

Respuesta oxidativa en *Amaranthus palmeri* resistente a inhibidores de acetolactato sintasa por mecanismos no relacionados con la diana

Oxidative response in non-target site acetolactate synthase-inhibitor resistant *Amaranthus palmeri*

Ana Fernández, Mikel V. Eceiza, Clara Jiménez-Martínez, 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, Spain
(*E-mail: ana.zabalza@unavarra.es)
<https://doi.org/10.19084/rca.34994>

Recibido/received: 2024.01.15
Aceptado/accepted: 2024.02.28

RESUMEN

Amaranthus palmeri S. Watson es una mala hierba de amplia distribución que además presenta ciertas poblaciones con resistencias conocidas a herbicidas, como los inhibidores de la actividad de la enzima acetolactato sintasa (ALS). Si bien la mayor parte de las resistencias consisten en mecanismos relacionados con la diana (TS), en este estudio se ha utilizado una población con resistencia no relacionada con la diana (NTS). Se han comparado los efectos de dosis crecientes de nicosulfurón (un herbicida inhibidor de la actividad ALS) sobre el estatus oxidativo de una población de *A. palmeri* sensible y otra resistente seleccionada por mecanismos NTS. Se determinó la producción de Especies Reactivas de Oxígeno, daño oxidativo y sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los resultados indicaron cierto estrés oxidativo en la población sensible tratada con la dosis más alta del herbicida, al detectarse acumulación de H₂O₂ y presencia de peroxidación lipídica. En la población resistente no se detectaron estos cambios, sugiriendo que el estrés oxidativo estaría controlado por la implicación de ciertos sistemas antioxidantes, al haber detectado oxidación del ascorbato e incremento de la actividad enzimática de las peroxidasas en dicha población. Los resultados indican que la población resistente presentaría una fisiología complementaria a los mecanismos NTS que le permitiría minimizar el estrés oxidativo inducido por los inhibidores de ALS.

Palabras clave: estrés oxidativo, sistemas antioxidantes, mecanismo de resistencia, modo de acción, nicosulfurón

ABSTRACT

Amaranthus palmeri S. Watson is a widely spread weed, with populations with known resistances to herbicides, like acetolactate synthase (ALS) inhibitors. Although most of them consist of target-site (TS), in this study a population with non-target site mechanisms (NTS) has been used. Effects of increasing doses of nicosulfuron (ALS-inhibiting herbicide) regarding oxidative parameters have been compared in a sensitive and a NTS resistant population. Production of Reactive Oxygen Species, oxidative damage, and antioxidant systems were determined. Results indicated some oxidative stress in the sensitive population treated with the highest herbicide dose, showing H₂O₂ accumulation and presence of lipid peroxidation. In the resistant populations, these effects were not detected, suggesting that oxidative stress would be controlled by the implication of antioxidant systems, like ascorbate oxidation and increase of the activity of peroxidases in this population. Results indicate that the resistant population may have a complementary physiology to NTS resistance mechanisms that allows it to minimise the oxidative stress induced by ALS inhibitors.

Keywords: oxidative stress, antioxidant systems, resistance mechanism, mode of action, nicosulfuron

INTRODUCCIÓN

Amaranthus palmeri S. Watson es una mala hierba de amplia distribución e impacto y una especie potencialmente invasora. Además, es muy propensa a desarrollar biotipos resistentes a herbicidas. De hecho, ya existen poblaciones con resistencias conocidas a herbicidas de 10 mecanismos de acción diferentes (Heap, 2024), entre ellos los inhibidores de la actividad de la enzima acetolactato sintasa (ALS). La mayor parte de las resistencias a inhibidores de la ALS en *A. palmeri* y en otras especies son por mecanismos relacionados con la diana (*target-site* o TS) (Eceiza *et al.*, 2023), pero los mecanismos no relacionados con la diana (*non-target site* o NTS) cada vez están cobrando mayor importancia.

ALS es la primera enzima común en la ruta de biosíntesis de los aminoácidos ramificados leucina, isoleucina y valina (Zhou *et al.*, 2007). La inhibición de esta enzima por los herbicidas (mecanismo de acción) está ampliamente estudiada, sin embargo, los efectos fisiológicos de esta inhibición que eventualmente llevan a la muerte de la planta (modo de acción) no son tan conocidos. Uno de estos efectos, solo parcialmente estudiado, es el estrés oxidativo. El estrés oxidativo se desarrolla como un resultado del desequilibrio entre la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) y las actividades antioxidantes de la planta, que se puede manifestar, en unas primeras fases, en una inducción antioxidante y, si es suficientemente severo, en daño oxidativo a biomoléculas, por ejemplo, en peroxidación lipídica (Demidchik, 2015).

