 80 y 160 μM). Las placas se colocaron verticalmente en una cámara de crecimiento a 22 °C, 55% humedad y 8 h de luz durante 14 días. Al final del tratamiento, se midió la longitud radicular y se calcularon los valores de IC_{50} e IC_{80} (concentraciones que causan el 50 y 80% de inhibición del crecimiento radicular, respectivamente) y se observaron *de visu* los efectos del AP. Los datos de crecimiento radicular se analizaron estadísticamente con el programa SPSS mediante ANOVA con DMS, mientras que para el cálculo de las IC_{50} e IC_{80} se empleó el modelo de regresión con un mayor coeficiente de correlación.

Análisis ultraestructural en raíces

Los ápices radiculares de plántulas control y tratadas con la IC_{50} de AP durante 7 días se cosecharon y se introdujeron en tampón cacodilato 0,1 M con glutaraldehído al 5% durante 4 h a 4 °C. Posteriormente, se lavaron con tampón cacodilato fresco y se sumergieron en una solución de acetona al 10% con acetato de uranilo al 2% durante 1 h y se pasaron a tampón cacodilato 0,1 M con OsO_4 durante 3 h. Las muestras se deshidrataron en soluciones de acetona de concentración creciente y se añadió resina Spurr a 4 °C para finalmente dejarlas polimerizar durante 2-3 días a 60 °C. Se realizaron cortes ultrafinos (50-70 nm) y se observaron en el microscopio electrónico de transmisión.

Bioensayo con PCIB

Dada la morfología observada en la curva dosis-respuesta, se realizó un ensayo con la molécula antiauxínica PCIB (ácido *p*-clorofenoxisobutírico) para observar un posible desequilibrio auxínico. Se sembraron plántulas y se trataron con las IC_0 , IC_{50} e IC_{80} de AP, 15 μM de PCIB y las combinaciones de AP y PCIB. Tras 14 días de tratamiento se tomaron fotos con la lupa y se comparó su morfología.

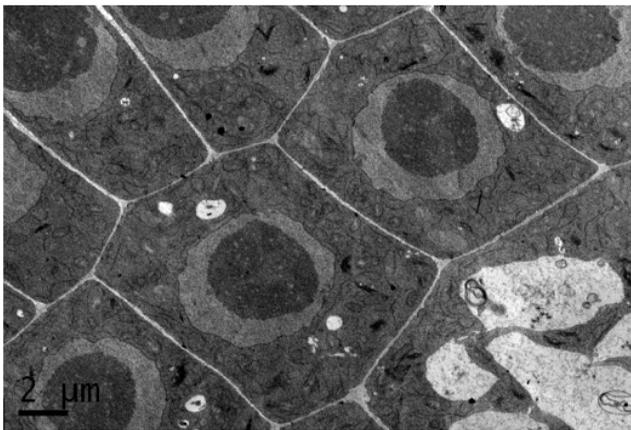
Ensayo con líneas transgénicas

Para entender más el posible efecto del AP sobre las auxinas, se realizó un ensayo con las líneas transgénicas GFP de *A. thaliana* *pDR5::GFP*

(marca en verde la presencia de auxinas) y *pPIN1::PIN1-GFP* (marca en verde la proteína transportadora de auxinas PIN1). Se sembraron plántulas de ambas líneas y se trataron con la IC_{50} de AP. Tras 7 y 14 días, las raíces se observaron al microscopio confocal y se tomaron imágenes.

Detección de microtúbulos

Las raíces de plántulas control y tratadas con la IC_{50} de AP se cosecharon tras 7 y 14 días de tratamiento. Para la detección de los microtúbulos, se utilizó un marcaje mediante inmunofluorescencia según el método de Holzinger *et al.* (2010), y se comparó la distribución y morfología de los microtúbulos en el control y el tratamiento.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La curva dosis-respuesta confirmó el efecto fitotóxico del AP, obteniéndose unos valores de IC_{50} e IC_{80} de 30,4 y 61,6 μM respectivamente. Visualmente, se observó que a medida que aumentaba la concentración, disminuía la longitud de la raíz, apareciendo raíces adventicias y raíces primarias que se retorcián ligeramente, mientras que no se observaron efectos relevantes en la parte aérea. A nivel ultraestructural, las raíces tratadas con el AP mostraron células con paredes irregulares dispuestas en zigzag y algunas de ellas inacabadas, mientras que las paredes eran rectas y continuas en las plántulas control (Figura 1).

