

# Metabolismo del glutatión en una población de *Amaranthus palmeri* con resistencia NTS a nicosulfurón

Glutathione metabolism in a population of *Amaranthus palmeri* with NTS resistance to nicosulfuron

Clara Jiménez-Martínez\*, Laura Estepa, Mikel V. Eceiza, Miriam Gil-Monreal, Mercedes Royuela & Ana Zabalza

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

(\*E-mail: clara.jimenez@unavarra.es)

<https://doi.org/10.19084/rca.34986>

Recibido/received: 2024.01.15

Aceptado/accepted: 2024.02.28

## RESUMEN

El glutatión es un tripéptido que se ha relacionado con el estrés oxidativo detectado dentro del modo de acción de ciertos herbicidas. Por otro lado, las enzimas glutatión-S-transferasas (GSTs) son capaces de detoxificar xenobióticos a través de su conjugación con glutatión. Esta conjugación enzimática se ha descrito como un tipo de mecanismo de resistencia *non-target-site* (NTS) para algunos herbicidas, incluyendo los inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS). El objetivo de este trabajo es estudiar el metabolismo del glutatión en respuesta a inhibidores de ALS y determinar la implicación de las enzimas GSTs en la resistencia NTS de una población de *Amaranthus palmeri*. Se han determinado el contenido de los metabolitos relacionados con el glutatión, la actividad enzimática y la expresión génica de las GSTs tras la aplicación individual y conjunta de nicosulfurón y un inhibidor de GSTs (NBD-CI) en dos poblaciones (resistente a la sulfonilurea nicosulfurón y sensible). El tratamiento con nicosulfurón en la población sensible indujo un incremento en la síntesis de glutatión y actividad GST. La población resistente presentó una mayor actividad basal GST que la población sensible pero el herbicida no indujo la síntesis de glutatión, ni la actividad ni la expresión de GST, con lo que no se puede confirmar la implicación de las GSTs como mecanismo fisiológico NTS a nicosulfurón en la población estudiada.

**Palabras clave:** Glutatión-S-transferasas, inhibidores de ALS, resistencia non-target site, modo de acción herbicida.

## ABSTRACT

The tripeptide glutathione has been related to the oxidative stress elicited in the mode of action of several types of herbicides. Beside this, glutathione-S-transferases (GSTs) enzymes can detoxify xenobiotics through their conjugation with glutathione. Such enzymatic conjugation and herbicide metabolization has been described as a type of non-target-site (NTS) resistance mechanism for some herbicides, including acetolactate synthase (ALS) inhibitors. The objective of this work is to compare glutathione metabolism after ALS inhibition and determine the role of GSTs enzymes in the NTS resistance in one *Amaranthus palmeri* population to ALS inhibitors. The content of metabolites related to glutathione, the enzymatic activity and the gene expression of GSTs have been determined after the individual and joint application of nicosulfuron and a GST inhibitor (NBD-CI) in two populations (resistant to the sulfonyleurea nicosulfuron and sensitive). The results showed an increase in the synthesis of glutathione and its related components in the sensitive population after herbicide treatment, as well as an increase in GST activity. The resistant population presented a higher basal GST activity than, the sensitive population but the herbicide did not induce glutathione synthesis, activity, or GST expression in the resistant population. Thus, the involvement of GSTs as a physiological NTS mechanism for nicosulfuron could not be confirmed in the studied population.

