

Expresión génica y actividad GST en el modo de acción de los herbicidas inhibidores de la síntesis de aminoácidos

GST expression and activity in the mode of action of amino acid synthesis-inhibiting herbicides

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

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

(*E-mail: royuela@unavarra.es)

<https://doi.org/10.19084/rca.34997>

Recibido/received: 2024.01.15

Aceptado/accepted: 2024.02.28

RESUMEN

El glifosato (inhibidor de la 5-enolpiruvil-siquimato-3-fosfato sintasa, EPSPS) y los inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) inhiben dos rutas de biosíntesis de aminoácidos diferentes, pero comparten varios efectos fisiológicos en su modo de acción, incluidos un moderado estrés oxidativo y alteraciones en el metabolismo del glutatión. Las glutatión S-transferasas (GSTs) son enzimas que catalizan la conjugación de xenobióticos con el glutatión, y tienen funciones antioxidantes, por lo que están relacionadas con la respuesta al estrés abiótico. Con el objetivo de conocer la implicación de las GSTs en la respuesta a estos herbicidas, se han analizado la actividad y la expresión de las GSTs en cinco poblaciones de *Amaranthus palmeri*: sensible y resistente a glifosato; sensible y resistente a inhibidores de la ALS; y resistente múltiple (al glifosato y los inhibidores de la ALS). En todos los casos la resistencia era por mecanismos *target-site*. Las plantas fueron tratadas con diferentes dosis de glifosato o los inhibidores de la ALS nicosulfurón y piritiobac. En las plantas sensibles tanto el glifosato como los inhibidores de la ALS provocaron un incremento de la actividad GST y de la expresión génica de la subfamilia de las Phi GSTs, proporcional a la dosis de tratamiento. Probablemente, esta inducción de las GSTs está relacionada con un aumento de la demanda antioxidante en las plantas sensibles tratadas. No se observaron cambios destacables en las plantas resistentes *target-site*, evidenciando que la inducción de las GSTs es un efecto de la inhibición enzimática de la EPSPS o la ALS.

Palabras clave: glutatión S-transferasa, glifosato, inhibidores de la ALS, resistencia *target-site*, *Amaranthus palmeri*.

ABSTRACT

Glyphosate (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase or EPSPS inhibitor) and acetolactate synthase (ALS) inhibitors inhibit two different amino acid synthesis pathways, but share several physiological effects in their mode of action, including a moderate oxidative stress and alterations in glutathione metabolism. Glutathione S-transferases (GSTs) are enzymes which catalyse the conjugation of xenobiotics with glutathione, and perform antioxidant functions. Therefore, they are closely linked to the response to abiotic stress. Aiming at understanding the implication of GSTs in the response to these herbicides, GST activity and gene expressions have been analysed in five *Amaranthus palmeri* populations: glyphosate-sensitive, glyphosate-resistant, ALS-inhibitor sensitive, ALS-inhibitor resistant, and multiple resistant (to glyphosate and ALS inhibitors). Resistance was conferred by target-site mechanisms in all the cases. Plants were treated with different doses of glyphosate or the ALS inhibitors nicosulfuron and pyriithiobac. Both glyphosate and ALS inhibitors provoked an increase of GST activity and Phi GST gene expression, proportionally to the herbicide dose in sensitive plants. Probably, this GST induction was due to an increased antioxidant demand in treated sensitive plants. No remarkable changes were found in target-site resistant populations, evidencing that GST induction is an effect of the enzymatic inhibition of EPSPS or ALS.

Keywords: glutathione S-transferase, glyphosate, ALS inhibitors, *target-site* resistance, *Amaranthus palmeri*.

INTRODUCCIÓN

El glifosato y los inhibidores de la acetolactato sintasa (ALS) son herbicidas que inhiben la síntesis de aminoácidos como mecanismo de acción: el glifosato inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos y los inhibidores de la ALS inhiben la síntesis de aminoácidos ramificados. La 5-enolpiruvil-siquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) y la ALS son enzimas diana muy estudiadas, por lo que el mecanismo de acción de estos herbicidas es bien conocido desde hace tiempo, y son de los herbicidas más usados a nivel mundial. Sin embargo, su modo de acción, conocido como la secuencia completa de eventos que culmina provocando algún daño en la planta que eventualmente puede ser la muerte, no está completamente descifrado.