Recientemente, un estudio del presente grupo de investigación concluyó que el estrés oxidativo causado por uninhibidor de la ALS, la sulfonilurea nicosulfurón, en una población sensible de *A. palmeri* no se observaba en una resistente TS (Eceiza *et al.*, 2023). Sin embargo, quedaba por abordar la respuesta oxidativa de una población resistente NTS.

El objetivo de este estudio ha sido ampliar el conocimiento fisiológico de los mecanismos de resistencia NTS, concretamente, del impacto que tienen en el estrés oxidativo inducido por herbicidas inhibidores de la ALS. Para ello, se ha empleado nicosulfurón, sobre una población sensible (S) y otra resistente (R), en la cual se había descrito resistencia de NTS a sulfonilureas por metabolización por citocromos P450 (Nakka *et al.*, 2017).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y tratamientos

La población sensible, originaria de Carolina del Norte, EEUU, fue cedida por el Dr. Gaines (Universidad Estatal de Colorado, CO, EEUU). La población resistente, originaria de Kansas, EEUU, fue cedida por la Dra. Jugulam (Kansas State University, EEUU). En esa población se detectó un mecanismo de resistencia TS, en concreto, una mutación en la posición Pro-197 del gen *ALS*, en el 30% de los individuos, mientras que el 70% presentaron resistencia de tipo NTS debido a metabolización mediada por P450 (Nakka *et al.*, 2017). Las plantas de las dos poblaciones fueron crecidas en cultivo hidropónico puro con aireación forzada (Fernández-Escalada *et al.*, 2016).

A los 19-22 días de edad (BBCH 14), sobre las poblaciones S y R, se aplicó el herbicida nicosulfurón (SAMSON®) en dos dosis: dosis recomendada equivalente a 0,06 kg i.a ha⁻¹ y 3 veces la dosis recomendada. Se dejaron algunas plantas sin tratar (controles) en ambas poblaciones. Todas las plantas permanecieron en estado vegetativo hasta el muestreo, que se realizó a los siete días. Se muestrearon las hojas en viales que fueron inmediatamente congelados y almacenados a -80 °C. y el tejido foliar fue triturado antes de las determinaciones analíticas listadas a continuación.

Determinaciones analíticas

En las plantas de la población R, se extrajo el ADN genómico y se amplificaron, mediante PCR, los fragmentos CAD y BE del gen que codifica la enzima ALS, ya que son los fragmentos en los que aparecen mutaciones que confieren resistencia a los herbicidas inhibidores de la ALS. En el caso del fragmento CAD, el primer forward contenía la siguiente secuencia: 5'-CGCCCTCTTCAAATCTCATC-3', y el reverse, la secuencia: 5'-CAATCAAAACAGGTCCAGGTC-3' (Torra *et al.*, 2020). En el caso del fragmento BE, el primer forward contenía la secuencia: 5'-TGCTATTGGAGCTGCTGTTG-3', y el reverse, la secuencia: 5'-CCTTCTTCCATCACCTCTG-3' (Torra *et al.*, 2020). Las muestras fueron secuenciadas en el laboratorio de STAB VIDA (Caparica, Portugal).

Se midió la concentración de H_2O_2 fluorométricamente, como indicador de EROs, tal y como se había descrito anteriormente (Eceiza *et al.*, 2023). Como indicador de la peroxidación lipídica, un signo inequívoco de estrés oxidativo, se midió el contenido de malondialdehído (MDA) espectrofotométricamente (Eceiza *et al.*, 2023).

La actividad de las enzimas antioxidantes glutatión reductasa (GR) y peroxidasa (POX) se midió espectrofotométricamente (Eceiza *et al.*, 2023). El contenido de ácido ascórbico y su forma oxidada, dehidroascorbato, fueron determinados mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (Herrero-Martínez *et al.*, 2000).

Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos, las plantas se separaron por poblaciones: S y R. Las posibles diferencias entre los controles S y R se evaluaron mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$). Las posibles diferencias entre tratamientos dentro de una misma población se evaluaron mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba posthoc HSD de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se secuenció el gen ALS de todas las plantas R utilizadas en este estudio y se comprobó que ninguna

presentaba mutaciones en los fragmentos CAD o BE. Así, todas las determinaciones analíticas se llevaron a cabo en individuos de la población R que no presentaban mutaciones genéticas en la enzima ALS y con resistencia al herbicida nicosulfurón, una resistencia NTS.

