



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Tema: Diseño racional de variantes mutantes de la enzima acetohidroxiácido sintasa de quinua (*Chenopodium quinoa*) resistentes a herbicidas comerciales

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Jessenia Maribel Vega Sogso

Tutor: PhD. Mario Daniel García Solís

Ambato-Ecuador

Septiembre - 2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Mario Daniel García Solís

CERTIFICA:

Que el presente trabajo ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 25 de julio de 2021

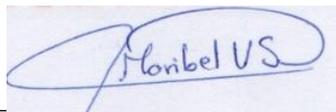
Ing. Mario Daniel García Solís, PhD.

C.I. 110360547-1

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jessenia Maribel Vega Sogso, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniería en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales; excepción de las citas bibliográficas.

A handwritten signature in blue ink, reading "Maribel V.S.", enclosed in a blue oval. The signature is positioned above a horizontal line.

Jessenia Maribel Vega Sogso

C.I. 180435246-4

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Dr José Homero Vargas López

Presidente del tribunal

Dr. Irvin Ricardo Tubon Usca

C.I.0604250357

M.Sc. Mayra Fernanda Chico Terán

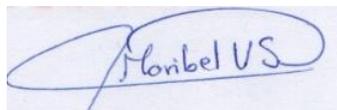
C.I. 1003327044

Ambato, 06 de septiembre de 2021

DERECHO DEL AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos de línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Trabajo de Titulación dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta producción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a blue oval. The signature reads "Jessenia Maribel Vega Sogso".

Jessenia Maribel Vega Sogso

C.I. 180435246-4

AUTOR

DEDICATORIA

Doy gracias a Dios por darme la vida y permitirme vivir cada día, por protegerme y cuidarme, por darme la suficiente sabiduría e inteligencia para permitirme cumplir con todas mis metas, y logros.

A mis padres, Rodrigo y Angélica por el amor que me brindan cada día, el apoyo incondicional, por el gran esfuerzo que realizaron para que yo pueda realizar mis estudios ya que nunca me hicieron faltar nada, por enseñarme que el trabajo duro tiene su recompensa, la humildad y la sencillez que han logrado convertirme en la persona que soy ahora.

A mis hermanos Carlos y Katherine por el apoyo incondicional, por los consejos y la ayuda cuando más lo eh necesitado para salir adelante.

A mi esposo y mejor amigo Rafael, por apoyar, alentarme para seguir adelante, por estar en los momentos duros y gracias al amor que me brindo me ayudo a superar esos obstáculos.

Jessenia Maribel Vega Sogso

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato por permitirme realizar mis estudios profesionales y a la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por formarme como profesional.

A todos los docentes que formaron parte de mi educación durante este tiempo en la carrera, por la enseñanza, los conocimientos transmitidos y la paciencia a lo largo de la carrera.

A mi tutor Mario García, por la confianza, el tiempo empleado en el desarrollo de este proyecto pese a las circunstancias de esta pandemia que estamos atravesando, gracias por su entrega, por transmitirme sus valiosos conocimientos. Es una persona humilde y con gran experiencia la cual lo ha demostrado estoy contenta de haber trabajado junto a él y orgullosa al mismo tiempo de haberlo conocido ya que con su ayuda puede culminar mi trabajo de titulación.

A mis compañeros de clase, quienes de una u otra manera fueron una compañía en los buenos y malos momentos durante toda la carrera

Gracias a todos

Jessenia Vega Sogso

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

PORTADA.....	I
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHO DEL AUTOR.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Antecedentes investigativos.....	1
1.1.1 La Quinoa orígenes y características.....	1
1.1.2 Valor Nutricional.....	1
1.1.3 Factores que afectan la producción y crecimiento en la quinua.....	2
1.1.4 AHAS (<i>A. thaliana</i>) como modelo para el estudio de herbicidas comerciales.....	3
1.1.5 Acetohidroxiácido Sintasa.....	3
1.2. Objetivos.....	9
1.2.1. Objetivos General.....	9
1.2.2. Objetivos Específicos.....	9
1.3. Hipótesis.....	9
1.3.1. Hipótesis nula (Ho).....	9
1.3.2. Hipótesis alternativa (Ha).....	9
CAPÍTULO II.....	10

MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1 Materiales, equipos.....	10
2.1.1. Materiales.....	10
2.1.2. Equipos.....	10
2.2 Métodos.....	10
2.2.1. Identificación el gen que codifica la enzima AHAS de quinua (<i>Chenopodium quinoa</i>) CqAHAS.....	10
2.2.1. Comparación de las secuencias de CqAHAS y AtAHAS	11
2.2.2. Construcción de modelos tridimensionales.....	11
2.2.3. Determinación de la resistencia de las versiones mutantes de CqAHAS	12
CAPÍTULO III.....	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
3.1. Análisis e interpretación de los resultados.....	14
3.1.1. Identificación del gen que codifica la enzima AHAS de quinua (<i>Chenopodium quinoa</i>) CqAHAS.....	14
3.1.2. Comparación de la CqAHAS con AtAHAS.....	15
3.1.3. Construcción de modelos tridimensionales de CqAHAS silvestre y mutantes.....	17
3.1.4. Efecto de las mutaciones A114T y P189S en el modo de unión de herbicidas de las familias IMI y SU	24
3.2. Verificación de la Hipótesis	31
CAPÍTULO IV.....	31
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	31
4.1. Conclusiones	31
4.2. Recomendaciones.....	32
CAPÍTULO V.....	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de quinua	1
Tabla 2. Isozimas de Acetohidroxiácido Sintasa en quinua [<i>Chenopodium quinoa</i>]	14
Tabla 3. Comparación de las dos isozimas de <i>CqAHAS</i> de (<i>Chenopodium quinoa</i>).....	15
Tabla 4. Comparación de las dos isozimas de <i>CqAHAS</i> frente a <i>AtAHAS</i>	16
Tabla 5. Valores de puntuación del acoplamiento molecular de CE e IQ en el sitio de unión de herbicidas de <i>CqAHAS</i> silvestre y mutantes.	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacciones catalizadas por la enzima AHAS.....	4
Figura 2. Estructura tridimensional de AHAS.....	5
Figura 3. Conformación del cofactor FAD en o centros catalíticos de AHAS de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
Figura 4. Plantas y microorganismos tolerantes a herbicidas que inhiben AHAS.	7
Figura 5. Ejemplos de las cinco familias de herbicidas comerciales que inhiben AHAS.	8
Figura 6. Aminoácidos involucrados en la unión de herbicidas a <i>Cq</i> AHAS.	17
Figura 7. Mejores estructuras plantilla determinadas por SWISS-MODEL para la generación del modelo tridimensional de <i>Cq</i> AHAS.....	18
Figura 8. Árbol de decisiones construido por SWISS-MODEL en función de la conformación oligomérica de las estructuras plantilla consideradas para generar el modelo tridimensional de <i>Cq</i> AHAS.	21
Figura 9. Modelo tridimensional de <i>Cq</i> AHAS.....	22
Figura 10. Mutaciones puntuales introducidas en <i>Cq</i> AHAS.	24
Figura 11. Sitio de unión de CE e IQ en <i>Cq</i> AHAS y <i>At</i> AHAS.	27
Figura 12. Acoplamiento molecular de CE en las variantes silvestre y mutantes de <i>Cq</i> AHAS.....	28
Figura 13. Acoplamiento molecular de IQ en las variantes silvestre y mutantes de <i>Cq</i> AHAS.....	30

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las dos isoformas de AHAS en *C. quinoa*. * indica que los aminoácidos comparados están conservados, mientras que los espacios en blanco indican que no están conservados.....39
- Anexo 2** Alineamiento múltiple de las dos isoformas de *Cq*AHAS en y *At*AHAS...40
- Anexo 3** Sustituciones de aminoácidos de ALS que confieren resistencia a herbicidas y que se identificaron en poblaciones de malezas resistentes a herbicidas.....41

RESUMEN

La enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) cumple un papel crucial en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada en plantas y microorganismos. Esta enzima es el objetivo de cinco familias de herbicidas comerciales, entre las que destacan las sulfonilureas e imidazolinonas por su excelente actividad biocida sobre malezas y baja toxicidad en animales. Los herbicidas que actúan sobre AHAS son aplicados a nivel global en diferentes cultivos de importancia como el arroz, soja, cebada, trigo, algodón y maíz. Sin embargo, para la quinua no se ha identificado aún algún herbicida que permita el control de malezas. En el presente estudio se modeló dos diferentes variantes mutantes de la enzima AHAS de quinua las cuales tienen como objetivo generar resistencia a los herbicidas clorimurón etil (CE), e imazaquin (IQ). El alto grado de conservación de AHAS en las diferentes especies vegetales permitió generar un modelo computacional de la estructura de *C. quinoa* AHAS con base la estructura 3D de *Arabidopsis thaliana* AHAS. Con base al modelo de *Cq*AHAS en su forma silvestre se modeló las mutaciones A114T y P189S, y se analizó su efecto sobre el modo de unión de los herbicidas CE e IQ. Los resultados permitieron concluir que la mutación A114T podría generar algún grado de resistencia a IQ, mientras que la mutación P189S podría generar una elevada resistencia a CE. Este estudio demuestra el concepto de que la introducción de mutaciones en la enzima AHAS de la quinua puede ser efectiva para introducir resistencia a herbicidas comerciales que permitan realizar un adecuado manejo integral de malezas.

Palabras Claves: AHAS, quinua, inhibidores enzimáticos, herbicida, clorimurón etil, imazaquín,

ABSTRACT

The enzyme acetohydroxy acid synthase (AHAS) plays a crucial role in the biosynthesis of branched-chain amino acids in plants and microorganisms. This enzyme is the target of five families of commercial herbicides, among which sulphonylureas and imidazolinones stand out for their excellent biocidal activity on weeds and low toxicity to animals. Herbicides that act on AHAS are applied globally on different important crops such as rice, soybean, barley, wheat, cotton and maize. However, for quinoa, no herbicide has yet been identified for weed control. In the present study, two different mutant variants of the quinoa AHAS enzyme were modelled which aim to generate resistance to the herbicides chlorimuron ethyl (CE) and imazaquin (IQ). The high degree of AHAS conservation in the different plant species allowed us to generate a computational model of the *C. quinoa* AHAS structure based on the 3D structure of *Arabidopsis thaliana* AHAS. Based on the wild-type *Cq*AHAS model, the A114T and P189S mutations were modelled, and their effect on the binding mode of the herbicides CE and IQ was analysed. The results led to the conclusion that the A114T mutation could lead to some degree of resistance to IQ, while the P189S mutation could lead to high resistance to CE. This study demonstrates the concept that the introduction of mutations in the AHAS enzyme of quinoa can be effective in introducing resistance to commercial herbicides for integrated weed management.

Keywords: AHAS, quinoa, enzyme inhibitors, herbicide, chlorimuron ethyl. Imazaquin.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 La Quinua orígenes y características

La quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) es un pseudocereal o pseudograno originario de los Andes empleado para la alimentación humana y animal. Es considerado un cultivo de subsistencia en los pueblos andinos, donde es un tradicional e importante componente de su alimentación (Mazón, 2002). Tras la conquista de los españoles, la quinua fue denominada como “comida de indios” haciendo alusión a la gran distribución y a los diferentes usos que los Incas le dieron a este cultivo (Léon & Noboa, 2018).

1.1.2 Valor Nutricional

El creciente interés en el cultivo de la quinua, sobre todo en países industriales, radica en su alto valor nutricional, y especialmente a su contenido de proteínas de muy buena calidad (13,81 y 21,9% en peso seco). Es considerada como el único alimento en el reino vegetal que provee todos los aminoácidos esenciales, siendo rico en lisina y aminoácidos azufrados como la metionina y la cisteína. Además, posee una alta variedad de vitaminas y minerales, tales como vitaminas del complejo B, calcio, fósforo y hierro (Tabla 1). Adicionalmente, la quinua posee bajos índices glucémicos, es decir, su consumo no incrementara significativamente el nivel de azúcar en la sangre (FAO, 2011). Estas características han posicionado a la quinua como un superalimento de moda en Estados Unidos y la Comunidad Europea, lo cual ha producido un rápido incremento en su precio de venta al consumidor (alrededor de los USD 15/kg) y el interés en su producción como producto de exportación (Revista Lideres, 2017).