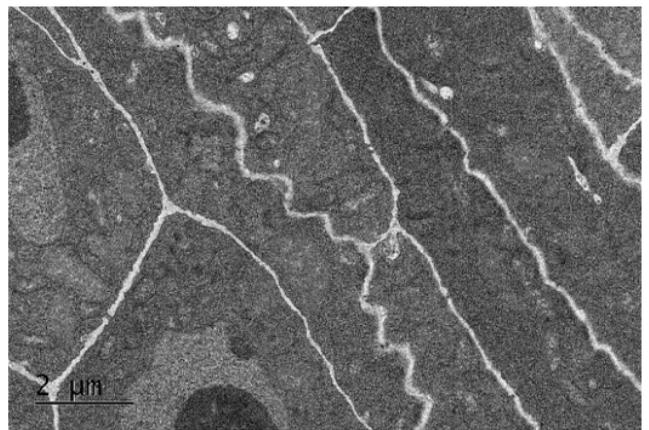


Figura 1 - Imágenes del microscopio electrónico de transmisión de raíces control (izquierda) y tratadas con AP (derecha) tras 7d de tratamiento.

Docking molecular

Se estudió la interacción del AP con la proteína PIN1 y se comparó con la interacción de esta proteína con la auxina natural IAA y con el inhibidor del transporte auxínico NPA. Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron con el paquete de software de gráficos moleculares ICM-Pro Molsoft versión 3.9-2d. Los ligandos IAA, NPA y PA se convirtieron a sus estructuras 3D y se buscaron sus geometrías conformacionales de menor energía. Se realizaron simulaciones ciegas de acoplamiento flexible ICM entre PIN1At y los ligandos IAA, NPA y PA utilizando la estructura completa de la proteína.

Estas alteraciones en la pared junto a la torsión observada en las raíces sugieren un problema a nivel de los microtúbulos, el cual fue confirmado mediante inmunofluorescencia. A ambos tiempos, los microtúbulos se observaban bien alineados en las plántulas control, mientras que en el tratamiento con AP aparecían desorganizados y en ocasiones perdían la continuidad que se observaba en el control (Figura 2).

La presencia de raíces adventicias y torsión sugiere que el compuesto podría estar afectando al balance de auxinas. Esto se confirmó mediante un ensayo con el antiauxínico PCIB. Las plántulas que crecieron con la combinación de PCIB y AP mostraron

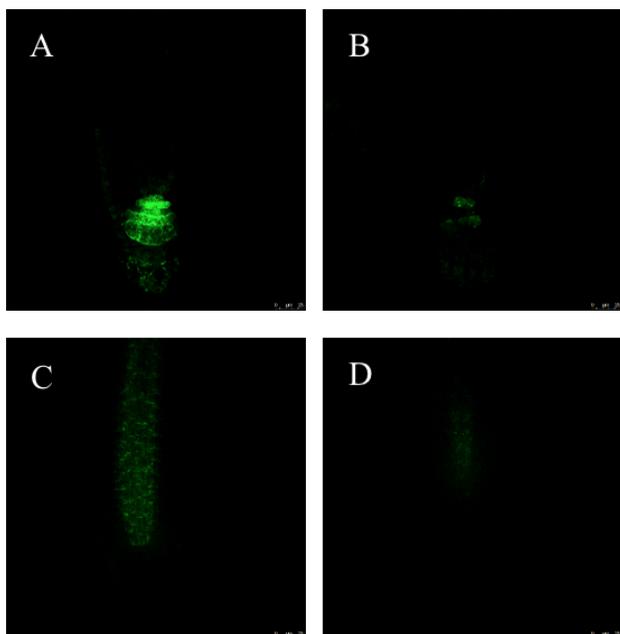


Figura 2 - Imágenes de microtúbulos tomadas en el microscopio confocal en plántulas control (izquierda) y tratadas con AP (derecha) tras 7d de tratamiento.

un menor número de raíces adventicias y no presentaron torsión, por lo que el PCIB estaría revirtiendo los efectos del AP (Figura 3).

Los ensayos con las líneas transgénicas pDR5::GFP y pPIN1::PIN1-GFP, demostraron cómo el AP altera el balance de auxinas, ya que en las plántulas pDR5::GFP se observó una menor señal que indica una menor cantidad de auxinas en el ápice en comparación con el control, viéndose alterado, además, el transporte de auxinas, tal y como se puede observar en las plántulas de la línea pPIN1::PIN1-GFP, que mostraron una menor señal en comparación con el control, lo que indica una menor cantidad de proteínas transportadoras PIN1 (Figura 4).