En cuanto al daño oxidativo, en ambas poblaciones tiende a incrementarse la peroxidación lipídica (estimada por la producción de MDA, Figura 1B) de forma proporcional a la dosis de herbicida, especialmente en la población S. Este incremento está probablemente relacionado con la sobreproducción de EROs (Figura 1A) en las plantas sensibles tratadas con nicosulfurón. Sin embargo, no hay cambios significativos. Se descarta que el daño oxidativo sea una de las causas de muerte de la planta.

La Figura 1A, muestra que no hay cambios significativos en los niveles de H_2O_2 entre los diferentes tratamientos de la misma población, aunque se observa un incremento no significativo en la población S con 3 veces la dosis recomendada, probablemente achacable a la acción herbicida. Este incremento de EROs con el herbicida nicosulfurón se ha observado anteriormente, tanto en *A. palmeri* (Eceiza *et al.*, 2023) como en otras especies, como el maíz (Wang *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019). Los mecanismos de producción de EROs inducidos por herbicidas inhibidores de la ALS son desconocidos, pero hay varias hipótesis al respecto. Una de ellas es la activación del metabolismo hipóxico o fermentación en respuesta al herbicida debido a

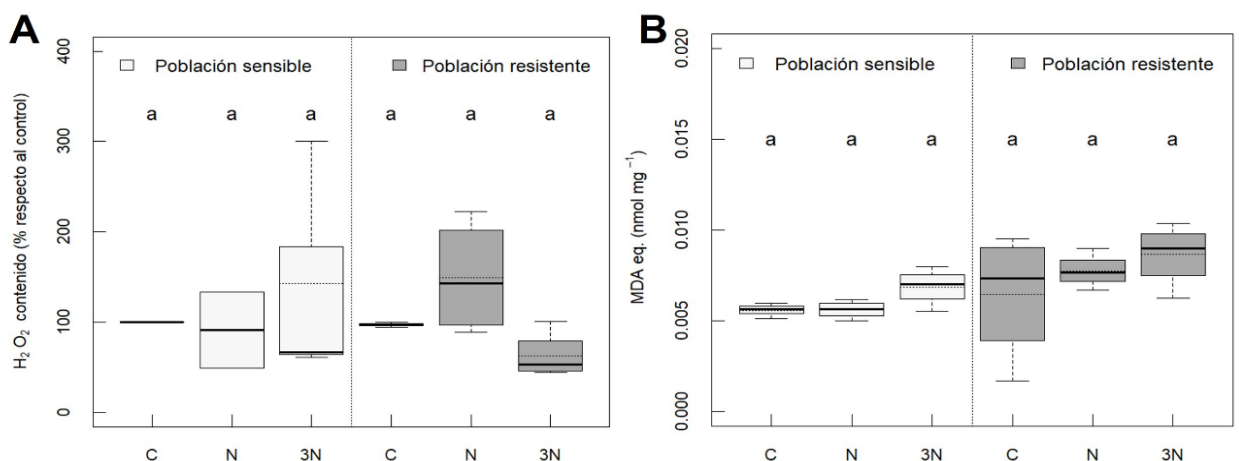


Figura 1 - Contenido de H_2O_2 (A) y equivalentes de malondialdehído o MDA (B), en poblaciones de *Amaranthus palmeri* sensible y resistente a inhibidores de ALS. Tratamientos: sin tratar (control, C), dosis recomendada de nicosulfurón (N), y 3 veces la dosis recomendada de nicosulfurón (3N). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos de cada población (ANOVA, HSD Tukey, $p < 0,05$).

un menor uso de carbohidratos por parte de las raíces, lo que lleva a una disminución brusca de las reacciones redox, con una posterior producción de H_2O_2 (Gaston *et al.*, 2002; Zabalza *et al.*, 2005). En cambio, no se observa este incremento de H_2O_2 en la población R (Figura 1A), abriendo la puerta a que haya mecanismos de resistencia NTS que estén evitando la producción de EROs.

Se midieron las actividades GR y POX como dos de los principales sistemas antioxidantes enzimáticos (Elavarthi & Martin, 2010). No hubo cambios significativos en la actividad GR en la población S e incluso disminuyó con la dosis de herbicida en la población R (Figura 2A). Sin embargo, la actividad POX sí se vio claramente inducida por el

tratamiento de 3 veces la dosis recomendada, de forma muy evidente en la población S (Figura 2B). En cuanto al metabolismo del ascorbato, medido como indicador de la actividad antioxidante no enzimática, no se observaron tendencias destacables (Figura 2C).