Tabla 1. Composición química de quinua

Contenido en 100 g de quinua blanca (Junín)		
Elemento	Valor	Unid.
Calcio	85	mg
Fósforo	155	mg
Hierro	4.2	mg
Vit. B1 (Tiamina)	0.20	µg

Vit.B2 (Riboflamina)	0.15	µg
Vit. B5 (Niacina)	0.95	µg
Calorías	363	cal
Agua	11.8	g
Proteínas	12.2	g
Grasas	6.2	g
Carbohidratos	67.2	g
Fibra	5.7	g
Ceniza	2.6	g

Fuente: (FAO, 2011)

1.1.3 Factores que afectan la producción y crecimiento en la quinua

La quinua es una especie con un lento crecimiento inicial, siendo una mala competidora con otras especies que emergen junto ella. Esta característica la hace incapaz de aprovechar los factores más importantes en la producción agrícola, como el agua, la luz, los nutrientes y el espacio físico, cuando está en presencia de plantas competidoras (**Pedreiros, 2013**). Por ende, la quinua es una planta particularmente sensible a la competencia de malezas, conocidas también como plantas arvenses (**Mujica et al., 1988**). En la actualidad, uno de los factores determinantes en la producción de quinua está asociado a la ausencia de herbicidas selectivos, ya que los compuestos que presentan un buen control de malezas pueden causar fitotoxicidad a este cultivo (**Mestanza, 2013**). Sin lugar a dudas, a nivel mundial, el herbicida más popular y efectivo para controlar malezas es el glifosato. Sin embargo, también se conoce que esta molécula puede producir efectos adversos en la salud. Por este motivo, los herbicidas que inhiben la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) suelen ser una mejor opción, ya que estas moléculas presentan un excelente balance entre alta efectividad y baja toxicidad en animales y seres humanos (**Duggleby & Pang, 2000**). Es así que durante los últimos 20 años se han desarrollado y comercializado cinco clases diferentes de inhibidores de AHAS, entre las que destacan los herbicidas de las clases sulfonilurea e imidazolinona. Debido a las grandes bondades de los inhibidores de AHAS y su masiva utilización de en diferentes cultivos, varias especies de malezas han desarrollado resistencia natural a estos herbicidas (Chang & Duggleby, 1998a). Actualmente, existen 65 especies de las cuales 20 monocotiledones y 45 dicotiledóneas resistentes a los inhibidores (**Russell et al., 2002**). Una de las estrategias más utilizada para evitar grandes pérdidas económicas provocadas por malezas es la incorporación de genes de resistencia a los cultivares (**Pérez, 1996**). En efecto, a partir del estudio y

caracterización de los factores que proporcionan resistencia a herbicidas que actúan sobre la enzima AHAS, y empleando herramientas de ADN recombinante, se ha logrado obtener variantes resistentes de maíz, arroz y algodón, entre otros (**Fartya et al., 2018**). De esta forma, virtualmente es factible aplicar este principio en la quinua para de esta forma facilitar el manejo integrado de malezas y maximizar la producción de este cultivo.

1.1.4 AHAS (*A. thaliana*) como modelo para el estudio de herbicidas comerciales

Una pequeña mala hierba de la familia de las crucíferas, *A. thaliana* se ha convertido en uno de los más importantes sistemas de estudio molecular y genético de las plantas por su tamaño reducido y su corto ciclo biológico. Por otra parte, posee un genoma compacto y mínimo, con escasas secuencias repetitivas y un bajo contenido en ADN, el cual está agrupado en cinco cromosomas (aproximadamente 70 Mpb por núcleo haploide, unas 25 veces el tamaño del genoma de *Echerichia coli*) (**Pérez, 1996**). Por lo antes expuesto, *A. thaliana* ha sido extensamente empleada para determinar el rol de diversos genes en la actividad de varias moléculas con actividad herbicida, incluyendo aquellas moléculas que inhiben la enzima acetohidroxiácido sintasa.

La importancia de AHAS se desarrolla con el descubrimiento del herbicida sulfonilurea, pero se desconocía su modo de actuar, no es hasta 1984 donde se descubre el modo de actuar sobre plantas y bacterias, en las que se han intentado realizar mediciones. AHAS cataliza el primer paso que conduce a las tres cadenas ramificadas de aminoácidos, para AHAS bacteriano y fúngico está regulado por la inhibición de la valina (**Duggleby et al., 2008**).

1.1.5 Acetohidroxiácido Sintasa

La enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS, EC 2.2.1.6) cataliza la primera reacción en la ruta biosintética de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs por sus siglas en inglés) y su inhibición ha demostrado una fuerte actividad biocida. De hecho, la enzima AHAS es el target de más de 50 moléculas herbicidas comerciales que se agrupan en cinco clases de moléculas químicamente distintas: sulfonilureas, imidazolinonas, pirimidinil-benzoatos, triazolopirimidinas y sulfonilamino-cabonil-triazolinonas. Los herbicidas que inhiben la enzima AHAS se caracterizan por su extremadamente alta potencia (tasa de aplicación entre 0.2 – 10 g/ha), alta selectividad hacia las malezas y muy baja toxicidad en animales (LD50 en rata = 5g/kg/día) (**Garcia, et al., 2017**). AHAS cataliza la conversión de dos moléculas de piruvato en 2-acetolactato o una molécula de piruvato y una molécula de 2-

cetobutirato en 2-aceto-2-hidroxiacetato (Figura 1). Esta enzima se encuentra en plantas, bacterias y hongos, pero no en animales los cuales deben obtener BCAAs mediante la dieta (Lonhienne et al., 2018). Dentro de esta clase de herbicidas, los inhibidores pertenecientes a las familias sulfonilurea e imidazolinona son los más populares a nivel mundial ya que fueron los primeros en aprobarse para su uso comercial (alrededor de los años 1970s). Sin embargo, en aquella época se desconocía su enzima objetivo y su mecanismo de acción en la célula vegetal. No fue hasta inicios de los 80s que se logró identificar que su efecto herbicida se debía a la inhibición de enzima AHAS (LaRossa & Schloss, 1984).

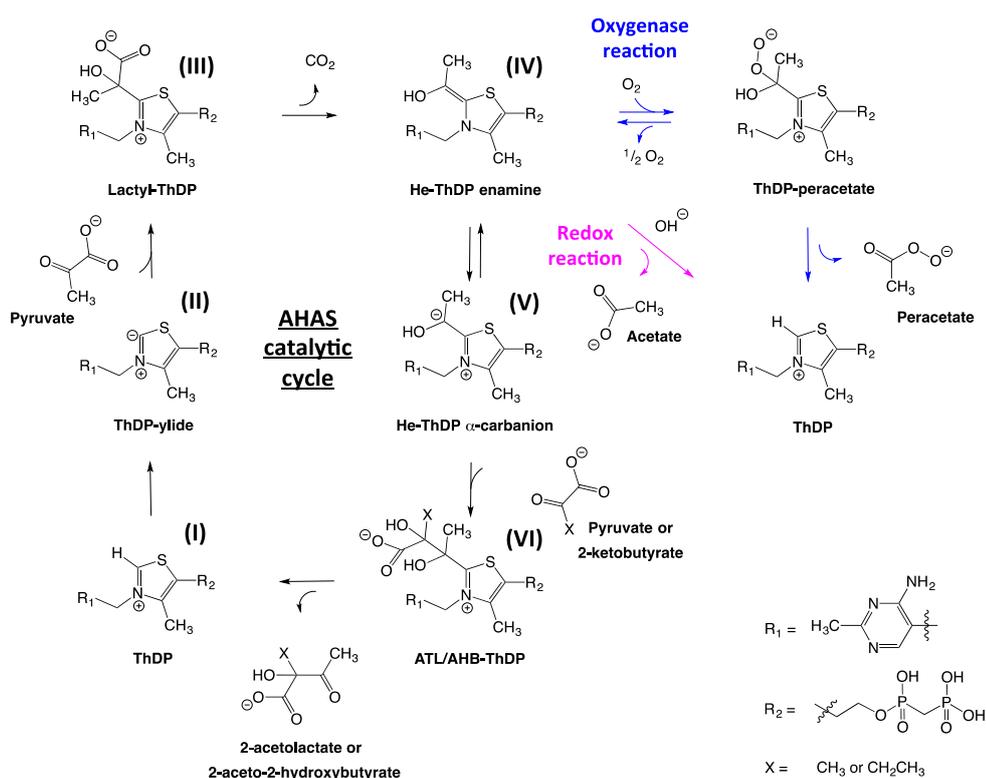


Figura 1. Reacciones catalizadas por la enzima AHAS.

La enzima AHAS es capaz de realizar tres reacciones distintas, incluyendo el ciclo de síntesis primaria y las reacciones secundarias oxigenasa y redox. ThDP = difosfato de tiamina; He = hidroxietil; ATL= acetolactato; AHB = aceto- hidroxiacetato. Imagen adaptada de (Duggleby & Pang, 2000; Lonhienne et al., 2016 ; Tittmann et al., 2004).

La enzima acetohidroxiácido sintasa pertenece a la súper familia de enzimas que dependen de difosfato de tiamina (ThDP), cofactor que es capaz de catalizar una variedad de reacciones, incluida la descarboxilación oxidativa y no oxidativa de 2-cetoácidos (Figura 1). AHAS también se une a ión magnesio (Mg^{2+}) y a una molécula de dinucleótido de adenina y flavina (FAD) la cual, aunque no participa en

las reacciones principales de síntesis, puede actuar como aceptor de electrones en una reacción secundaria lenta (reacción redox, Figura 1). Estructuralmente, AHAS se caracteriza por poseer una subunidad catalítica de aproximadamente 65 kDa (Figura 2a y 2b) y una subunidad reguladora más pequeña que varía su tamaño ente 9 y 54 kDa, dependiendo de la especie (Figura 2b) (McCourt et al., 2006). Se ha determinado que la subunidad reguladora estimula la actividad catalítica y confiere sensibilidad a inhibición por los aminoácidos de cadena ramificada, valina y leucina (Lee & Duggleby, 2001). En *A.thaliana*, el complejo enzimático AHAS está compuesto por cuatro subunidades catalíticas y cuatro subunidades reguladoras, las cuales adoptan una conformación similar a una cruz maltesa (Figura 2b) (Lonhienne et al., 2020).

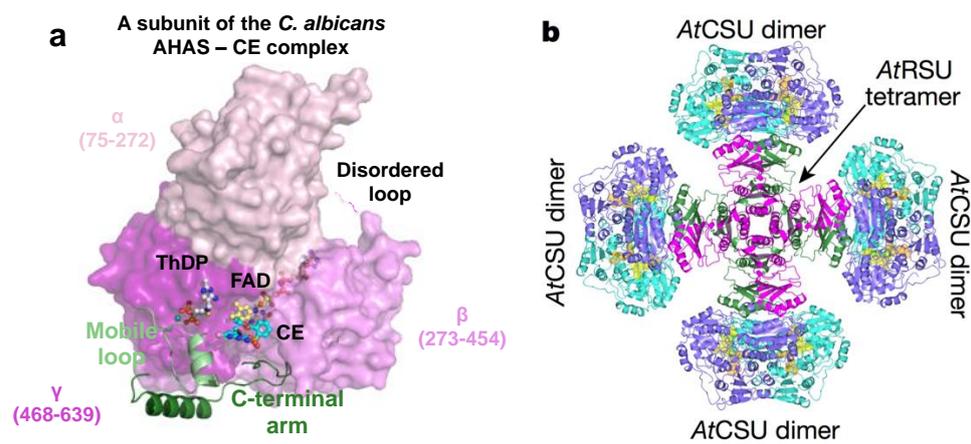


Figura 2. Estructura tridimensional de AHAS.

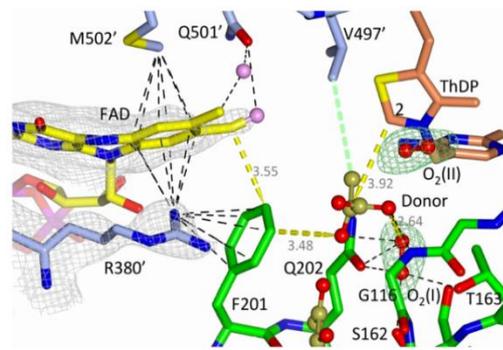
a) Modelo de superficie de la estructura de un monómero de la subunidad catalítica de AHAS de Candida albicans que ilustra los tres dominios que componen el polipéptido representado de tres diferentes tonalidades de rosa. Conjuntamente los cofactores ThDP, FAD y el herbicida clorimurón etil (CE) se encuentran representados en modelos de esferas y palillos. Los átomos de carbono son de color blanco (ThDP), amarillo (FAD) y cian (CE), mientras que el cofactor Mg^{2+} se encuentra simbolizado por una esfera de color cian oscuro.

b) Modelo de lazo de la estructura de la enzima AHAS de Arabidopsis thaliana (At) compuesta por su unidad catalítica (CSU) y su subunidad reguladora (RSU), las cuales forman dímeros y tetrámeros respectivamente. Fuente: panel a (Lee & Duggleby, 2001); panel b (Lonhienne et al., 2020).

Lonhienne et al., (2017), en su trabajo de investigación indica que una característica importante de la enzima AHAS es que cuando AHAS está activa, muestra dos conformaciones diferentes en sus dos centros catalíticos (CC). La primera muestra a ThDP junto a FAD reducido y su anillo de isoaloxazina doblado (CC_FADbent),

mientras que la otra muestra al producto intermedio hidroxietil (HE) – ThDP y FAD oxidado (o presente como un semiquinona) que tiene un anillo de isoaloxazina plano (CC_FADflat) (Figura 3). Esta observación tiene implicaciones en el mecanismo de inhibición de AHAS ya que sugiere que el modo de unión de cualquier herbicida a la enzima depende de la conformación de adopte cada CC.

Centro catalítico 1: CC_FADbent



Centro catalítico 2: CC_FADflat

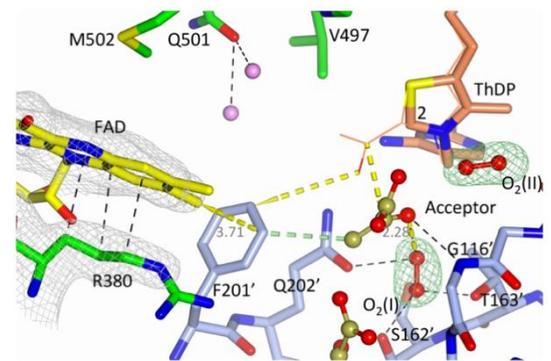


Figura 3. Conformación del cofactor FAD en los centros catalíticos de AHAS de *Saccharomyces cerevisiae*.