**Keywords:** Glutathione-S-transferases, ALS-inhibitors, non-target site resistance, herbicide mode of action.

## INTRODUCCIÓN

La enzima acetolactato sintasa (ALS) actúa como diana de varias familias de herbicidas como las sulfonilureas. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima ALS en la ruta de la biosíntesis de aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina) (Zhou *et al.*, 2007). La inhibición del enzima ALS puede inducir un cierto nivel oxidativo a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), especialmente peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), como respuesta al estrés abiótico (Zabalza *et al.*, 2007; Eceiza *et al.*, 2023). Sin embargo, las plantas han desarrollado mecanismos para hacer frente al estrés oxidativo y el glutatión es una de las moléculas que elimina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además de su participación activa en el proceso de desintoxicación de ROS (Noctor *et al.*, 2012), también sirve como sustrato para las glutatión-Stransferasas (GSTs). Las GSTs son un grupo de enzimas multifuncionales que catalizan la desintoxicación directa de compuestos xenobióticos, a través de su conjugación con moléculas de glutatión reducido (GSH) (Gaafar *et al.*, 2022). Por tanto, son capaces de metabolizar ciertos herbicidas y esta conjugación enzimática se ha descrito como un tipo de mecanismo de resistencia non-target-site (NTS, independiente del mecanismo de acción), si bien los mecanismos NTS en la mayoría de los casos de resistencia a inhibidores de ALS descritos hasta el momento, están relacionados con las enzimas citocromo P450 (Rigon *et al.*, 2020). También se ha descrito la implicación de las GSTs como mecanismo NTS frente a inhibidores de ALS (Gaines *et al.*, 2020).

Algunas especies de malas hierbas son más propensas a desarrollar resistencia, como la especie objeto de nuestro estudio *Amaranthus palmeri* S. Watson que, debido a sus atributos ecológicos y biológicos, presenta poblaciones resistentes a múltiples herbicidas entre ellos los inhibidores de ALS (Ward *et al.*, 2013).

El objetivo de este estudio es mejorar el conocimiento de los procesos metabólicos involucrados en los mecanismos de resistencia NTS a inhibidores de ALS en *A. palmeri*. Se ha utilizado una población sensible y una resistente y se ha analizado y comparado la fisiología y el metabolismo del glutatión en respuesta a los inhibidores de ALS para determinar la implicación de las GSTs en la resistencia NTS en *A. palmeri*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Material vegetal y tratamientos*

Las semillas de las poblaciones de *A. palmeri* sensibles y resistentes a inhibidores de ALS fueron proporcionadas por la Dra. Mithila Jugulam (Kansas State University, Manhattan, Kansas, EEUU). La población resistente presenta resistencia NTS a sulfonilureas basada en las enzimas del P450 (Nakka *et al.*, 2017a). Las plantas se crecieron en cultivo hidropónico puro con aireación forzada según Fernández-Escalada *et al.* (2016). Se contaba con 16 contenedores entre ambas poblaciones con aproximadamente 7-8 plantas. A día 21 de crecimiento de las plantas en estadio de desarrollo definido como BBCH 14.35 y 48 horas antes de aplicar el herbicida, se aplicó un inhibidor de la enzima GST (NBD-Cl) en una dosis de 270 g m.a./ha. Se utilizó como herbicida nicosulfurón 4% (p/v) a una dosis 5 veces la recomendada, que es 60 g m.a./ha, y que fue aplicado de manera individual o con el inhibidor. Asimismo, se dejaron plantas sin tratar (controles) y plantas solo tratadas con el inhibidor. Se realizaron dos repeticiones de cada tratamiento. A los siete días de la aplicación del herbicida se congelaron hojas todas las plantas (-80 °C) para la realización de las determinaciones analíticas.

### *Determinaciones analíticas*

El contenido del glutatión y sus relacionados se midió mediante electroforesis capilar equipada con un detector de fluorescencia inducida por láser (Zulet *et al.*, 2015). Se determinó el contenido de cisteína (Cys),  $\gamma$ -glutamil-cisteína (GCC), glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG). La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo utilizando el método descrito por Peragón & Amores-Escobar (2018) midiendo la variación a 340 nm del sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) que se conjuga con la GSH. Se calculó el nivel de transcripción relativo para genes que codifican GSTs de la subfamilia Phi (GSTFs) mediante PCR cuantitativa (qPCR), con cebadores diseñados a partir de la secuencia de *Amaranthus hypochondriacus* y con una eficiencia de entre 90 y 110%.