Las peroxidasa son una clase muy amplia de enzimas que, en función de las circunstancias, pueden actuar como productoras o como consumidoras de EROs. En un ciclo peroxidativo normal, el estado basal de las POX consiste en reducir el H_2O_2 a agua, y entonces parte de la enzima se oxida. Sin embargo, cuando el sustrato es un productor de EROs, el radical derivado interactúa con una molécula de oxígeno, liberando una molécula de superóxido

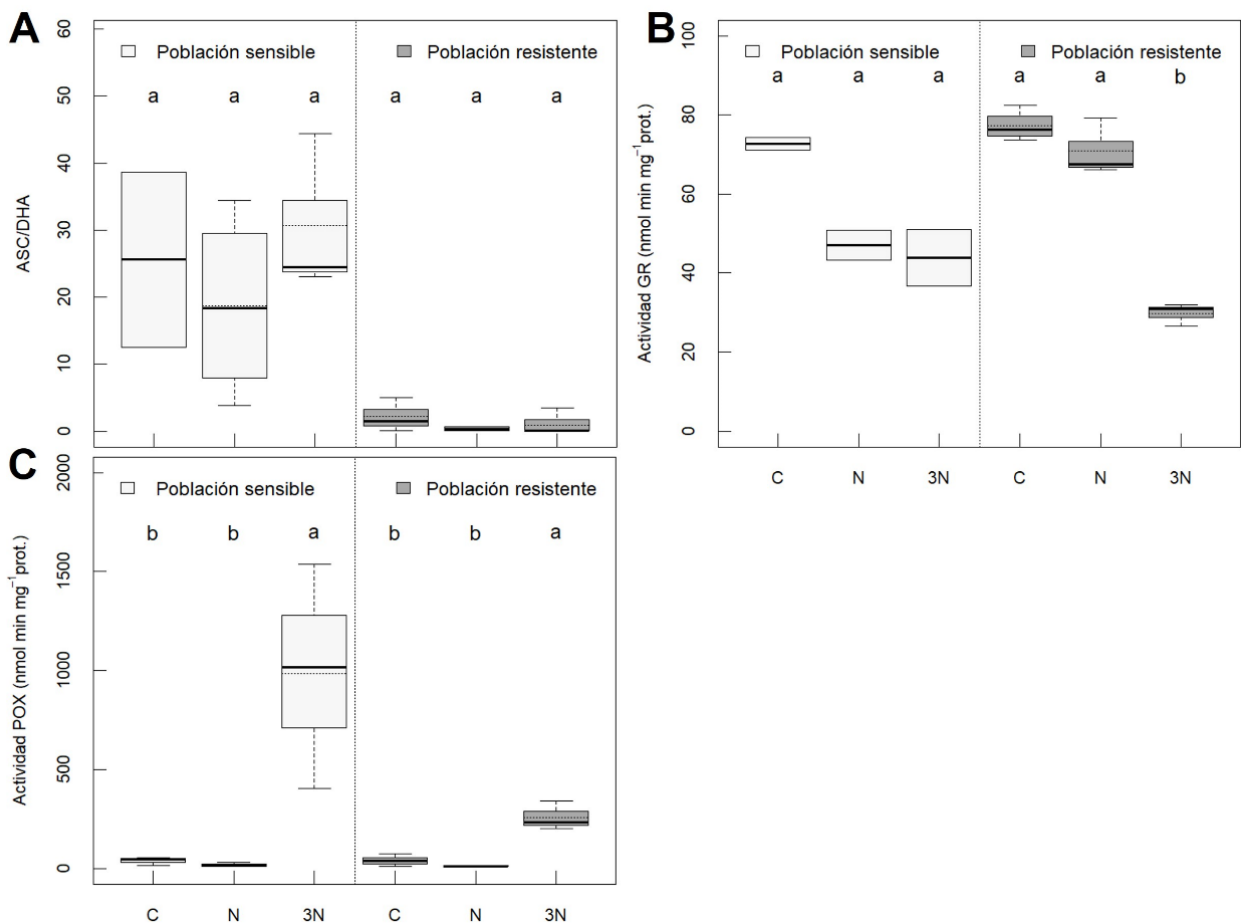


Figura 2 - Actividad glutatión reductasa o GR (A); actividad de las peroxidasa o POX (B); y cociente entre contenido de ascorbato o ASC y dehidroascorbato o DHA (C), en poblaciones de *Amaranthus palmeri* sensible y resistente a inhibidores de ALS. Tratamientos: sin tratar (control, C), dosis recomendada de nicosulfurón (N), y 3 veces la dosis recomendada de nicosulfurón (3N). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey, $p < 0,05$).