En el centro catalítico 1, el cofactor FAD se encuentra reducido con un anillo de isoaloxazina doblado. Por otro lado, en el centro catalítico 2 el cofactor se encuentra oxidado y con un anillo de isoaloxazina plano. Fuente: (Lonhienne et al., 2017).

1.1.6 Plantas resistentes a inhibidores de AHAS

Una de las principales razones para el estudio de las bases moleculares de la inhibición de AHAS por herbicidas comerciales es su posible uso en la construcción de variedades resistentes a herbicidas, lo cual se ha logrado en varios casos mediante el uso de herramientas de ADN recombinante. Existen pocos casos en los cuales se ha reportado mutaciones naturales que confieren a ciertos cultivos comerciales resistencia a inhibidores de AHAS (Duggleby & Pang, 2000). En estos casos la mutación de AHAS a una forma insensible a herbicidas parece ser un mecanismo efectivo para la generación de herbicidas altamente selectivos y mínimamente tóxicos. En la Figura observamos mutaciones, identificadas en varias especies de plantas, hongos y bacterias. Se conoce que estas mutaciones confieren resistencia frente a herbicidas de las familias sulfonilurea e imidazolinona. Además, se conoce que generalmente existe tolerancia cruzada a inhibidores de las familias sulfonilureas y triazolopirimidinas o imidazolinonas y pirimidil benzoatos (Duggleby et al., 2008). Sin embargo, es claro que algunas mutaciones pueden afectar en cierta medida a herbicidas pertenecientes a las cinco familias. El desarrollo de cultivos

tolerantes a inhibidores de AHAS está todavía en su infancia, y solo se han informado y comercializado unas pocas variedades. Una de estas es una variedad de arroz (*Oriza sativa*) genéticamente modificada tolerante tanto al bensulfuron metil (BM) como al herbicida glufosinato (Fartyal et al., 2018). La mutación que confiere resistencia a BM se dio en el aminoácido de la posición 171 de AHAS, este aminoácido fue reemplazado por serina, creando la mutación P171S de arroz residuo que se ubica en la proximidad del sitio activo y en el sitio de unión de herbicidas a AHAS. Importantemente, la introducción de resistencia en esta nueva variedad de arroz no tuvo un efecto negativo sobre su productividad ni sobre la calidad del producto.

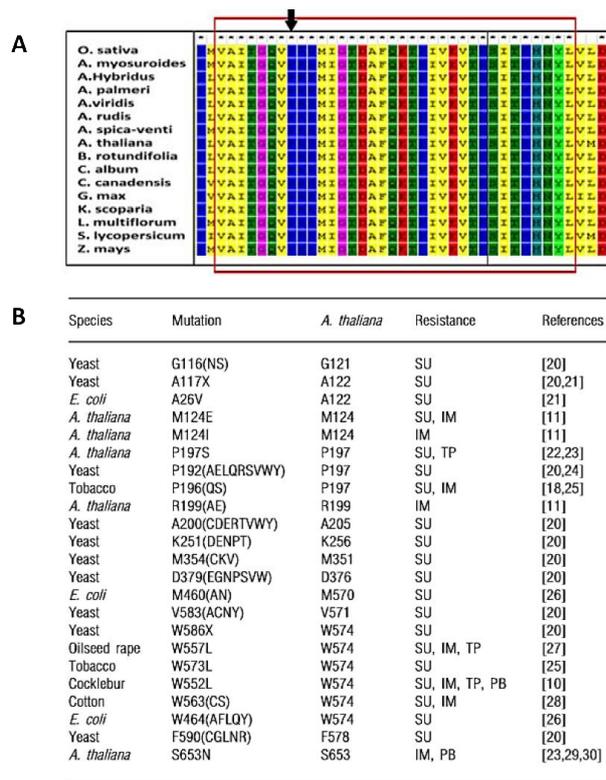


Figura 4. Plantas y microorganismos tolerantes a herbicidas que inhiben AHAS.

A) Alineamiento múltiple de secuencias de AHAS de varias especies de plantas. El rectángulo muestra la presencia de un tramo conservado de 35 aminoácidos consecutivos desde 190-224 en toda la enzima AHAS. La flecha indica la posición en donde se introdujo la mutación P171S en arroz (*O. sativa*) la cual otorga resistencia contra el herbicida BM. B) Mutaciones que resultan en la resistencia a herbicidas en plantas, levaduras y bacterias. X indica que casi cualquier sustitución da lugar a resistencia a herbicidas esto se enumeran entre paréntesis. La tercera columna muestra el residuo equivalente en la secuencia de AHAS de *A. thaliana*. La cuarta columna indica resistencia a una o varias familias de

herbicidas. Sulfonilurea (SU), imidazolinona (IM), pirimidinil benzoatos (PB) y triazolopirimidinas (TP). Fuente: a) (Fartyal et al., 2018); b) (Chang & Duggleby, 1998a)

1.1.7 Herbicidas Comerciales

Como se mencionó anteriormente, AHAS es el target de cinco familias de inhibidores: Sulfonilurea (SU), imidazolinona (IMI), triazolinona (TP), pirimidinil-benzoato (PYB) y sulfonilamino-carbonil-triazolinona (SCT) (Figura 5). Estos compuestos son a menudo selectivos para ciertas plantas las cuales tienen la capacidad de convertir los herbicidas en derivados no tóxicos (Pang et al., 2004). Estas cinco familias de compuestos se encuentran entre las opciones más populares para los agricultores de todo el mundo, debido a que no son tóxicos tanto para animales como para el ser humano (Duggleby & Pang, 2000). El descubrimiento de AHAS ayudó a explicar porque estos herbicidas tienen muy baja toxicidad en los animales, y esto se debe a que las enzimas de la ruta de biosíntesis de BCAAs están ausentes, por lo que la toxicidad solo podría surgir si hubiera procesos no relacionados afectados por estos compuestos (Duggleby et al., 2008). Entre las cinco clases de inhibidores de AHAS, las sulfonilureas son la familia de inhibidores que más destacan ya que tienen una fuerte actividad inhibitoria sobre AHAS vegetales y fúngicas (Garcia, et al., 2017; Garcia et al., 2018). Por tal motivo estos herbicidas comerciales son altamente preferidos a nivel global para el manejo de cultivos de algodón, maíz, trigo, cebada, arroz, entre otros (García, et al., 2017).

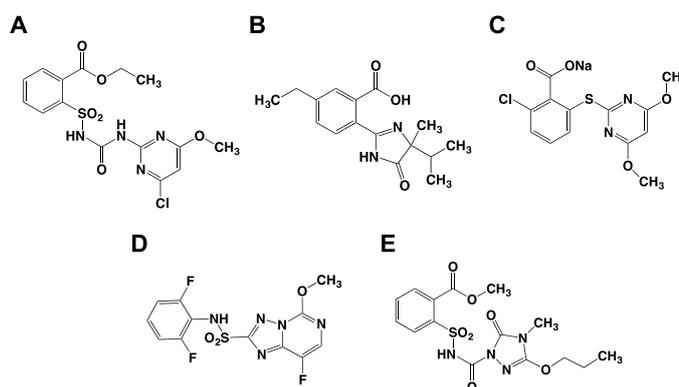


Figura 5. Ejemplos de las cinco familias de herbicidas comerciales que inhiben AHAS.

A) sulfonilurea; B) imidazolinona; C) pirimidinil-benzoato; D) triazolopirimidina; y E) sulfonilamino-carbonil-triazolinona. Fuente: (Garcia, et al., 2017).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivos General

Diseñar variantes mutantes de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de quinua (*Chenopodium quinoa*) resistente a herbicidas comerciales.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Identificar el gen *ILV2* que codifica para la enzima acetohidroxiácido sintasa de quinua (*Chenopodium quinoa*) (*CqAHAS*) y sus isoformas.
- Construir modelos tridimensionales de *CqAHAS* e identificar aminoácidos esenciales para la unión de herbicidas comerciales a *CqAHAS*.
- Construir modelos tridimensionales de *CqAHAS* mutantes y evaluar la resistencia inducida frente a diferentes herbicidas comerciales

1.3. Hipótesis

1.3.1. Hipótesis nula (H₀)

La introducción de variantes mutantes en el sitio de unión de herbicidas de AHAS de la quinua (*Chenopodium quinoa*) no produce resistencia a los herbicidas que tienen como objetivo la enzima AHAS.

1.3.2. Hipótesis alternativa (H_a)

La introducción de variantes mutantes en el sitio de unión de herbicidas de AHAS de la quinua (*Chenopodium quinoa*) produce resistencia a los herbicidas que tienen como objetivo la enzima AHAS.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales, equipos

2.1.1. Materiales

Para la realización de esta tesis se utilizaron las diferentes herramientas bioinformáticas.

Páginas web

- Protein Data Bank (PDB)
- T-Coffee
- Boxshade
- Swiss-Model
- Yasara

Software Bioinformáticos

- WinCoot
- PyMOL
- GOLD- Protein Ligand Docking Software
- Microsoft Office

2.1.2. Equipos

- Computadora personal

2.2 Métodos

2.2.1. Identificación el gen que codifica la enzima AHAS de quinua (*Chenopodium quinoa*) CqAHAS

Se diseñaron variantes mutantes de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de quinua (*Chenopodium quinoa*) CqAHAS para lo cual se seleccionó información de artículos científicos que dieron soporte a la presencia de isoformas de esta enzima en quinua. **Mestanza et al., (2015)** en su trabajo de investigación reportó la primera caracterización génica de AHAS en quinua, así como su interacción con genomas homólogos. A partir de este trabajo se identificó la secuencia de ADNc (ARNm) y los aminoácidos que codifican para cada isoforma de CqAHAS. Para llevar a cabo

esta actividad se emplearon los motores de búsqueda y análisis del NCBI GenBank y se extrajeron las secuencias de *CqAHAS* en formato FASTA.

Se realizó un alineamiento de todas las secuencias de *CqAHAS* encontradas para lo cual se colocaron las secuencias, en formato FASTA, en un editor de texto como Word. Luego, se realizó el alineamiento múltiple mediante la herramienta T-Coffee (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular>), donde se colocó las secuencias en el espacio disponible. Finalmente se seleccionó “Submit”, y una vez terminado el alineamiento se procedió a descargar los resultados en formato “fasta-aln”.

Para la generación de ilustraciones coloreadas que faciliten el análisis del alineamiento múltiple se empleó la herramienta Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Aquí se ingresaron los resultados descargados de T-Coffee en la ventana en blanco, y se descargaron los resultados en formato “RTF_new”. El alineamiento se visualizó y analizo en Word se identificó las diferencias existentes entre cada isoforma de la enzima.

2.2.1. Comparación de las secuencias de *CqAHAS* y *AtAHAS*

Posterior al análisis de las isoformas de *CqAHAS* se las comparó con el modelo general de la enzima, *A. thaliana* (*AtAHAS*), ya que se dispone de una gran cantidad de información estructural y cinética de esta enzima.

Primeramente, se descargó la secuencia de aminoácidos que componen *AtAHAS* (código. AEE78430.1) de la base de datos GenBank. Posteriormente, se realizó un alineamiento de las secuencias *CqAHAS* y *AtAHAS* mediante la herramienta T-Coffe (<http://tcoffe.crg.cat/apps/tcoffe/do:regular>), como se describió anteriormente.

Para la generación de ilustraciones coloreadas que ayuden el análisis del alineamiento múltiple se empleó la herramienta Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). En la ventana en blanco disponible se ingresó los resultados descargados de T-Coffe, para luego descargar los resultados en formato “RTF_new”. El alineamiento obtenido se analizó en Word. Con este procedimiento se pudo visualizar e identificar aquellos aminoácidos relacionados con el sitio de unión a inhibidores y, por ende, se identificó las posiciones donde se evaluaron la resistencia inducida a herbicidas tomando como punto de partida toda la literatura disponible para mutantes de *AtAHAS* resistentes a herbicidas.

2.2.2. Construcción de modelos tridimensionales

Una vez identificada las potenciales mutaciones que se podrían implementar en *CqAHAS* para otorgarle a la quinua resistencia a herbicidas comerciales se realizó

modelos tridimensionales de *CqAHAS* tomando como punto de partida la estructura de *AtAHAS* (Código PDB 5K6Q) obtenida de cristalografía de rayos X. Para ello se extrajo el archivo con las coordenadas tridimensionales 5K6Q (extensión.pdb) de la base de datos Protein Data Bank (PDB; <https://www.rcsb.org>). Los modelos tridimensionales, tanto de *CqAHAS* silvestres y sus versiones mutantes, se construyeron con la herramienta SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) instituto suizo de bioinformática.

2.2.3. Determinación de la resistencia de las versiones mutantes de *CqAHAS*

La determinación de la resistencia a herbicidas inducida virtualmente *CqAHAS* se evaluaron mediante el acoplamiento molecular (docking). Este procedimiento permitió cuantificar la afinidad de diferentes herbicidas comerciales, tanto en *CqAHAS* silvestres y sus versiones mutantes, y su potencial uso en quinua resistente a herbicidas.