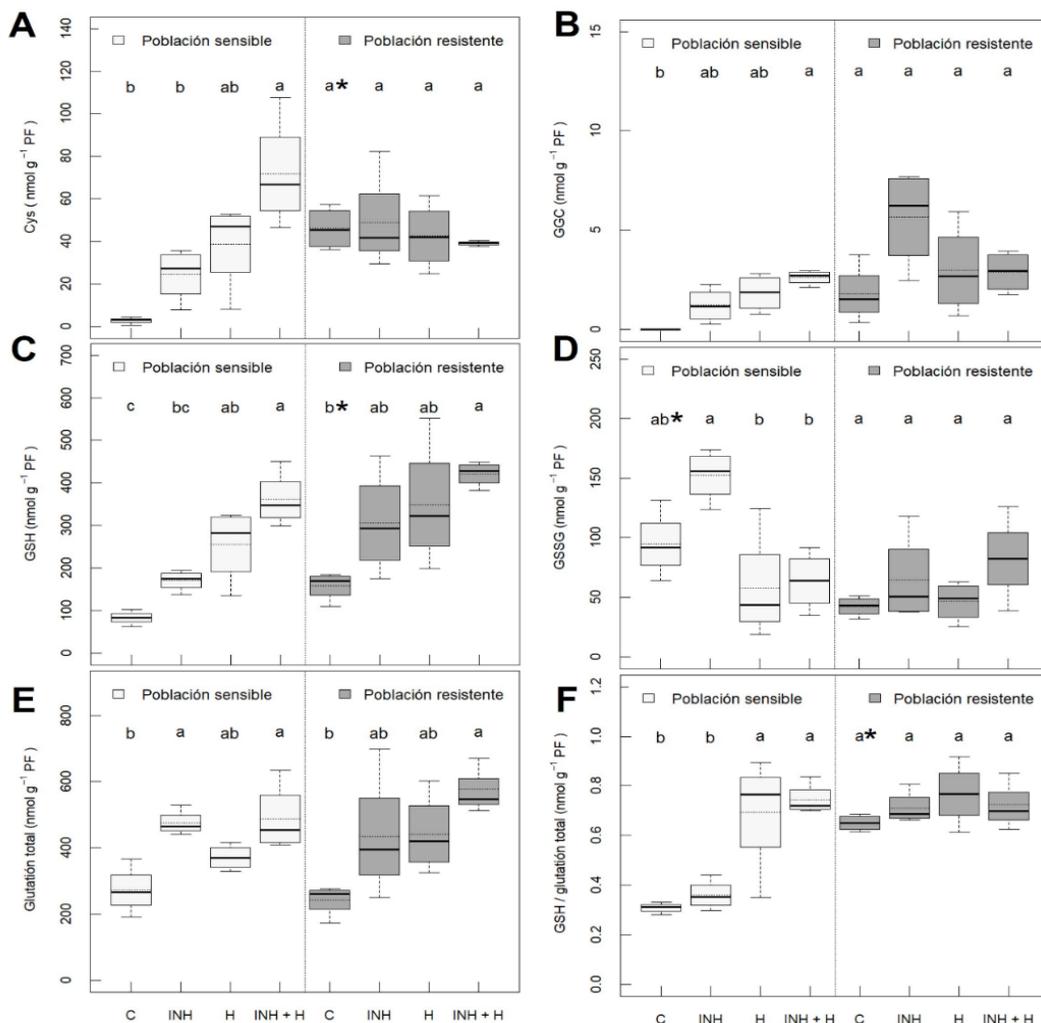
## Análisis estadístico

Las posibles diferencias entre los valores medios basales (plantas sin tratar) de las plantas sensibles y resistentes se compararon con la prueba t de Student. Para comparar las diferencias entre tratamientos dentro de la misma población se realizó la prueba ANOVA de una vía, seguida de la prueba post hoc de comparaciones múltiples HSD Tukey o T3 Dunnett test según había o no homogeneidad de varianzas. En todos los casos, los análisis estadísticos fueron realizados a un nivel de significancia