(O₂⁻), precursor del H₂O₂ en la reacción de Fenton (Shigeto & Tsutsumi, 2016). Teniendo en cuenta la similitud entre los resultados de EROs y de actividad POX, y de la nula activación de los demás antioxidantes en la población S, es factible la hipótesis de que las peroxidasas estén provocando esa sobreproducción de H₂O₂ en las plantas sensibles tratadas con nicosulfurón.

En la población resistente, en cambio, el incremento en la actividad POX (Figura 2B) y la oxidación del ascorbato (Figura 2C) pueden estar controlando los niveles de EROs y, por tanto, el estrés oxidativo causado por el herbicida. Esto podría ser considerado como un mecanismo de resistencia NTS complementario, pero en ningún caso el único, ya que, como se ha sugerido antes, el estrés oxidativo no es un efecto letal de la inhibición de la ALS.

CONCLUSIONES

Los resultados indican cierto estrés oxidativo en plantas sensibles de *A. palmeri* tratadas con la dosis más alta de nicosulfurón, aunque este estrés oxidativo no es suficientemente severo como para ser causa de muerte de la planta. En las plantas resistentes, en cambio, no se observa estrés oxidativo, sugiriendo que la producción de H₂O₂ puede estar controlada por la implicación de ciertos sistemas antioxidantes (actividad POX y ascorbato). Esto podría indicar que la población resistente presenta una fisiología complementaria a los mecanismos NTS para paliar el estrés oxidativo inducido por los inhibidores de la ALS.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto 2020 117723-RB-100 del Ministerio de Ciencia e Innovación. Contrato de Clara Jimenez mediante el Programa Investigo (Gobierno de Navarra/UPNA).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Demidchik, V. (2015) - Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, vol. 109, p. 212-228. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
- 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>
- Elavarthi, S. & Martin, B. (2010) - Spectrophotometric Assays for Antioxidant Enzymes in Plants. In: Walker, J.M. (Ed.) - *Methods in Molecular Biology book series*, vol. 369, p. 273-279. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0>
- 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>
- Gaston, S.; Zabalza, A.; Gonzalez, E.M.; Arrese-Igor, C.; Aparicio-Tejo, P.M. & Royuela, M. (2002) - Imazethapyr, an inhibitor of the branched-chain amino acid biosynthesis, induces aerobic fermentation in pea plants. *Physiologia Plantarum*, vol. 114, n. 4, p. 524-532. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140404.x>
- Heap, I. (2024) - *The International Herbicide-Resistant Weed Database*. [cit. 2024.02.14]. www.weedscience.org
- Herrero-Martínez, J.M.; Simó-Alfonso, E.F.; Ramis-Ramos, G.; Deltoro, V.I.; Calatayud, A. & Barreno, E. (2000) - Simultaneous Determination of L-Ascorbic Acid, Glutathione, and Their Oxidized Forms in Ozone-Exposed Vascular Plants by Capillary Zone Electrophoresis. *Environmental Science & Technology*, vol. 34, n. 7, p. 1331-1336. <https://doi.org/10.1021/es991068l>
- Liu, S.; He, Y.; Tian, H.; Yu, C.; Tan, W.; Li, Z. & Duan, L. (2019) - Application of brassinosteroid mimetics improves growth and tolerance of maize to nicosulfuron toxicity. *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 38, n. 2, p. 701-712. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9883-y>
- Nakka, S.; Thompson, C.R.; Peterson, D.E. & Jugulam, M. (2017) - 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>
- Shigeto, J. & Tsutsumi, Y. (2016) - Diverse functions and reactions of class III peroxidases. *New Phytologist*, vol. 209, n. 4, p. 1395-1402. <https://doi.org/10.1111/nph.13738>
- Torra, J.; Royo-Esnal, A.; Romano, Y.; Osuna, M.D.; León, R.G. & Recasens, J. (2020) - *Amaranthus palmeri* a new invasive weed in Spain with herbicide resistant biotypes. *Agronomy*, vol. 10, n. 7, art. 1332. <https://doi.org/10.3390/agronomy10070993>
- Wang, J.; Zhong, X.; Zhu, K.; Lv, J.; Lv, X.; Li, F. & Shi, Z. (2018) - Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activity, and gene expression patterns in a pair of nearly isogenic lines of nicosulfuron-exposed waxy maize (*Zea mays* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, n. 19, p. 19012-19027. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2105-0>
- Zabalza, A.; González, E.M.; Arrese-Igor, C. & Royuela, M. (2005) - Fermentative metabolism is induced by inhibiting different enzymes of the branched-chain amino acid biosynthesis pathway in pea plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, n. 19, p. 7486-7493. <https://doi.org/10.1021/jf050654x>
- 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>