Hasta la fecha, los estudios dirigidos a conocer el modo de acción del glifosato y los inhibidores de la ALS apuntan a que, a pesar de inhibir enzimas diferentes en rutas metabólicas diferentes, la respuesta fisiológica de la planta a ambos herbicidas es similar. Entre estos efectos comunes están la acumulación de carbohidratos (Orcaray *et al.*, 2010), la disminución de proteína soluble (Zulet *et al.*, 2013) y el estrés oxidativo (Eceiza *et al.*, 2022, 2023). Una familia de enzimas que se ha hipotetizado que puede tener un papel relevante en la respuesta fisiológica a estos herbicidas es la familia de las glutatión S-transferasas (GSTs). Las GSTs son una familia muy amplia de enzimas que, usando el glutatión como sustrato, realizan varias funciones: pueden actuar como antioxidantes, transportadoras... Sin embargo, la función más conocida de las GSTs es la detoxificación de compuestos xenobióticos por conjugación con el glutatión (Noctor *et al.*, 2012). Varios herbicidas pueden ser detoxificados por la GST, incluyendo algunos inhibidores de la ALS (Zhang *et al.*, 2021), mientras que la detoxificación del glifosato por este mecanismo no se ha descrito.

El uso masivo del glifosato y los inhibidores de la ALS ha acarreado efectos medioambientales y económicos poco deseables, como la evolución de biotipos de malas hierbas resistentes. Una de las especies que más biotipos resistentes han desarrollado es *Amaranthus palmeri* S. Watson, una mala hierba con potencial invasor en la que se han detectado poblaciones resistentes al glifosato, a inhibidores de la ALS, y resistentes múltiples a ambos grupos de herbicidas (Barco-Antoñanzas *et al.*, 2022). En el presente estudio, se han usado poblaciones sensibles, resistentes y resistentes múltiples (todas ellas por mecanismos TS) de *Amaranthus palmeri* para conocer la implicación de las GSTs en el modo de acción del glifosato y de los inhibidores de la ALS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y tratamientos

La resistencia al glifosato de las poblaciones resistente al glifosato (GLR) y resistente múltiple (RM) venía dada por una amplificación génica de la EPSPS (Fernández-Escalada *et al.*, 2016; Barco-Antoñanzas *et al.*, 2022). Las poblaciones resistentes a inhibidores de ALS (AIR) y RM contenían mutaciones en el gen ALS que confiere resistencia cruzada a varias materias activas pertenecientes al grupo de inhibidores de la ALS (Torra *et al.*, 2020; Barco-Antoñanzas *et al.*, 2022; Eceiza *et al.*, 2023). Las plantas fueron crecidas en cultivo hidropónico puro con aireación forzada (Fernández-Escalada *et al.*, 2016). A los 19-22 días de edad se aplicaron los distintos tratamientos (Tabla 1). Se eligieron los inhibidores de ALS que habían seleccionado dichas resistencias. Los herbicidas se aplicaron con un aerógrafo con regulación de presión y volumen. En todas las poblaciones se utilizaron como control plantas sin tratar. Se muestrearon las hojas a los tres días en el caso del glifosato y de siete días en el caso del nicosulfurón.

Tabla 1 - Tratamientos aplicados a las distintas poblaciones

Población	Descripción	Herbicida aplicado	Dosis aplicada Kg ia/ha
GLS	Sensible de referencia para GLR	Glifosato	DR = 0,84 kg ha ⁻¹
GLR	Resistente a Glifosato		3 DR = 2,52 kg ha ⁻¹
ALS	Sensible de referencia para AIR	Nicosulfurón	DR = 0,06 kg ha ⁻¹
AIR	Resistente a nicosulfurón		3 DR = 0,18 kg ha ⁻¹
GLS	Sensible de referencia para RM	Glifosato + Piritiobac	0,84 kg ha ⁻¹ + 0,09 kg ha ⁻¹
RM	Resistente múltiple		

Actividad y expresión génica de la GST

La actividad GST se midió espectrofotométricamente como la conjugación del 1-cloro-2,4-dinitro-benceno a 340 nm, como descrito anteriormente (Miyata *et al.*, 2004). En cuanto a la expresión génica, se calculó el nivel de transcripción relativo para genes que codifican GSTs de las subfamilias Phi y Tau mediante PCR cuantitativa (qPCR), con primers diseñados a partir de la secuencia de *Amaranthus hypochondriacus* y con una eficiencia de entre 90 y 110%.

Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos, las plantas se separaron por poblaciones. Las diferencias entre los controles de las plantas resistentes y sus sensibles de referencia (GLR y GLS; AIR y AIS; RM y GLS) se evaluaron mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$). Las diferencias entre tratamientos dentro de una misma población se evaluaron mediante ANOVA de una vía, seguida de una prueba posthoc HSD ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad GST basal fue similar en las poblaciones GLS y GLR y en las poblaciones AIS y AIR. Además, en las poblaciones sensibles, se incrementó de forma proporcional a la dosis de glifosato o nicosulfurón (Figura 1). Debido a la falta de evidencias de que la GST pueda degradar el glifosato y a la similitud de la respuesta a ambos herbicidas, es probable que el incremento de la actividad GST no esté implicando una metabolización de los herbicidas, sino que podría ser una respuesta relacionada con el estrés oxidativo causado por estos

en las poblaciones sensibles. Esta hipótesis ha sido propuesta anteriormente (Miteva *et al.*, 2010) e iría en línea con estudios previos sobre estrés oxidativo inducido por glifosato o nicosulfurón en estas poblaciones (Eceiza *et al.*, 2022, 2023).

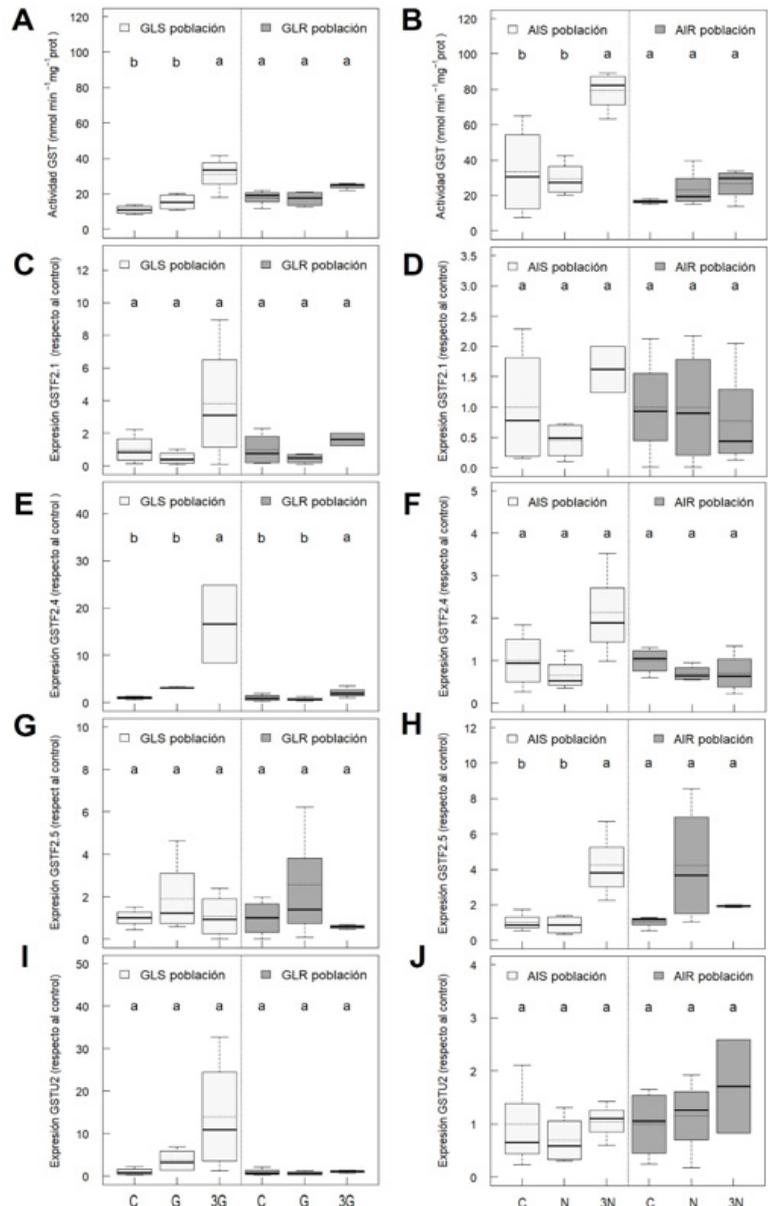


Figura 1 - Actividad GST (A, B); expresión génica de GST Phi: *GSTF2.1* (C, D), *GSTF2.4* (E, F) y *GSTF2.5* (G, H); y expresión génica de GST Tau: *GSTU2* (I, J), en poblaciones de *Amaranthus palmeri* sensible a glifosato (GLS), resistente a glifosato (GLR), sensible a inhibidores de ALS (AIS) y resistente a inhibidores de ALS (AIR). Tratamientos con herbicidas: sin tratar (control, C), dosis recomendada de glifosato (G) o nicosulfurón (N), y 3 veces la dosis recomendada de glifosato (3G) o nicosulfurón (3N). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey, $p < 0,05$).

Las subfamilias de GST Phi y Tau son las más abundantes e importantes en plantas. Se caracterizan por ser inducidas en respuesta a estreses ambientales bióticos y abióticos, como el generado