Las poses adoptadas por los herbicidas en *CqAHAS* se analizaron mediante los programas WinCoot y PyMOL. Para las ilustraciones del proceso de mutación virtual, primeramente, se abrió la estructura de *CqAHAS* en WinCoot identificando el residuo P189. Posteriormente se seleccionó en la barra de menú derecha el botón “mutante simple” para luego escoger el residuo serina (S) de la ventana emergente. Se procedió a guardar las coordenadas de la enzima mutante como un nuevo archivo .pdb. Este proceso se repitió para la mutación de A114 por treonina(T) y los mejores resultados se construyeron en PyMOL.

Los ensayos de acoplamiento molecular se empleó el programa de docking GOLD-Protein Ligand Docking Software, se basa en un algoritmo genético para caracterizar y puntuar las poses que puede adoptar una molécula (ligando) en un sitio determinado de una proteína y las potenciales interacciones no covalentes.

Para ello se emplearon los modelos estructurales de *CqAHAS* construidos y las librerías de herbicidas comerciales con potencial aplicación en el cultivo de quinua utilizando una configuración general. Para ejecutar el programa primeramente se cargó las coordenadas tridimensionales de los modelos de *CqAHAS* en formato.pdb en GOLD. Posteriormente se preparó la proteína mediante la adición de hidrógenos, la eliminación de moléculas de agua y la extracción de los ligandos o cofactores. En el programa se definió el sitio de unión de los herbicidas en la enzima, así como la librería de compuestos a emplear. Finalmente, se inició el algoritmo de acoplamiento

molecular y se analizó los resultados del acoplamiento tomando en cuenta los valores de energía libre determinados de la unión de los herbicidas con *Cq*AHAS y ser comparados con el control sin ninguna modificación (Wild type, WT). La configuración del docking se realizó empleando las opciones por defecto.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis e interpretación de los resultados

3.1.1. Identificación del gen que codifica la enzima AHAS de quinua (*Chenopodium quinoa*) CqAHAS

Las secuencias de aminoácidos de la subunidad catalítica de AHAS de quinua (*Chenopodium quinoa*) (CqAHAS) se identificaron por medio de la herramienta de búsqueda de la base de datos del NCBI, GenBank. Producto de esta búsqueda se encontró que en la base de datos se encuentran depositadas al menos seis diferentes isozimas de CqAHAS. Cuatro de estas secuencias son secuencias parciales, mientras que los dos restantes pertenecen a secuencias completas de la enzima, cuyos códigos de acceso son AIU47335.1 y AIU47336.1 (Tabla 2).

Tabla 2. Isozimas de Acetohidroxiácido Sintasa en quinua [*Chenopodium quinoa*]

(CqAHAS1) Código de acceso AIU47335.1

```
MAATSTNPSFSPFPTLSSKTPKPQSSYALPFPSNPKTPSSFLRRPLQISASQSANPKPPSATQTAVPSP
LTDENPQSFVSRFAPDEPRKGCVDLVEALEREGVTNVFAYPGGASMEIHQALTRSSSIRNVLPHEQGGV
FAAEGYARATGRVGVCIATSGPGATNLVSGLADALLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSI
TKHNYLVLDVEDIPRVVKEAFYLANSRPGPVLIDIPKDIQQQLVVPNWDQPIKLGYYVSRLPKSKFSAN
EGLLEQIVRLMSEAKKPVLYVGGCLNSGEELRKFVELTGIPVASTLMGLGAYPCNDELSHMLGMHGT
VYANYADKADLLAFGVRFDRTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKKNKQPHVSICADV LKALKG MNK
ILEFRKGLNLDYSSWREELDEQKKKFPKFTGFEAIPPQYAIQMLDELTDGNAVISTGVGQHQMWAAQ
HYKYRNPQRWLTSGGLGAMGFLPAAIGA AVARPESVVVDIDGDSFIMNVQELATIRVENLPVKIMLLN
NQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGPNPKAAEIPDMLKFAEACDIPAARVTKVSELRAAMQKMLDTPGP
YLLDVIVPHQEHVLPMPGSAAFKDTITEGDGRTSY
```

(CqAHAS2) Código de acceso AIU47336.1

```
MAATSSNPSFSPFPTLSSKTPKPQSSYSLPFPTNPKTPSSFLRRPLQISASQSANPKPPSATQTAVPSP
LTDENPQSYVSRFAPDEPRKGCVDLVEALEREGVTNVFAYPGGASMEIHQALTRSGSIRNVLPHEQGGV
FAAEGYARATGRVGVCIATSGPGATNLVSGLADALLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSI
TKHNYLVLDVEDIPRVVKEAFYLANSRPGPVLIDIPKDIQQQLVVPNWDQPIKLGYYVSRLPKSKFSAN
EGLLEQIVRLMSEAKKPVLYVGGCLNSSEELRKFVELTGIPVASTLMGLGAYPCNDELSHMLGMHGT
VYANYAVDKADLLAFGVRFDRTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKKNKQPHVSICADV LKALKG MNK
ILES RKGKLNLDYSSWREELGEQKKKFPKFTGFEAIPPQYAIQMLDELTDGDAVISTGVGQHQMWAAQ
HYKYRNPQRWLTSGGLGAMGFLPAAIGA AVARPESVVVDIDGDSFIMNVQELATIRVENLPVKIMLLN
NQHLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGPNPAKAAEIPDMLKFAEACDIPAARVTKVSELRAAMQKMLDTPGP
YLLDVIVPHQEHVLPMPGSAAFKDIINEGDGRTSY
```

Para la comparación de las dos secuencias de *CqAHAS* se realizó un alineamiento mediante la herramienta Expasy Sim (Anexo 1). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias fue de 98,05% (Tabla 3), lo que sugiere que virtualmente las dos secuencias son idénticas. Sin embargo, se desconoce si una o ambas isoformas de la enzima se expresa constitutivamente en quinua. Las dos secuencias están constituidas por 666 aminoácidos, lo cual es similar a lo observado en AHAS de plantas, levaduras y bacterias. Por ejemplo, en plantas como *A. thaliana* la enzima tiene una longitud de 670 aminoácidos (**Salanoubat et al., 2000**), en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* posee 687 aminoácidos (**Bowman et al., 1997**) y en la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* posee 618 aminoácidos (**Lew et al., 2011**). Esto indica que el tamaño de las isoformas de *CqAHAS* identificadas guardan mayor concordancia con *AtAHAS*, la cual es comúnmente empleada como modelo de estudio de plantas, y que las secuencias identificadas son completas (incluyendo su péptido de señalización hacia el cloroplasto) y presumiblemente funcionales.

Tabla 3. Comparación de las dos isozimas de *CqAHAS* de (*Chenopodium quinoa*)

Variable	Respuesta
Aminoácidos comparados	666
Identidad	98,05%
Frecuencia de espacios no alineados	0,0 %
Score	3374

Fuente: (Autor, 2020)

3.1.2. Comparación de la *CqAHAS* con *AtAHAS*

A continuación, se comparó la homología de secuencias de ambas isoformas de *CqAHAS* con la secuencia de la subunidad catalítica de *AtAHAS*. Para ello, primeramente, se identificó la secuencia de *AtAHAS* empleando el motor de búsqueda del NCBI, GenBank. La secuencia con código de acceso AEE78430.1 (subunidad catalítica de *AtAHAS*) fue empleada para la construcción de alineamientos. Posteriormente, las secuencias fueron analizadas mediante la herramienta Expasy Sim (Anexo 2), cuyo resultado mostró que el porcentaje de identidad entre *CqAHAS1* y *AtAHAS* es de 76.74%, mientras que entre *CqAHAS2* y *AtAHAS* la identidad es igual a 77.04% (Tabla 4). Ya que las dos

isoformas de *CqAHAS* son muy similares entre sí, fue predecible que sus porcentajes de homología con respecto a *AtAHAS* serían igualmente similares. De esta forma, para poder definir si existen diferencias puntuales que puedan influir en la unión de los herbicidas a las isoformas de *CqAHAS*, lo cual es el corazón este estudio, fue necesario analizar los residuos que contornean el sitio de unión de herbicidas en AHAS identificados previamente en estructuras cristalinas de *AtAHAS*.

Tabla 4. Comparación de las dos isozimas de *CqAHAS* frente a *AtAHAS*

Secuencias	<i>AtAHAS</i>	<i>CqAHAS1</i>	<i>CqAHAS2</i>
<i>AtAHAS</i>	100.00	76.74	77.04
<i>CqAHAS1</i>	76.74	100.00	98.05
<i>CqAHAS2</i>	77.04	98.05	100.00

Fuente: (Autor, 2020)

García et al. (2018) definieron que el sitio de unión de herbicidas está compuesto por ocho segmentos del polipéptido. Al comparar estos ocho segmentos en *AtAHAS* y *CqAHAS* (Figura 6) se puede observar que los residuos claves que forman interacciones no covalentes con los herbicidas Clorimurón de etil (CE) e Imazaquín (IQ) (Figura 6A, 6B) se encuentran perfectamente conservados en ambas especies (Figura 6C). Estos resultados permitieron concluir que tanto *CqAHAS1* como *CqAHAS2* poseen características que les otorgan a estas isoenzimas actividad catalítica y también afinidad por herbicidas que inhiben AHAS. De esta forma, para proseguir con el presente proyecto de investigación es posible tomar como base cualquiera de las dos secuencias para la construcción del modelo tridimensional de *CqAHAS* y ensayar mutaciones que confieren resistencia a herbicidas. En este sentido, se tomó la secuencia de *CqAHAS1* para los subsiguientes ensayos.

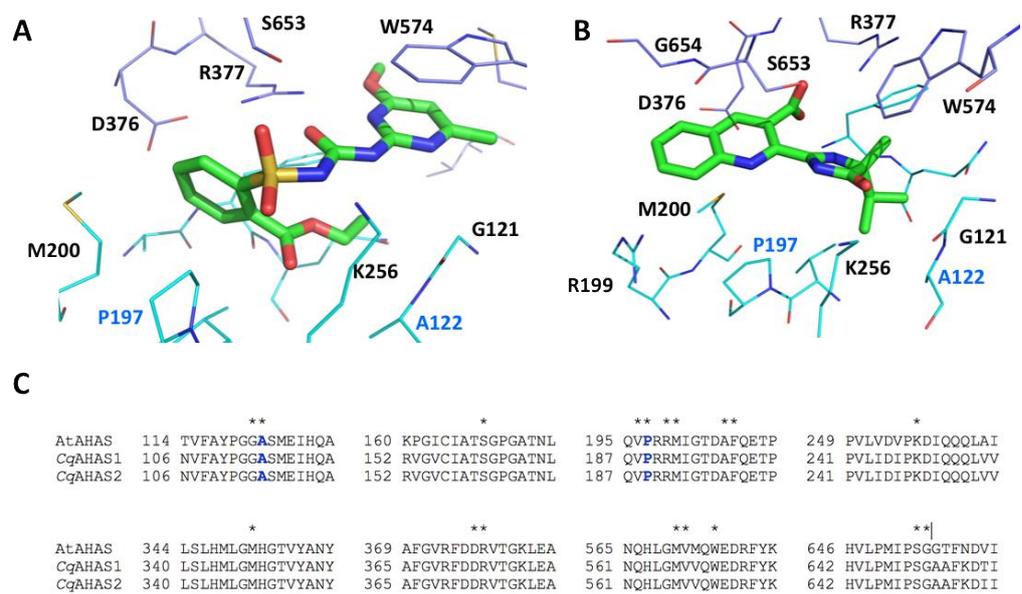


Figura 6. Aminoácidos involucrados en la unión de herbicidas a CqAHAS.

A) Inhibidor clorimurón etil en el sitio de unión de herbicidas en AtAHAS (Código IYBH). **B)** Inhibidor Imazaquin en el sitio de unión de herbicidas en AtAHAS (Código IZSN) (PYMOL). **C)** Alineamiento múltiple de secuencias de los residuos involucrados en la unión de herbicidas a AHAS. Ocho segmentos del polipéptido conforman el sitio de unión de herbicidas en la enzima AHAS. El * indica aquellos residuos que forman contactos no covalentes con el inhibidor en AtAHAS. Los residuos A114 y P189 en CqAHAS (A122 y P197 en AtAHAS), marcados de azul, fueron considerados para generar las variantes mutantes de la enzima.

3.1.3. Construcción de modelos tridimensionales de CqAHAS silvestre y mutantes

El modelo tridimensional de CqAHAS se construyó mediante la herramienta SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) del instituto suizo de bioinformática. Para ello se ingresó la secuencia de CqAHAS1 (Tabla 2) en la interfaz gráfica del servidor y se realizó una búsqueda de la plantilla más apropiada con respecto a la secuencia de CqAHAS y la estructura secundaria estimada por el programa. SWISS-MODEL consideró 50 plantillas diferentes de la base de datos completa del Protein Data Bank (PDB) para la construcción del modelo de CqAHAS. Estas plantillas corresponden a estructuras similares que cubren la secuencia completa y comparten alta identidad de secuencia con CqAHAS (Figura 7). Los resultados permitieron determinar que la estructura cristalina de AtAHAS en complejo con el herbicida monosulfurón (MS) (código PDB: 3E9Y) presentó las mejores estadísticas, y por consiguiente, fue idónea para la generación del modelo tridimensional de CqAHAS. Es importante mencionar que el complejo MS-AtAHAS no cuenta con 86 residuos de su extremo N-terminal,

los cuales corresponden al péptido de tránsito hacia el cloroplasto y fueron eliminados para facilitar la expresión de la proteína. Además, dos residuos del extremo C-terminal de este complejo no pudieron ser colocados en el mapa de densidad electrónica, y, por ende, fueron eliminados del modelo (Wang et al., 2009). De esta forma, la identidad de secuencia entre *CqAHAS* y *MS-AtAHAS* (82.36%) determinada por SWISS-MODEL fue establecida tomando en consideración únicamente 582 residuos de *AtAHAS*. Ya que el modelo de *CqAHAS* fue generado con base a 3E9Y, este también carece de los residuos en los extremos N- y C-terminal antes mencionados.