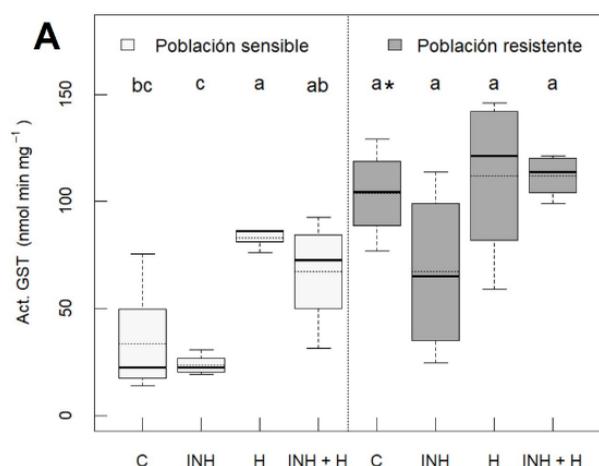
del 5 % ( $p\text{-value} \leq 0.05$ ). Los análisis estadísticos y representaciones gráficas se realizaron con RStudio versión 4.3.1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron los contenidos de los metabolitos relacionados con el glutatión (Figura 1). Cuando la población sensible es tratada con nicosulfurón, se observa un incremento en la síntesis de los precursores del glutatión, del GSH y del glutatión total



**Figura 1** - Contenido de glutatión y sus relacionados de dos poblaciones de *Amaranthus palmeri* (sensible y resistente a nicosulfurón) con diferentes tratamientos (n = 4); plantas sin tratar (C), inhibidor de GSTs (NBD-Cl 270 g m.a./ha) (INH), nicosulfurón (300 g m.a./ha) (H) e inhibidor de GST con nicosulfurón (INH + H). A) Contenido cisteína (Cys), B) contenido de  $\gamma$ -glutamilcisteína (GCC), C) contenido de glutatión reducido (GSH), D) contenido de glutatión oxidado (GSSG), E) contenido del glutatión total (GSH + 2\*GSSG) y F) ratio entre el glutatión reducido y el glutatión total (GSH/glutathión total). Las diferentes letras se refieren a diferencias significativas entre tratamientos de la misma población. Los \* se refieren a diferencias significativas entre las plantas sin tratar. Los análisis estadísticos fueron realizados a un nivel de significancia del 5 % ( $p\text{-value} \leq 0.05$ ).



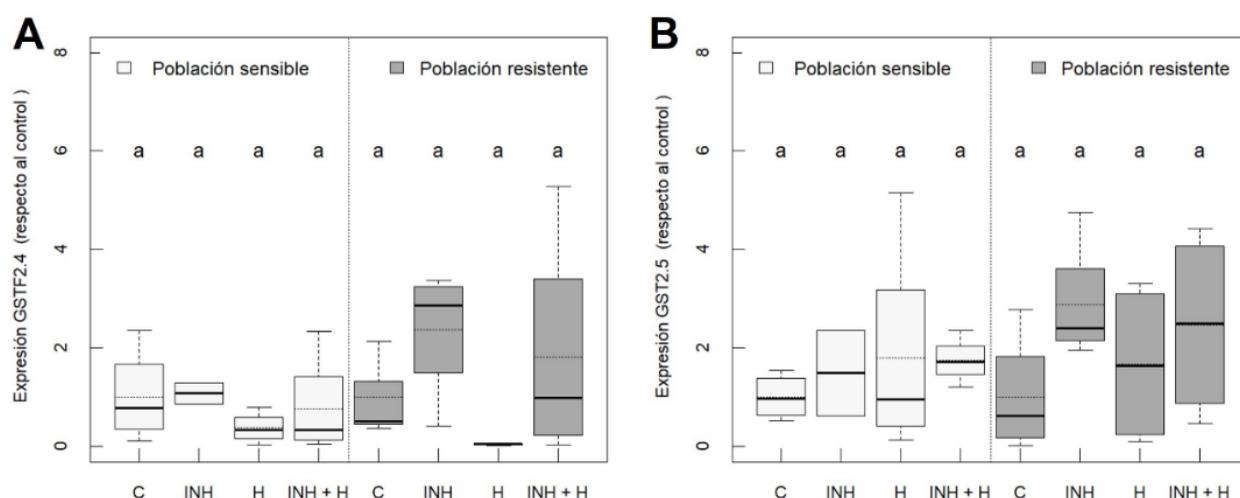
**Figura 2** - Actividad enzimática GST en dos poblaciones de *Amaranthus palmeri* (sensible y resistente a nicosulfurón) con diferentes tratamientos (n = 4); plantas sin tratar (C), inhibidor de GSTs (NBD-Cl 270 g m.a./ha) (INH), nicosulfurón (300 g m.a./ha) (H) e inhibidor de GSTs con nicosulfurón (INH + H). Las diferentes letras se refieren a diferencias significativas entre tratamientos de la misma población. Los \* se refieren a diferencias significativas entre las plantas sin tratar. Los análisis estadísticos fueron realizados a un nivel de significancia del 5 % (p-value  $\leq$  0.05).