por los herbicidas y, sobre todo en el caso de las Phi, por conferir protección ante el estrés oxidativo (Lee *et al.*, 2014). Se midió la expresión génica de las GST Phi (*GSTF2.1*, *GSTF2.4*, *GSTF2.5*) y Tau (*GSTU2*). Por lo general, las expresiones génicas de las GST Phi tendieron a incrementarse acorde a la dosis de glifosato o nicosulfurón (Figura 1). Por todo lo dicho, es probable que el incremento de actividad GST se deba, mayoritariamente, a un incremento de las GST Phi en respuesta al estrés oxidativo inducido por ambos herbicidas en las poblaciones sensibles (Eceiza *et al.*, 2022, 2023).

Para corroborar este efecto de los herbicidas en la actividad y expresión GST, la población GLS (que también se comprobó como sensible a los inhibidores de la ALS) se comparó con la población RM (Figura 2), resistente a glifosato y al inhibidor de la ALS piritiobac por mecanismos *target-site* (Barco-Antoñanzas *et al.*, 2022). Al igual que en las poblaciones GLR y AIR, los herbicidas no indujeron un incremento de la actividad GST en esta población, tendencia que sí se observó en la población GLS (Figura 2A). Nuevamente, las expresiones génicas tendieron a aumentar con los herbicidas en ambas poblaciones.

CONCLUSIÓN

Tanto el glifosato como los inhibidores de la ALS provocaron, en las plantas sensibles, un incremento de la actividad GST y de expresión génica, sobre todo de las Phi GSTs proporcional a la dosis de herbicida. En las plantas resistentes *target-site*, en cambio, los ligeros cambios en las expresiones génicas no se tradujeron en mayor actividad GST, evidenciando que la inducción de esta actividad enzimática es un efecto de la inhibición de la EPSPS o la ALS.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto PID2020 117723-RB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación. Contrato de Clara Jimenez mediante el Programa Investigador (Gobierno de Navarra/UPNA).