Sort	Coverage	GMQE	QSQE	Identity	Method	Oligo State	Ligands
<input checked="" type="checkbox"/>		0.84	0.84	82.36	X-ray, 3.0Å	homo-dimer ✓	2 x 1MS [Ⓞ] , 2 x NHE [Ⓞ] , 2 x MG [Ⓞ] , 2 x TDM [Ⓞ] , 2 x FAB [Ⓞ]
<input type="checkbox"/>		0.83	0.60	82.65	X-ray, 2.8Å	homo-tetramer ✓	4 x MG [Ⓞ] , 8 x 1IQ [Ⓞ] , 4 x NHE [Ⓞ] , 4 x FAD [Ⓞ] , 4 x TPP [Ⓞ]
<input type="checkbox"/>		0.80	0.77	81.85	EM	hetero-16-mer △	8 x MG [Ⓞ] , 8 x FAD [Ⓞ] , 8 x TPP [Ⓞ] , 8 x VAL [Ⓞ]
<input type="checkbox"/>		0.80	0.84	81.85	EM	hetero-16-mer △	8 x MG [Ⓞ] , 8 x FAD [Ⓞ] , 8 x TPP [Ⓞ]
<input type="checkbox"/>		0.80	0.84	81.85	EM	hetero-16-mer △	8 x MG [Ⓞ] , 8 x FAD [Ⓞ] , 8 x TPP [Ⓞ]
<input type="checkbox"/>		0.79	0.77	82.39	EM	hetero-16-mer △	8 x MG [Ⓞ] , 8 x FAD [Ⓞ] , 8 x TPP [Ⓞ] , 8 x VAL [Ⓞ]
<input type="checkbox"/>		0.79	0.84	82.39	EM	hetero-16-mer △	8 x MG [Ⓞ] , 8 x FAD [Ⓞ] , 8 x TPP [Ⓞ]

Figura 7. Mejores estructuras plantilla determinadas por SWISS-MODEL para la generación del modelo tridimensional de *CqAHAS*

Lista de las 7 mejores plantillas clasificadas de acuerdo con la calidad esperada del modelo, GMQE, a partir del análisis de la librería de plantillas de SWISS-MODEL (SMTL). La mejor plantilla, resaltada en el recuadro rojo, fue la estructura 3E9Y que

corresponde a la estructura cristalina de A. thaliana en complejo con el herbicida monosulfuron (MS).

El modelo de *Cq*AHAS generado a partir de 3E9Y arrojó un valor de 0.84 para los parámetros de estimación de la calidad del modelo global (GMQE) y la estimación de la calidad de la estructura cuaternaria (QSQE) (Figura 7). La variable GMQE es una estimación de la calidad que combina las propiedades del alineamiento objetivo-plantilla y la estructura de la plantilla. Estas se combinan mediante un perceptrón multicapa. La puntuación de GMQE resultante se expresa como un número entre 0 y 1, lo que refleja la precisión esperada de un modelo construido con esa alineación y plantilla, normalizada por la cobertura de la secuencia objetivo. Los números más altos indican una mayor confiabilidad del modelo. Una vez que se construye un modelo, el GMQE se actualiza para este caso específico teniendo en cuenta también la puntuación de calidad absoluta del modelo obtenido (QMEAN) para aumentar la confiabilidad de la estimación de la calidad (SWISS Institute of Bioinformatics, n.d.) En el caso de la estructura generada para *Cq*AHAS, el valor de GMQE obtenido es cercano a 1, lo cual valida el modelo.

Por otra parte, ya que la subunidad catalítica de *Cq*AHAS es un homodímero, SWISS-MODEL empleó un algoritmo basado en *machine learning* para identificar la conservación de la interfaz entre los dos polipéptido (Bertoni et al., 2017), y aplicó un agrupamiento estructural para definir la mejor conformación oligomérica con base a la QSQE. La puntuación QSQE también es un número entre 0 y 1, que refleja la precisión esperada de los contactos que ocurren entre las cadenas de polipéptido para un modelo construido en base a una alineación y plantilla determinadas. En general, un QSQE cercano a 1 es deseable, mientras que un valor por encima de 0,7 puede considerarse confiable para la estructura cuaternaria predicha en el proceso de modelado. Esto complementa la puntuación GMQE que estima la precisión de la estructura terciaria del modelo resultante (SWISS Institute of Bioinformatics, n.d.). SWISS-MODEL además generó un árbol de decisiones con base a las plantillas consideradas durante la construcción del modelo (Figura 8). Este árbol agrupa a las plantillas en función de su conformación oligomérica (En el caso de *Cq*AHAS dímeros y tetrameros), así como la identidad y cobertura de la secuencia que se ilustra en cuadros rellenos con color azul junto al nombre de la estructura plantilla. Mientras más oscuro sea la tonalidad del recuadro, mayor es la identidad y cobertura de la secuencia diana (Figura 8). Al analizar el árbol de decisiones se puede observar que la mayoría de plantillas poseen una conformación homodimérica (Figura 8A),

cuya estructura corresponde a la unidad básica de la subunidad catalítica de AHAS que interactúa con la subunidad reguladora mediante su dominio ACT (**Lonhienne et al., 2020**). Además, las plantillas diméricas consideradas por el servidor poseen el mayor grado de identidad y cobertura de la secuencia diana. Dentro de este grupo se encuentra la estructura plantilla, 3E9Y, seleccionada para construir el modelo de *Cq*AHAS, y acordemente, el modelo de *Cq*AHAS silvestre fue generado como un homodímero. Adicionalmente, el análisis PPI (interfaz proteína-proteína) muestra que existe una mayor conservación para las interfaces establecidas en los complejos homodiméricos (Figura 8B). De esta forma, se puede concluir que el modelo homodimérico de *Cq*AHAS es el más apropiado. Estos resultados son congruentes con la estructura del complejo holoenzima de AHAS, en el cual la subunidad catalítica forma un homodímero, el cual está unido a la subunidad reguladora (**Lonhienne et al., 2020**). De esta forma, la estabilización de una estructura tetramérica es virtualmente inviable en el contexto celular y solamente se ha podido observar en situaciones donde la subunidad reguladora está ausente y las concentraciones de subunidad catalítica son altas (en el orden μM).

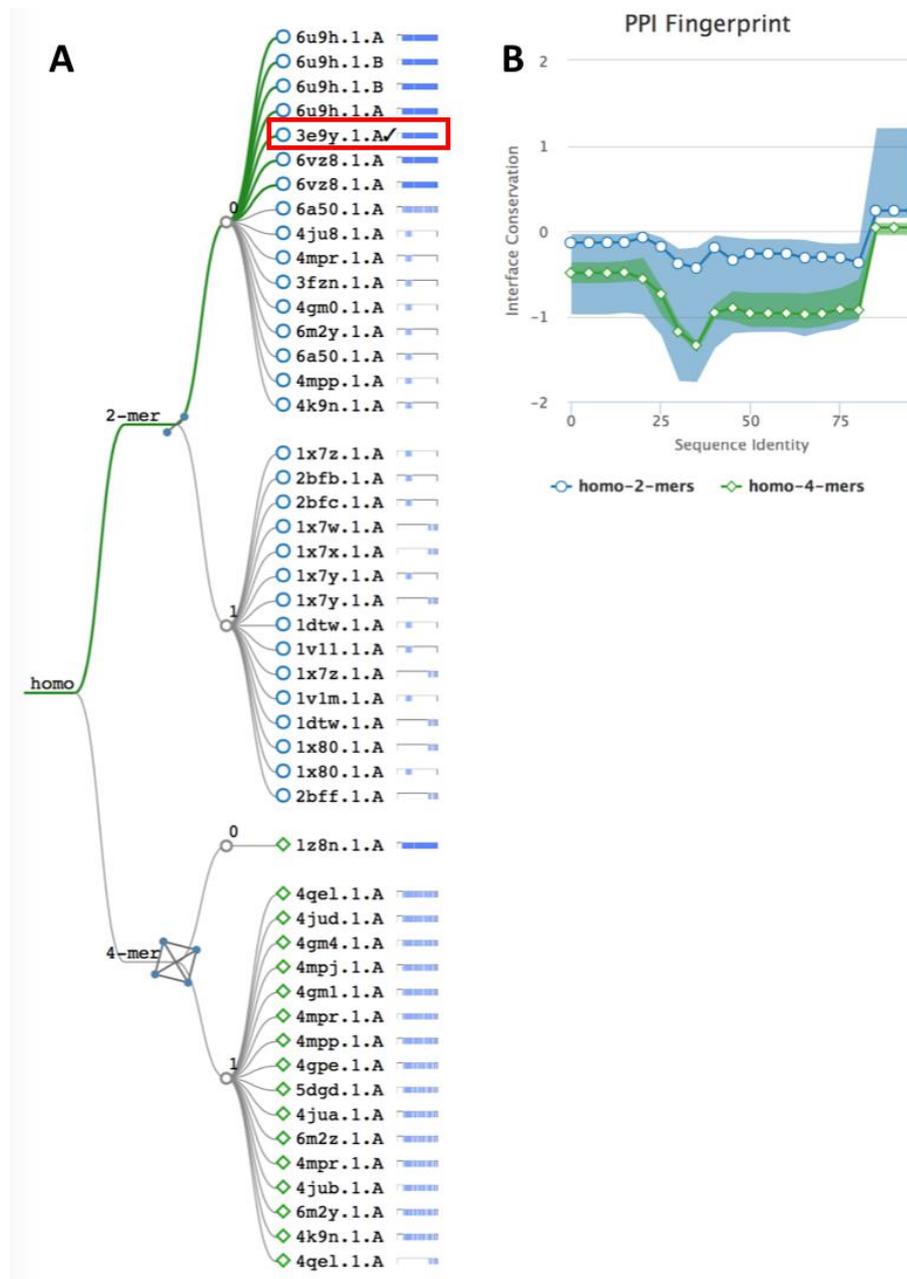


Figura 8. Árbol de decisiones construido por SWISS-MODEL en función de la conformación oligomérica de las estructuras plantilla consideradas para generar el modelo tridimensional de *CqAHAS*.

A) Cada hoja del árbol corresponde a una plantilla etiquetada con su código PDB. El recuadro de color rojo indica la secuencia (3E9Y.1.A) que presenta una identidad y cobertura superior con respecto a las 50 plantillas consideradas para la construcción del modelo de *CqAHAS*. Los cuadros rellenos con color blanco (ausencia) o azul (presencia) indican la cobertura de la secuencia diana. B) La huella de interacciones proteína-proteína (PPI fingerprint) muestra que los residuos de *CqAHAS* tienen mayor grado de conservación (valores menores a 0) en las estructuras plantilla homodiméricas.

SWISS-MODEL identificó ciertas variaciones en los residuos de aminoácidos que conforman el sitio de unión de los cofactores FAD y ThDP, por lo cual estos ligandos no fueron incluidos en el modelo tridimensional de *CqAHAS* (Figura 9A). Sin embargo, los cofactores de la enzima fueron insertados en el polipéptido por sobre posición con la estructura plantilla 3E9Y mediante Wincoot (Figura 9B).

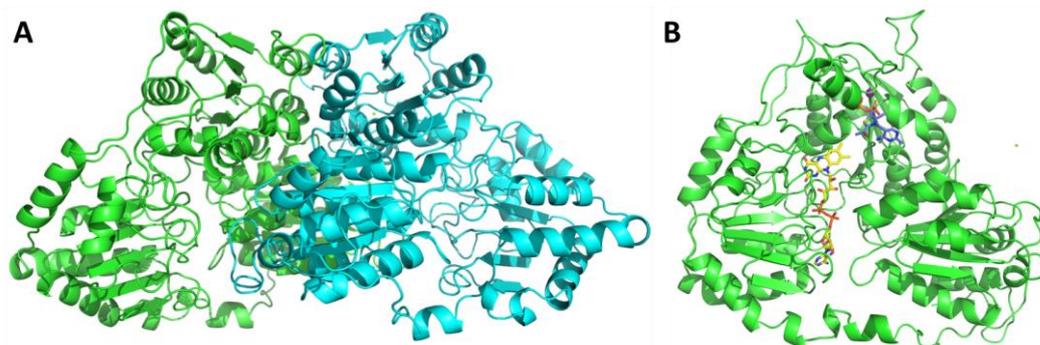


Figura 9. Modelo tridimensional de *CqAHAS*

*A) Representación cartoon de *CqAHAS* con base a las coordenadas 3D generadas por SWISS-MODEL. La enzima es un homodímero, unidad básica para realizar la actividad catalítica de la enzima. Cada cadena de polipéptido ha sido coloreada de forma distinta*

*B) Representación cartoon de un solo monómero de *CqAHAS* con sus cofactores representados en modelos de palillos. Los átomos de carbono en son amarillo para FAD, azul para ThDP y verde para el polipéptido. Los átomos de nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre son de color azul, rojo, naranja y amarillo, respectivamente. El ión magnesio está representado por una esfera de color magenta.*

De entre las cinco familias de herbicidas comerciales que inhiben AHAS, las IMIs y SUs son las más comunes debido a que fueron las primeras familias en descubrirse y aprobarse para uso comercial. De hecho estos inhibidores ingresaron al mercado tiempo antes de que se conociera que ejercen su actividad sobre AHAS (Duggleby & Pang, 2000). Por otra parte, los inhibidores de ambas familias son altamente efectivos para erradicar plantas arvenses de cultivos comerciales y cuentan con gran aceptación por su baja tasa de aplicación en campo (10 a 100 g/ha) buena absorción, actividad pre y post germinación, tasa de degradación moderada o rápida en suelo y baja toxicidad para los animales (Garcia et al., 2017; Russell et al., 2002).