Los ensayos de *docking* molecular permitieron conocer el comportamiento del AP en el interior celular, encontrándose que tanto el IAA y el NPA, como el AP se unen a la proteína PIN1 en el mismo sitio, siendo el NPA el que presenta mayor afinidad, seguido del AP y por último el IAA. Esto sugiere que tanto AP como IAA compiten por el sitio de unión en PIN1, haciendo que la planta perciba el AP como una auxina y mimetizando así su efecto. Este exceso de auxina es lo que provocaría cambios en la organización de los microtúbulos (True & Shaw, 2016), y cambios en la morfología de la raíz, favoreciendo el desarrollo de raíces adventicias (López-González *et al.*, 2020).

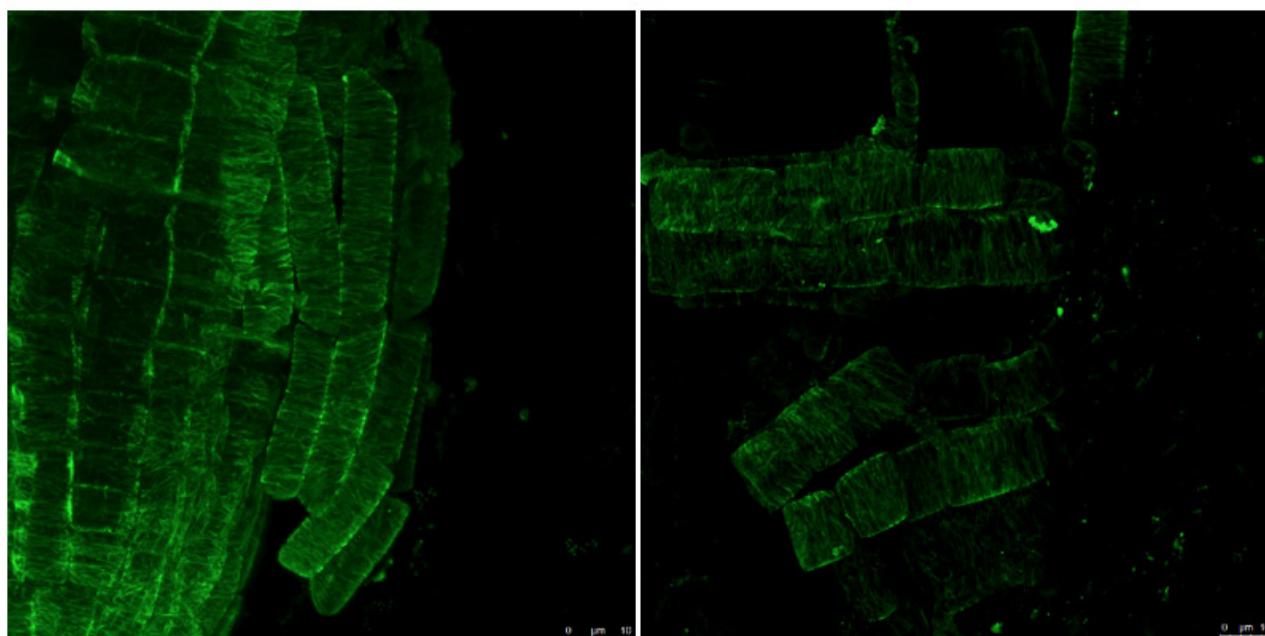


Figura 3 - Imágenes de estereo microscopio de plántulas control (A), IC₅₀ AP (B), IC₈₀ AP (C), PCIB (D), IC₅₀ AP + PCIB (E) y IC₈₀ AP + PCIB (F) tras 14d de tratamiento.