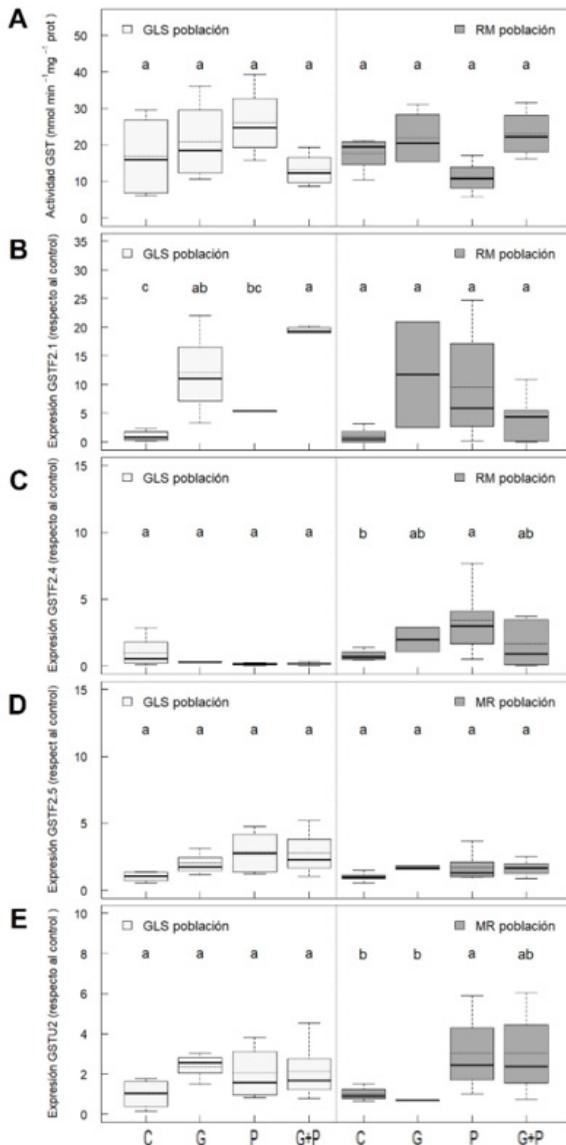


Figura 2 - Actividad GST (A); expresión génica de GST Phi: *GSTF2.1* (B), *GSTF2.4* (C) y *GSTF2.5* (D); y expresión génica de GST Tau: *GSTU2* (E), en poblaciones de *Amaranthus palmeri* sensible a glifosato e inhibidores de ALS (GLS) y resistente múltiple a ambos herbicidas (RM). Tratamientos con herbicidas: sin tratar (control, C), dosis recomendada de glifosato (G) o piritiobac (P), y combinación de dosis de glifosato y piritiobac (G+P). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en cada población (ANOVA, HSD Tukey, $p < 0,05$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barco-Antoñanzas, M.; Gil-Monreal, M.; Eceiza, M.V.; Royuela, M. & Zabalza, A. (2022) - Primary metabolism in an *Amaranthus palmeri* population with multiple resistance to glyphosate and pyriithiobac herbicides. *Plant Science*, vol. 318, art. 111212. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111212>
- 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>
- Eceiza, M.V.; Gil-Monreal, M.; Barco-Antoñanzas, M.; Zabalza, A. & Royuela, M. (2022) - The moderate oxidative stress induced by glyphosate is not detected in *Amaranthus palmeri* plants overexpressing EPSPS. *Journal of Plant Physiology*, vol. 274, art. 153720. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153720>
- 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>
- Lee, S.H.; Li, C.W.; Koh, K.W.; Chuang, H.Y.; Chen, Y.R.; Lin, C.S. & Chan, M.T. (2014) - MSRB7 reverses oxidation of GSTF2/3 to confer tolerance of *Arabidopsis thaliana* to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, vol. 65, n. 17, p. 5049-5062. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru270>
- Miteva, L.P.E.; Ivanov, S.V. & Alexieva, V.S. (2010) - Alterations in glutathione pool and some related enzymes in leaves and roots of pea plants treated with the herbicide glyphosate. *Russian Journal of Plant Physiology*, vol. 57, n. 1, p. 131-136. <https://doi.org/10.1134/S1021443710010188>
- Miyata, M.; Takano, H.; Guo, L.Q.; Kiyoshi, N. & Yamazoe, Y. (2004) - Grapefruit juice intake does not enhance but rather protects against aflatoxin B1-induced liver DNA damage through a reduction in hepatic CYP3A activity. *Carcinogenesis*, vol. 25, n. 2, p. 203-209. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg194>
- 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>
- Orcaray, L.; Igal, M.; Marino, D.; Zabalza, A. & Royuela, M. (2010) - The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. *Pest Management Science*, vol. 66, n. 3, p. 262-269. <https://doi.org/10.1002/ps.1868>
- 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. 993. <https://doi.org/10.3390/agronomy10070993>
- Zhang, Y.; Gao, S.; Hoang, M.; Wang, Z.; Ma, X.; Zhai, Y.; Li, N.; Zhao, L.; Fu, Y. & Ye, F. (2021) - Protective efficacy of phenoxyacetyl oxazolidine derivatives as safeners against nicosulfuron toxicity in maize. *Pest Management Science*, vol. 77, n. 1, p. 177-183. <https://doi.org/10.1002/ps.6005>
- Zulet, A.; Gil-Monreal, M.; Villamor, J.G.; Zabalza, A.; van der Hoorn, R.A.L. & Royuela, M. (2013) - Proteolytic pathways induced by herbicides that inhibit amino acid biosynthesis. *PLoS ONE*, vol. 8, n. 9, art. e73847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073847>