Con estos antecedentes y con base al análisis estructural de los complejos CE-*AtAHAS* e IQ-*AtAHAS* y a los resultados obtenidos en estudios de campo y laboratorio, se consideró apropiado ensayar las mutaciones A114T y P189S en *CqAHAS* (A122 y P197 en *AtAHAS*). **Palmieri (2019)** demostró que la mutación A122T otorga resistencia a herbicidas de la familia IMI en plantas como *S. ptychanthum*, *A.hybridus* y *E.crus-galli*. Por otra parte, **Fartyal et al., (2018)** demostraron que la sustitución P171S (P197 en *AtAHAS*) le confiere a plantas de arroz (*Oriza sativa*) resistencia al herbicida bensulfurón metil (BM), miembro de la familia SU. En ambos estudios se reportó que las plantas no presentaron ninguna diferencia fenotípica con respecto a las variables silvestres (Wild type, WT) por lo que se infiere que las sustituciones introducidas en la enzima AHAS no ocasionaron cambios en sus propiedades catalíticas. De hecho, la variante mutante de *Oriza sativa* tiene un amplio potencial para generar altos rendimientos en campo con respecto a la variedad WR, ya que el programa de control de malezas en su cultivo permite la aplicación de un herbicida de amplio espectro, como el BM. Además, existe un amplio registro de la ocurrencia de las mutaciones A122T y P197S en diferentes plantas arvenses (**WeedScience, 2021**), lo cual, en conjunto, sugiere que al generar una planta de quinua genéticamente modificada mediante las mutaciones A114T o P189S en *CqAHAS* no se produciría un desarrollo anormal de la planta.

La hipótesis planteada en el presente proyecto de investigación propone que la introducción de sustituciones (A114T o P189S) en el sitio de unión de herbicidas de *CqAHAS* es capaz de generar resistencia a herbicidas de las familias sulfonilurea (CE) e imidazolinona (IQ). Para demostrar esta hipótesis, se generó variantes mutantes de *CqAHAS* con base al modelo tridimensional obtenido mediante SWISS-MODEL. Las mutaciones A114T y P189S fueron introducidas, por separado, en el sitio de unión de herbicidas mediante el programa WinCoot (Figura 10). Los ángulos de torsión para ambos residuos fueron refinados mediante Yasara (**Krieger et al., 2009**). La comparación entre el sitio de unión de herbicidas de *CqAHAS* silvestre con las variantes mutantes muestra que la sustitución P189S introduce un cambio sustancial en la estructura y naturaleza de la cadena lateral del residuo prolina. Por ejemplo, la cadena lateral de la prolina forma un anillo de cinco miembros, lo que le otorga un mayor volumen con respecto a la cadena lateral de la serina, la cual es mucho más corta. Además, la prolina es un residuo de carácter hidrofóbico, mientras que la cadena lateral de la serina posee un grupo OH en su parte terminal, lo cual le otorga una

característica polar sin carga (Figuras 10A y 10C). Por otra parte, la sustitución A114T principalmente provoca una reducción en el volumen del sitio de unión de los herbicidas debido a que la treonina, a diferencia de la alanina, posee los grupos CH₃ y OH unidos al C β de su cadena lateral (Figuras 10A y 10B). Al igual que la serina, la treonina también posee un grupo OH que le da una característica polar.

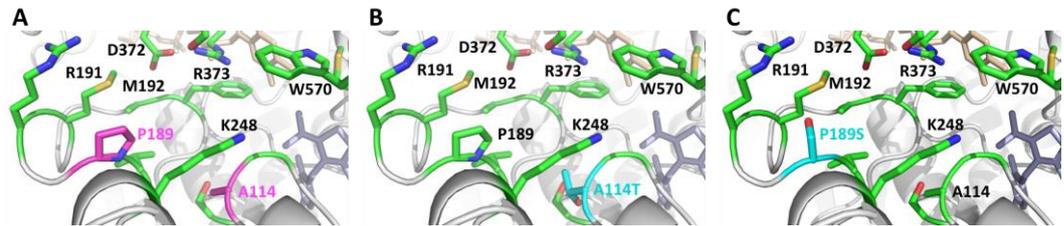


Figura 10. Mutaciones puntuales introducidas en *CqAHAS*.

*A) Sitio de unión a herbicidas en *CqAHAS* silvestre (WT). B) Modelo de la variante mutante A114T. C) Modelo de la variante mutante P189S. Los residuos que forman contactos no covalentes con los inhibidores IQ o CE se muestran en modelos de palillos. Los residuos A114 y P189, modificados en el presente estudio, se muestran de diferente color.*

3.1.4. Efecto de las mutaciones A114T y P189S en el modo de unión de herbicidas de las familias IMI y SU

El acoplamiento molecular, también conocido como molecular docking en inglés, es una herramienta muy útil que nos permite predecir la energía de unión y el modo de enlace entre un ligando y una proteína. Estos parámetros se relacionan a la naturaleza y número de las interacciones no covalentes que se dan entre los átomos del ligando y los residuos que conforman su sitio de unión en la proteína o receptor (Nataraj et al., 2017). De esta forma, con la finalidad de observar el efecto de las mutaciones A114T y P189S sobre la energía y modo de unión de los inhibidores CE e IQ en el sitio de unión de herbicidas de *CqAHAS*, se realizó el acoplamiento empleando el software GOLD y los modelos computacionales construidos para la forma silvestre *CqAHAS* y sus variantes mutantes. GOLD arroja una tabla de resultados, donde las variables más importantes son el valor de SCORE y S(PLP). El SCORE corresponde a la puntuación global del acoplamiento y es la variable que mejor resume los cálculos efectuados por GOLD. El SCORE se determina tomando en cuenta el coeficiente PLP (una

simulación de la atracción y repulsión de las moléculas), coeficiente del potencial de choques atómicos, coeficiente de torsión del ligando, coeficiente energético de la proteína, coeficiente de restricciones de movimiento, función de enlaces de hidrógeno y enlaces metálicos. Mientras mayor sea el valor de SCORE, mayor será la afinidad del ligando por la proteína. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, el valor PLP refleja el equilibrio entre la atracción y repulsión de cada uno de los átomos del ligando y de los residuos en su entorno. En este caso, valores negativos reflejan una mayor atracción, mientras que valores positivos representan repulsión (**Cambridge, 2019**).

Primeramente, se realizó el acoplamiento molecular de IQ y CE en el sitio de unión de herbicidas de la forma nativa de la enzima (WT). De esta forma tanto los valores de SCORE como la pose de los herbicidas al unirse a *CqAHAS* sirvieron como control para evaluar el efecto de las mutaciones sobre la unión de IQ y CE. El valor de SCORE para CE fue de 80.85, mientras que para IQ fue igual a 50.91 (Tabla 5). Los valores de S(PLP) para ambos herbicidas fue negativo, lo cual indica que tienen afinidad por la enzima. En función a estos resultados se podría decir que CE es mejor inhibidor que IQ, ya que la afinidad de CE por la enzima es aproximadamente 1.6 veces más alta que aquella observada para IQ. Esto es congruente con la notable diferencia que existe en las K_i reportadas para estos herbicidas al inhibir *AtAHAS*. Por ejemplo, los valores de K_i para CE e IQ al unirse a *AtAHAS* son 74.7 nM y 18500 nM, respectivamente (**Garcia, et al., 2017**). Por otra parte, esta comparación permite inferir que una pequeña variación en las puntuaciones SCORE y PLP corresponden a una amplia variación en la constante de inhibición.

Tabla 5. Valores de puntuación del acoplamiento molecular de CE e IQ en el sitio de unión de herbicidas de *Cq*AHAS silvestre y mutantes.

Ligando	SCORE (CHEMPLP)	S (PLP)
WT		
CE	80.85	-77.55
IQ	50.91	-46.57
A114T		
CE	80.08	-72.03
IQ	50.42	-45.43
P189S		
CE	77.81	-71.74
IQ	49.74	-48.00

CE= Clorimurón etil; IQ= Imazaquín

Además, se comparó el modo de unión determinado por GOLD para el acoplamiento de CE e IQ en la forma silvestre de *Cq*AHAS con el modo de unión determinado para estos herbicidas en *At*AHAS mediante cristalografía de rayos X (Figura 11) (McCourt et al., 2006). La superposición de los complejos CE-*Cq*AHAS y CE-*At*AHAS (Figura 11A) o IQ-*Cq*AHAS e IQ-*At*AHAS (Figura 11B) sugiere que el modo de unión de los herbicidas en ambas enzimas es virtualmente idéntico. Esto se debe al alto grado de conservación que existe en los residuos que contornean el sitio de unión de herbicidas en AHAS en el reino vegetal (Duggleby & Pang, 2000), incluyendo a *At*AHAS y *Cq*AHAS (Figura 6). Como se observa en la figura 11B, la fracción 4-metil-5-oxo-4-propan-2-il-1H-imidazol de IQ presenta una pequeña variación en la conformación que adopta en ambas enzimas, lo cual parece estar relacionado a los ajustes que sufren las cadenas laterales de los residuos que contornean el sitio de unión durante la asociación del inhibidor (Garcia, et al., 2017), aspecto que puede ser difícil de simular computacionalmente. Por otra parte, esta comparación valida los resultados proporcionados por GOLD y permite evaluar el efecto de mutaciones puntuales introducidas en *Cq*AHAS sobre la afinidad y modo de unión de los herbicidas.

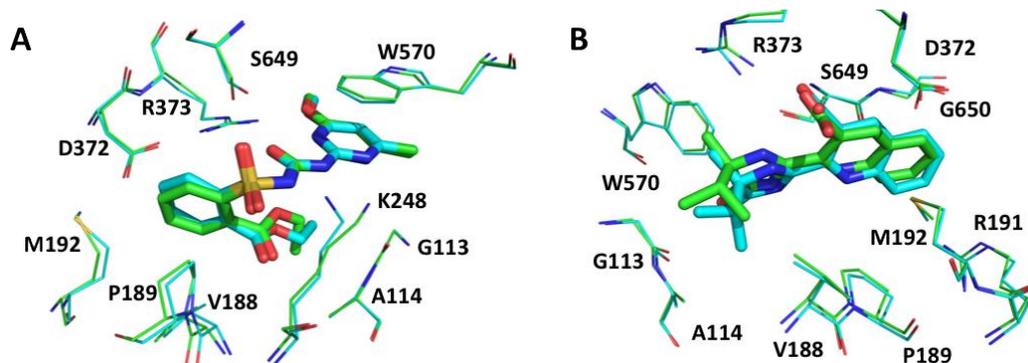


Figura 11. Sitio de unión de CE e IQ en CqAHAS y AtAHAS. *A) Superposición del complejo CE-CqAHAS silvestre (WT) y CE-AtAHAS. B) Superposición del complejo IQ-CqAHAS silvestre (WT) e IQ-AtAHAS. Los residuos que forman interacciones con los herbicidas se muestran en modo de palillos finos, mientras que los inhibidores se muestran en modelos de cilindros. Los átomos de carbono son de color verde para CqAHAS y cian para AtAHAS. Los colores de los otros átomos siguen el esquema descrito anteriormente.*

Posteriormente, se realizó el acoplamiento molecular de CE e IQ en las variantes A114T y P189S de CqAHAS. Los resultados sugieren la mutación P189S puede provocar resistencia al herbicida CE, mientras que la mutación A114T tiene un efecto negativo sobre la unión de IQ a la enzima (Tabla 5). El acoplamiento de CE en cada variante mutante arrojó valores de SCORE y S(PLP) iguales a 80.08 y -72.03 (A114T) y 77.81 y -71.74 (P189S). En cada caso, las puntuaciones observadas fueron inferiores a aquellas del control. Sin embargo, se puede concluir que los valores determinados por GOLD para la mutación P189S son significativamente menores que aquellos calculados para la variante silvestre y el mutante A114T.