en presencia del herbicida, pero este incremento también es significativo en presencia del inhibidor de las GSTs aplicado 48h antes de la aplicación del

herbicida. La población resistente presentó unos valores basales de Cys, GSH y ratio GSH/contenido total superiores a la sensible y en ella también se detectó un incremento significativo del contenido de GSH y glutatión total en presencia del herbicida y el inhibidor.

Las hojas de las plantas resistentes presentaron un mayor nivel basal de la actividad GST (Figura 2). En la población sensible, se observó un incremento significativo en la actividad GSTs tras la aplicación individual, a pesar de no ser significativo tras la aplicación conjunta del herbicida e inhibidor de GSTs también se observa un incremento de la actividad GST (Figura 2), mientras que en la resistente no se detectaron cambios.

Las GST Phi y Tau participan en la desintoxicación de herbicidas (Evans *et al.*, 2017). En este estudio se abordó el nivel de expresión génica de dos GSTs de tipo Phi, GSTF2.4 y GSTF2.5. En nuestros resultados no se observaron diferencias significativas para ambas GSTFs ni entre tratamientos (Figura 3, A y B) ni entre poblaciones. Al no haber detectado modificaciones en los niveles de transcritos de estas GSTs se puede concluir que las variaciones detectadas de actividad GST (Figura 2) estarían originadas por cambios postraduccionales o por otro tipo de GSTs.



**Figura 3** - Expresión génica de *GSTF2.4* (A) y *GSTF2.5* (B) en dos poblaciones de *Amaranthus palmeri* (sensible y resistente a nicosulfurón) con diferentes tratamientos (n = 4); plantas sin tratar (C), inhibidor de GSTs (NBD-Cl 270 g m.a./ha) (INH), nicosulfurón (300 g m.a./ha) (H) e inhibidor de GSTs con nicosulfurón (INH + H). Las diferentes letras se refieren a diferencias significativas entre tratamientos de la misma población. Los análisis estadísticos fueron realizados a un nivel de significancia del 5 % (p-value  $\leq$  0.05).

Los resultados indican que en la población sensible se induce la síntesis de glutatión en respuesta al estrés oxidativo producido por el herbicida, tal y cómo se ha descrito en otras especies (Zabalza *et al.*, 2007). La inducción de la actividad enzimática GST detectada en la población sensible indica un papel de dichas enzimas en la respuesta fisiológica de la población al herbicida. De hecho, el efecto del herbicida sobre este parámetro se mantiene en presencia del inhibidor de las GSTs.

En el caso de la población resistente anteriormente, se detectó resistencia NTS al herbicida atrazina por metabolización de dicho herbicida (Nakka *et al.*, 2017b). Sin embargo, en el caso del nicosulfurón, los resultados de este estudio no confirman la implicación de las enzimas GST en la metabolización de dicho herbicida, ya que a pesar de haber una alta actividad basal en comparación con las plantas sensibles, el nicosulfurón no induce esta actividad.

Estos análisis ayudarán a comprender el metabolismo del glutatión y la implicación de las GSTs en la respuesta de las poblaciones sensibles y resistentes NTS a inhibidores de ALS. El conocimiento de los aspectos fisiológicos de las poblaciones resistentes así como el estudio de los mecanismos de resistencia NTS contribuirá a avanzar en el manejo de dichas poblaciones.