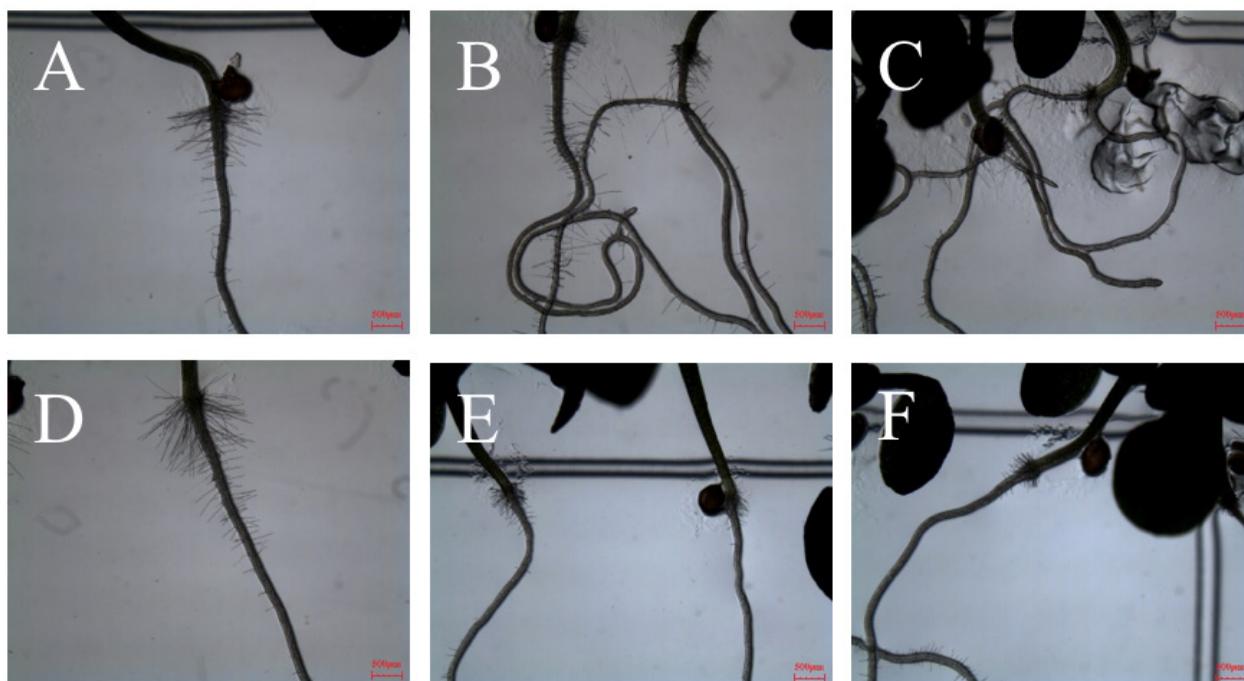


Figura 4 - Imágenes de microscopio confocal de plántulas de las líneas transgénicas *pDR5::GFP* y *pPIN1::PIN1-GFP* control y tratadas con AP tras 7 d de tratamiento.

CONCLUSIONES

Podemos concluir que el AP es un compuesto natural que podría actuar como imitador del IAA. Esta aplicación exógena de “auxina” sería la responsable de las alteraciones observadas causadas por un cambio en el transporte de auxinas, lo que induce la inhibición radicular y finalmente la detención total del crecimiento radicular.

AGRADECIMIENTOS

Investigación financiada por el Programa Horizonte Europa de la UE (HORIZON-CL6-2022-FARM-2FORK-02-01), Proposal ID: 101084084, AGROSUS, por el Ministerio de Universidades con cargo a la aplicación 33.50.460A.752 y por la Unión Europea NextGenerationEU/PRTR mediante un contrato Margarita Salas de la Universidade de Vigo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dayan, F.E.; Cantrell, C.L. & Duke, S.O. (2009) - Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 17, n. 12, p. 4022-4034. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.046>
- Duke, S.O.; Romagni, J.G. & Dayan, F.E. (2000) - Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection*, vol. 19, p. 583-589. [http://10.1016/S0261-2194\(00\)00076-4](http://10.1016/S0261-2194(00)00076-4)
- Holzinger, A.; Kawamura, E. & Wasteneys, G.O. (2010) - Strategies for imaging microtubules in plant cells. In: Gavin, R.H. (Ed.) - *Cytoskeleton Methods and Protocols*. Humana Press, London, p. 243-262.
- Lebecque, S.; Lins, L.; Dayan, F.; Fauconnier, M. & Deleu, M. (2019) - Interactions between natural herbicides and lipid bilayers mimicking the plant plasma membrane. *Frontiers in Plant Science*, vol. 10, art. 329. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00329>
- López-González, D.; Costas-Gil, A.; Reigosa, M.J.; Araniti, F.; & Sánchez-Moreiras, A.M. (2020) - A natural indole alkaloid, norharmaline, affects PIN expression patterns and compromises root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 151, p. 378-390. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.03.047>
- Muñoz, M.; Torres-Pagán, N.; Jouini, A.; Araniti, F.; Sánchez-Moreiras, A.M. & Verdeguer, M. (2022) - Control of problematic weeds in Mediterranean vineyards with the bioherbicide pelargonic acid. *Agronomy*, vol. 12, n. 10, art. 2476. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102476>
- True, J.H. & Shaw, S.L. (2020) - Exogenous auxin induces transverse microtubule arrays through transport inhibitor response1/auxin signaling f-box receptors. *Plant Physiology*, vol. 182, n. 2, p. 892-907. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00928>