El análisis tridimensional de los resultados sugiere que la sustitución A114T provoca un cambio en la conformación del grupo etil-2-benzoato debido los choques estéricos que ocurren con el grupo CH₃ que de la cadena lateral de la treonina (Figura 12A y 12B). Las interacciones que CE forma con A114 son de tipo apolar; por lo cual, las distancias entre el grupo éster de CE y el C β de la alanina son de 3.7 a 3.9 Å (Figura 12A). En contraste, en presencia de la cadena lateral de la treonina, más voluminosa que aquella de la alanina, estas distancias se reducen a 2.5 y 2.8 Å, lo cual genera interacciones negativas que provocan un giro de 180° en el anillo bencénico con respecto al grupo sulfonilo (Figura 12B). Se ha reportado que la mutación A122T en *Xanthium strumarium* (Bernasconi et al., 1995) *Solanum ptycanthum* (Milliman et al., 2003), *Amaranthus powellii*

(McNaughton et al., 2005) y *Amaranthus hybridus* (Whaley et al., 2006), no provoca resistencia a herbicidas de la familia SU. Esto justifica el hecho de que el valor de SCORE reportado por GOLD para el acoplamiento de CE en el mutante A114T sea tan solo 1% menor con respecto al control. De acuerdo a los estudios realizados en *AtAHAS*, es necesaria la sustitución de la alanina por un residuo de mayor volumen para generar una resistencia a SUs. Por ejemplo, la mutación A122V incrementó 4.1 veces el valor de K_i de CE (Chang & Duggleby, 1998a).

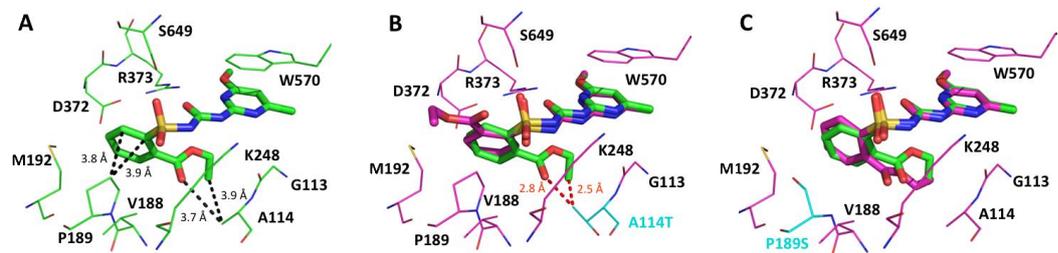


Figura 12. Acoplamiento molecular de CE en las variantes silvestre y mutantes de *CqAHAS* **A)** Complejo CE-*CqAHAS* silvestre (WT). **B)** Complejo CE-*CqAHAS*-A114T. **C)** Complejo CE-*CqAHAS*-P189S. Con el fin de observar las diferencias en el modo de unión de CE en las variantes mutantes, en los paneles B y C se superpuso la conformación que adopta el inhibidor cuando se une a la variante WT. Los residuos que forman interacciones con el herbicida se muestran en modo de palillos finos, mientras que el inhibidor se muestra en modelo de cilindros. Los átomos de carbono son de color verde para la variante silvestre, mientras que son de color magenta para las variantes mutantes. Los residuos A114T y P189S se muestran de color cian. Los colores de los otros átomos siguen el esquema descrito anteriormente. Las líneas punteadas de color negro representan interacciones favorables entre la enzima con el inhibidor, mientras que las líneas de color rojo muestran interacciones desfavorables.

El presencia de la sustitución P189S también se pudo observar un pequeño cambio en la conformación del grupo etil-2-benzoato de CE, el cual surge debido a la ausencia de las interacciones que la cadena lateral de la prolina forma con el anillo aromático del inhibidor (Figura 12A y 12C). Estudios previos han demostrado que P189 es crucial para la unión de los herbicidas de la familia SU a AHAS de diferentes organismos, ya que forma una interacción π -carbono con el anillo aromático del herbicida (García et al., 2018; Lonhienne et al., 2018). Esta interacción es además responsable de la conformación en “V” que adoptan estos herbicidas en su sitio de unión en la enzima. De acuerdo al valor de S(PLP) determinado para el complejo CE-*CqAHAS*-P189S, la afinidad del inhibidor por la enzima decrece un 7.5%, lo cual en *Kochia scoparia* (Guttieri et al., 1995),

Lindernia dubia (Uchino & Watanabe, 2002), *Amaranthus blitoides* (Sibony & Rubin, 2003) y *Oriza sativa* (Fartyal et al., 2018), entre otras plantas, genera una fuerte resistencia a inhibidores de la familia SU.

En cuanto a los experimentos realizados con el herbicida IQ en el mutante A114T se obtuvo valores de SCORE y PLP inferiores al control WT (Tabla 5). Al analizar el modo de unión de IQ en la enzima se pudo observar un cambio notable en la posición que adopta el inhibidor en el sitio de unión de herbicidas (Figura 13A y 13B). La sustitución de alanina por treonina genera una reducción del espacio ocupado por el grupo propan-2-il de IQ, lo cual provoca el desplazamiento del herbicida hacia la superficie de la proteína. De forma similar a lo observado en el complejo CE-*Cq*AHAS-A114T, el grupo CH₃ de la cadena lateral de la treonina forma choques estéricos con el herbicida ya que este se ubica tan solo a 2.8 o 3.0 Å del átomo más cercano del grupo propan-2-il de IQ (Figura 13B). Sin embargo, el desplazamiento de IQ en 0.2 a 0.4 Å sería suficiente para evitar choques estérico y formar contactos hidrofóbicos apropiados. De esta forma, los resultados sugieren que la sustitución A114T puede generar resistencia baja a moderada a IQ. Además de conocerse que la mutación A122V causa una extremadamente alta resistencia a IQ en *At*AHAS (Chang & Duggleby, 1998) no existen datos experimentales procedentes que permitan analizar los datos a mayor profundidad.

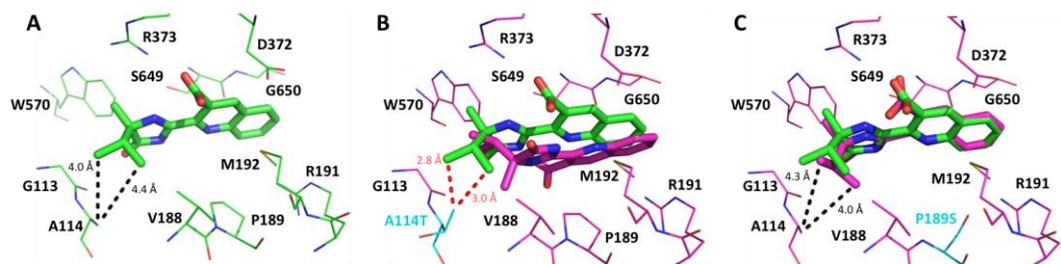


Figura 13. Acoplamiento molecular de IQ en las variantes silvestre y mutantes de CqAHAS **A)** Complejo IQ-CqAHAS silvestre (WT). **B)** Complejo IQ-CqAHAS-A114T. **C)** Complejo IQ-CqAHAS-P189S. Con el fin de observar las diferencias en el modo de unión de IQ en las variantes mutantes, en los paneles B y C se superpuso la conformación que adopta el inhibidor cuando se une a la variante WT. Los residuos que forman interacciones con el herbicida se muestran en modo de palillos finos, mientras que el inhibidor se muestra en modelo de cilindros. Los átomos de carbono son de color verde para la variante silvestre, mientras que son de color magenta para las variantes mutantes. Los residuos A114T y P189S se muestran de color cian. Los colores de los otros átomos siguen el esquema descrito anteriormente. Las líneas punteadas de color negro representan interacciones favorables entre la enzima con el inhibidor, mientras que las líneas de color rojo muestran interacciones desfavorables.

Finalmente, los valores de SCORE y S (PLP) arrojados por GOLD para el acoplamiento de IQ en CqAHAS-P189S (Tabla 5) sugieren que el herbicida se une a la enzima con mayor afinidad con respecto al control (WT). El valor de afinidad PLP incrementó de -46.57 a -48.00 y de esta forma se puede concluir que la sustitución P189S no es capaz de generar una resistencia a IQ. El análisis del complejo IQ-CqAHAS-P189S muestra que la P189 no aporta con interacciones importantes para la unión del herbicida a la enzima (Figura 13A). Por lo tanto, al reemplazar la prolina por serina se esperaría que no ocurra una gran reconfiguración del sitio de unión de herbicidas y el modo de unión de IQ sea virtualmente el mismo que aquel que se observa en la variante silvestre (Figura 13C). Varios estudios han demostrado que esta mutación es capaz de causar algún grado de resistencia a IQ (Sibony & Rubin, 2003)(Kaloumenos et al., 2011) pero al mismo tiempo existe evidencia de que variantes que llevan la mutación P189S mantienen su susceptibilidad al herbicida (Uchino et al., 2007).

3.2. Verificación de la Hipótesis

Se identificaron los sitios de unión de herbicidas mediante los modelos tridimensionales de *CqAHAS* y se realizó el acoplamiento molecular de los herbicidas CE e IQ en las variantes mutantes A114T y P189S. Los resultados obtenidos proporcionaron evidencias para aceptar la hipótesis alternativa. “La introducción de variantes mutantes en el sitio de unión de herbicidas de AHAS de la quinua (*Chenopodium quinoa*) produce resistencia a los herbicidas que tienen como objetivo la enzima AHAS” y, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- El diseño de variantes mutantes de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de quinua (*Chenopodium quinoa*) es de gran importancia para introducir resistencia a herbicidas comerciales que actúan sobre AHAS. Esto permite proporcionar herramientas a los agricultores que faciliten el control integral de malezas.
- Se identificó dos isoformas puntuales completas para la enzima acetohidroxiácido sintasa de quinua (*Chenopodium quinoa*) (*CqAHAS*). Cualquiera de estas isoformas puede ser empleada para la generación de variantes mutantes de la enzima mediante el uso de ingeniería genética.
- Se construyó el modelo tridimensional de *CqAHAS* a partir de la estructura tridimensional de *AtAHAS* en complejo con el herbicida MS (3E9Y). Esto fue fundamental para poder determinar la afinidad de los inhibidores CE e IQ por el sitio de unión de herbicidas en *CqAHAS*.
- Se construyó los modelos tridimensionales de los mutantes A114T y P189S, modelos que sirvieron para realizar el acoplamiento molecular de CE e IQ y evaluar la generación de resistencia inducida por efecto de las sustituciones de aminoácidos

4.2. Recomendaciones

- Determinar el efecto de las mutaciones A114T y P189S sobre la afinidad de inhibidores pertenecientes a las familias de herbicidas PB, SCT y TP con el fin de evaluar su potencial uso sobre las variantes mutantes diseñadas en el presente estudio.
- Estudiar las variantes mutantes realizadas en el presente estudio a nivel de laboratorio para así determinar su resistencia a los inhibidores seleccionados.
- Diseñar nuevas variantes mutantes con el objetivo de determinar la mejor estrategia de construcción de una línea de quinua genéticamente modificada, resistente a herbicidas que actúan sobre AHAS.

CAPÍTULO V

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bernasconi, P., Woodworth, A., Rosen, B., Subramanian, M., & Siehl, D. (1995). A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(29), 17381–17385. <https://doi.org/10.1074/JBC.270.29.17381>
- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8>
- Bowman, S., Churcher, C., Badcock, K., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Dedman, K., Devlin, K., & Gentles, S. (1997). *acetolactate synthase catalytic subunit [Saccharomyces cerevisiae S288 - Protein - NCBI*. REVISTA Nature 387. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/6323755>
- Cambridge. (2019). *GOLD User Guide A Component of the GOLD Suite* (No. 800579). www.ccdc.cam.ac.uk
- Chang, A. K., & Duggleby, R. G. (1998a). Herbicide-resistant forms of Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase: Characterization of the catalytic properties and sensitivity to inhibitors of four defined mutants. *Biochemical Journal*, 333(3), 765–777. <https://doi.org/10.1042/bj3330765>
- Chang, A. K., & Duggleby, R. G. (1998b). Herbicide-resistant forms of Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase: Characterization of the catalytic properties and sensitivity to inhibitors of four defined mutants. *Biochemical Journal*, 333(3), 765–777. <https://doi.org/10.1042/bj3330765>
- Duggleby, R. G., McCourt, J. A., & Guddat, L. W. (2008). Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3), 309–324. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.004>
- Duggleby, R. G., & Pang, S. S. (2000). Acetohydroxyacid Synthase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 33(1), 1–36. [http://www.ronduggleby.com/publications/Pub112\(byRGD\).pdf](http://www.ronduggleby.com/publications/Pub112(byRGD).pdf)
- FAO. (2011). La Quinoa: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria

mundial. *Oficina Regional Para America Latina y El Caribe, FAO*, 37, 66.
<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.03.010>

Fartya, D., Agarwal, A., James, D., Borphukan, B., Sheri, V., Agrawal, P., & Reddy, M. (2018). Developing dual herbicide tolerant transgenic rice plants for sustainable weed management | Enhanced Reader. *Scientific Reports*. chrome-extension://dagcmkpagjlhakfdhnbomgmjdpkdklff/enhanced-reader.html?pdf=https%3A%2F%2Fbrxt.mendeley.com%2Fdocument%2Fcontent%2Fadf0a78e-8f65-3fa8-a20f-013ed0f3e0eb

Fartyal, D., Agarwal, A., James, D., Borphukan, B., Ram, B., Sheri, V., Agrawal, P. K., Mohan, V., Achary, M., & Reddy, M. K. (2018). Developing dual herbicide tolerant transgenic rice plants for sustainable weed management. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-29554-9>