## **AGRADECIMIENTOS**

Proyecto PJUPNA04-2022, Universidad Pública de Navarra y el proyecto PID 2020 117723-RB del Ministerio de Ciencia e Innovación. Contrato de Clara Jimenez mediante el Programa Investigo (Gobierno de Navarra/UPNA).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Eceiza, M.-V.; Barco-Antoñanzas, M.; Gil-Monreal, M.; Huybrechts, M.; Zabalza, A.; Cuypers, A. & Royuela, M. (2023) - Role of oxidative stress in the physiology of sensitive and resistant *Amaranthus palmeri* populations treated with herbicides inhibiting acetolactate synthase. *Frontiers in Plant Science*, vol. 13, art. 1040456. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1040456>
- Evans, A.F.; O'Brien, S.R.; Ma, R.; Hager, A.G.; Riggins, C.W.; Lambert, K.N. & Riechers, D.E. (2017) - Biochemical characterization of metabolism-based atrazine resistance in *Amaranthus tuberculatus* and identification of an expressed GST associated with resistance. *Plant Biotechnology Journal*, vol. 15, n. 10, p. 1238-1249. <https://doi.org/10.1111/pbi.12711>
- Fernández-Escalada, M.; Gil-Monreal, M.; Zabalza, A. & Royuela, M. (2016) - Characterization of the *Amaranthus palmeri* physiological response to glyphosate in susceptible and resistant populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 64, n. 1, p. 95-106. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04916>
- Gaafar, R.M.; Osman, M.E.-A.H.; Abo-Shady, A.M.; Almohisen, I.A.A.; Badawy, G.A.; El-Nagar, M.M.F. & Ismail, G.A. (2022) - Role of antioxidant enzymes and glutathione S-Transferase in bromoxynil herbicide stress tolerance in wheat plants. *Plants*, vol. 11, n. 20, art. 2679. <https://doi.org/10.3390/plants11202679>
- Gaines, T.A.; Duke, S.O.; Morran, S.; Rigon, C.A.G.; Tranel, P.J.; Küpper, A. & Dayan, F.E. (2020) -Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 295, n. 30, p. 10307-10330. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.013572>
- Nakka, S.; Thompson, C.R.; Peterson, D.E. & Jugulam, M. (2017a) - Target site-based and non-target site-based resistance to ALS inhibitors in palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Weed Science*, vol. 65, n. 6, p. 681-689. <https://doi.org/10.1017/wsc.2017.43>
- Nakka, S.; Godar, A.S.; Thompson, C.R.; Peterson, D.E. & Jugulam, M. (2017b) - Rapid detoxification via glutathione S-transferase (GST) conjugation confers a high level of atrazine resistance in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Pest Management Science*, vol. 73, n. 11, p. 2236-2243. <https://doi.org/10.1002/ps.4615>
- Noctor, G.; Mhamdi, A.; Chaouch, S.; Han, Y.; Neukermans, J.; Marquez-Garcia, B.; Queval, G. & Foyer, C.H. (2012) - Glutathione in plants: An integrated overview. *Plant, Cell and Environment*, vol. 35, n. 2, p. 454-484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x>
- Peragón, J. & Amores-Escobar, M. T. (2018) - Olive tree glutathione S-transferase and its response against the herbicides oxyfluorfen and glyphosate. *Scientia Horticulturae*, vol. 231, p. 194-200. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.044>
- Rigon, C.A.G.; Gaines, T.A.; Küpper, A. & Dayan, F.E. (2020) - Metabolism-based herbicide resistance, the major threat among the non-target site resistance mechanisms. *Outlooks on Pest Management*, vol. 31, n. 4, p. 162-168. [https://doi.org/10.1564/v31\\_aug\\_04](https://doi.org/10.1564/v31_aug_04)
- Ward, S.M.; Webster, T.M. & Steckel, L.E. (2013) - Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*): A Review. *Weed Technology*, vol. 27, n. 1, p. 12-27. <https://doi.org/10.1614/WT-D-12-00113.1>
- Zabalza, A.; Gaston, S.; Sandalio, L.M.; del Río, L.A. & Royuela, M. (2007) - Oxidative stress is not related to the mode of action of herbicides that inhibit acetolactate synthase. *Environmental and Experimental Botany*, vol. 59, n. 2, p. 150-159. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.11.003>
- Zhou, Q.; Liu, W.; Zhang, Y. & Liu, K.K. (2007) - Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 89, n. 2, p. 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.04.004>
- Zulet, A.; Gil-Monreal, M.; Zabalza, A.; van Dongen, J.T. & Royuela, M. (2015) - Fermentation and alternative oxidase contribute to the action of amino acid biosynthesis-inhibiting herbicides. *Journal of Plant Physiology*, vol. 175, p. 102-112. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.12.004>