Fartyal, Dharendra, Agarwal, A., James, D., Borphukan, B., Ram, B., Sheri, V., Agrawal, P. K., Achary, V. M. M., & Reddy, M. K. (2018). Developing dual herbicide tolerant transgenic rice plants for sustainable weed management. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29554-9>

Garcia, M., Chua, S. M. H., Low, Y. S., Lee, Y. T., Agnew-Francis, K., Wang, J. G., Nouwens, A., Lonhienne, T., Williams, C. M., Fraser, J. A., & Guddat, L. W. (2018). Commercial AHAS-inhibiting herbicides are promising drug leads for the treatment of human fungal pathogenic infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(41), E9649–E9658.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1809422115>

Garcia, M. D., Nouwens, A., Lonhienne, T., & Guddat, L. (2017). Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(7), E1091–E1100. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616142114>

Garcia, M., Wang, J., Lonhienne, T., & Guddat, L. W. (2017). Crystal structure of plant acetohydroxyacid synthase, the target for several commercial herbicides. *FEBS Journal*, 284(13), 2037–2051. <https://doi.org/10.1111/febs.14102>

Guttieri, M. J., Eberlein, C. V., & Thill, D. C. (1995). Diverse mutations in the acetolactate synthase gene confer chlorsulfuron resistance in kochia (*Kochia scoparia*) biotypes. *Weed Science*, 43(2), 175–178.
<https://doi.org/10.1017/s0043174500081029>

- Kaloumenos, N. S., Adamouli, V. N., Dordas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). Corn poppy (*Papaver rhoeas*) cross-resistance to ALS-inhibiting herbicides. *Pest Management Science*, 67(5), 574–585. <https://doi.org/10.1002/ps.2104>
- Krieger, E., Joo, K., Lee, J., Lee, J., Raman, S., Thompson, J., Tyka, M., Baker, D., & Karplus, K. (2009). Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. In *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* (Vol. 77, Issue SUPPL. 9, pp. 114–122). Proteins. <https://doi.org/10.1002/prot.22570>
- LaRossa, R. A., & Schloss, J. V. (1984). The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry*, 259(14), 8753–8757. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)47217-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)47217-6)
- Lee, Y. T., & Duggleby, R. G. (2001). Identification of the regulatory subunit of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase and reconstitution with its catalytic subunit. *Biochemistry*, 40(23), 6836–6844. <https://doi.org/10.1021/bi002775q>
- Léon, R., & Noboa, L. (2018). *Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra ESCUELA DE NEGOCIOS Y COMERCIO INTERNACIONAL INFORME FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN TEMA: EXPORTACIÓN DE HARINA DE QUINUA HACIA ALEMANIA DE “LA ASOCIACIÓN DE PRODUCTORES DE QUINUA DEL CARCHI” CA.*
- Lew, JM, Kapopoulou, A., Jones, LM, & Cole. (2011). *Acetolactato Sintasa subunidad grande IlvB [Mycobacterium tuberculosis H - Proteína - NCBI. REVISTA Tuberculosis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/57117044>*
- Lonhienne, T., Garcia, M. D., Noble, C., Harmer, J., Fraser, J. A., Williams, C. M., & Guddat, L. W. (2017). High Resolution Crystal Structures of the Acetohydroxyacid Synthase-Pyruvate Complex Provide New Insights into Its Catalytic Mechanism. *ChemistrySelect*, 2(36), 11981–11988. <https://doi.org/10.1002/slct.201702128>
- Lonhienne, T., Garcia, M. D., Pierens, G., Mobli, M., Nouwens, A., & Guddat, L. W. (2018). Structural insights into the mechanism of inhibition of AHAS by herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(9), E1945–E1954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714392115>
- Lonhienne, T., Low, Y. S., Garcia, M. D., Croll, T., Gao, Y., Wang, Q., Brillault, L., Williams, C. M., Fraser, J. A., McGeary, R. P., West, N. P., Landsberg, M. J., Rao,

- Z., Schenk, G., & Guddat, L. W. (2020). Structures of fungal and plant acetohydroxyacid synthases. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2514-3>
- Lonhienne, T., Nouwens, A., Williams, C. M., Fraser, J. A., Lee, Y. T., West, N. P., & Guddat, L. W. (2016). Commercial Herbicides Can Trigger the Oxidative Inactivation of Acetohydroxyacid Synthase. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(13), 4247–4251. <https://doi.org/10.1002/anie.201511985>
- Mazon, N. R. M. P. E. E. J. T. C. (2002). *Catalogo Del Banco De Germoplasma De Quinoa De Iniap-Ecuador - Nelson Mazon O, Marco Rivera M, Eduardo Peralta I, Jaime Estrella E, Cesar Tapia B - Google Libros* (INIAP). https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=E4szAQAAMAAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=related:jHorRMJI4gIJ:scholar.google.com/&ots=VQf66hicD3&sig=yhLVz_CFqENhJ3EJe8SguvAOswk#v=onepage&q&f=false
- McCourt, J. A., Pang, S. S., King-Scott, J., Guddat, L. W., & Duggleby, R. G. (2006). Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 569–573. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508701103>
- McNaughton, K. E., Letarte, J., Lee, E. A., & Tardif, F. J. (2005). Mutations in ALS confer herbicide resistance in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and Powell amaranth (*Amaranthus powellii*). *Weed Science*, 53(1), 17–22. <https://doi.org/10.1614/ws-04-109>
- Mestanza, C. (2013, December 11). *CONICYT: Investigación en Quínoa obtiene beca en concurso nacional de tesis de doctorado | Facultad de Ciencias Agrarias y Alimentarias*. <https://agrarias.uach.cl/conicyt-investigacion-en-quinoa-obtiene-beca-en-concurso-nacional-de-tesis-de-doctorado/>
- Mestanza, C., Riegel, R., Silva, H., & Vásquez, S. C. (2015). Characterization of the acetohydroxyacid synthase multigene family in the tetraploide plant *Chenopodium quinoa*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(6), 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.07.003>
- Milliman, L. D., Riechers, D. E., Wax, L. M., & Simmons, F. W. (2003). Characterization of two biotypes of imidazolinone-resistant eastern black nightshade (*Solanum ptycanthum*). *Weed Science*, 51(2), 139–144. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2003\)051\[0139:cotboi\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2003)051[0139:cotboi]2.0.co;2)
- Mujica Sánchez, Á. M. H., Miranda Colín, S., Molina Galán, J. D. de tesi, Carballo

- Quiroz, A., Martínez Garza, Á., & Angeles Arrieta Hermilo H., asesor. (1988). *Parámetros genéticos e índices de selección en quinua (Chenopodium quinoa Willd.)*. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.
- Nataraj, P., Khajamohiddin, S., & Jack, T. (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews* 2017 9:2, 9(2), 91–102. <https://doi.org/10.1007/S12551-016-0247-1>
- Palmieri, V. (2019). INHIBIDORES ALS Y GLIFOSATO EN UNA SUBPOBLACIÓN DE *Amaranthus palmeri* IDENTIFICADA A CAMPO. *TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTORA EN CIENCIAS AGRARIAS DIRECTORA:*, 135.
- Pang, S. S., Guddat, L. W., & Duggleby, R. G. (2004). Crystallization of Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase in complex with the sulfonylurea herbicide chlorimuron ethyl. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(1), 153–155. <https://doi.org/10.1107/S0907444903025423>
- Pedrerros, A. (2013). Manejo de malezas en pasturas. *Manual de Frutilla*, 73–87.
- Pérez, A. (1996). Arabidopsis: un modelo para el estudio de las interacciones patógeno-planta. *Encuentros En La Biología*, 30, 4. <http://www.encuentros.uma.es/encuentros30/Arabidop.html>
- Revista Lideres. (2017, March 9). *La quinua orgánica, el trampolín de campesinos / Revista Líderes*. <https://www.revistalideres.ec/lideres/quinua-organica-trampolin-campesinos-peru.html>
- Russell, M. H., Saladini, J. L., & Lichtner, F. (2002). Sulfonylurea herbicides. *Pesticide Outlook*, 13(4), 166–173. <https://doi.org/10.1039/b206509f>
- Salanoubat, M., Fartmann, B., Delseny, M., Simone, V., Wincker, P., Schafer, M., Wurmbach, E., Wiedelmann, R., Nyakatura, G., Simionati, B., Nordsiek, G., Terol, J., Ottenwalder, B., Purnelle, B., Cottet, A., Liguori, R., Zaccaria, P., Tallon, L., Utterback, T., ... Yamada, M. (2000). *resistente al clorsulfurón / imidazolinona 1 [Arabidopsis thaliana] - Proteína - NCBI*. REVISTA Nature 408. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AEE78430.1>
- Sibony, M., & Rubin, B. (2003). Molecular basis for multiple resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides and atrazine in *Amaranthus blitoides* (prostrate pigweed). *Planta*, 216(6), 1022–1027. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0955-6>
- SWISS Institute of Bioinformatics. (n.d.). *modelado por homología de estructuras y*

complejos de proteínas. Retrieved July 25, 2021, from <https://swissmodel.expasy.org/docs/help>

Tittmann, K., Schröder, K., Golbik, R., McCourt, J., Kaplun, A., Duggleby, R. G., Barak, Z., Chipman, D. M., & Hübner, G. (2004). Electron transfer in acetohydroxy acid synthase as a side reaction of catalysis. Implications for the reactivity and partitioning of the carbanion/enamine form of (α -hydroxyethyl)thiamin diphosphate in a “nonredox” flavoenzyme. *Biochemistry*, *43*(27), 8652–8661. <https://doi.org/10.1021/bi049897t>

Tranel, P. J., & Wright, T. R. (2002). Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science*, *50*(6), 700–712. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2002\)050\[0700:rrowta\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2002)050[0700:rrowta]2.0.co;2)

Uchino, A., Ogata, S., Kohara, H., Yoshida, S., Yoshioka, T., & Watanabe, H. (2007). Molecular basis of diverse responses to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in sulfonylurea-resistant biotypes of *Schoenoplectus juncooides*: Research paper. *Weed Biology and Management*, *7*(2), 89–96. <https://doi.org/10.1111/j.1445-6664.2007.00240.x>

Uchino, A., & Watanabe, H. (2002). Mutations in the acetolactate synthase genes of sulfonylurea-resistant biotypes of *Lindernia* spp. *Weed Biology and Management*, *2*(2), 104–109. <https://doi.org/10.1046/j.1445-6664.2001.00054.x>

Wang, J.-G., Lee, P. K.-M., Dong, Y.-H., Pang, S. S., Duggleby, R. G., Li, Z.-M., & Guddat, L. W. (2009). Crystal structures of two novel sulfonylurea herbicides in complex with *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *The FEBS Journal*, *276*(5), 1282–1290. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2009.06863.X>

WeedScience. (2021). *Base de datos internacional de malezas resistentes a herbicidas*. <http://www.weedscience.org/Home.aspx>

Whaley, C. M., Wilson, H. P., & Westwood, J. H. (2006). ALS resistance in several smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*) biotypes. *Weed Science*, *54*(5), 828–832. <https://doi.org/10.1614/ws-05-040r.1>

ANEXOS

Anexo 1 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las dos isoformas de AHAS en *C. quinoa*. * indica que los aminoácidos comparados están conservados, mientras que los espacios en blanco indican que no están conservados

```

CqAHAS1      1 MAATSTNPSFSFPPTLSSKTPKQSSIIYALPFPSPNPKTPSSFLRRPLQISASQSANPKPP
CqAHAS2      1 MAATSSNPSFSFPPTLSSKTPKQSSIIYSLPFPPTNPKTPSSFLRRPLQISASQSANPKPP
          *****

CqAHAS1     61 SATQTAVPSPLTDENPQSFVSRFAPDEPRKGCVDLVEALEREVGTNVFAYPPGGASMEIHQ
CqAHAS2     61 SATQTAVPSPLTDENPQSYVSRFAPDEPRKGCVDLVEALEREVGTNVFAYPPGGASMEIHQ
          *****

CqAHAS1    121 ALTRSSSIRNVLPHEQGGVFAAEGYARATGRVGVC IATSGPGATNLVSGLADALLDSVP
CqAHAS2    121 ALTRSGSIRNVLPHEQGGVFAAEGYARATGRVGVC IATSGPGATNLVSGLADALLDSVP
          *****

CqAHAS1    181 LVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSI TKHNYLVLDVEDIPRVVKEAFYLANSGRPG
CqAHAS2    181 LVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSI TKHNYLVLDVEDIPRVVKEAFYLANSGRPG
          *****

CqAHAS1    241 PVLIDIPKDIQQQLVVPNWDQPIKLG GYVSR LPKSKFSANEGLLEQIVRLMSEAKKPV L
CqAHAS2    241 PVLIDIPKDIQQQLVVPNWDQPIKLG GYVSR LPKSKFSANEGLLEQIVRLMSEAKKPV L
          *****

CqAHAS1    301 YVGGGCLNSGEELRKFVELTGI PVASTLMGLGAYPCNDELSHMLGMHGT VYANYAVDKA
CqAHAS2    301 YVGGGCLNSSEELRKFVELTGI PVASTLMGLGAYPCNDELSHMLGMHGT VYANYAVDKA
          *****

CqAHAS1    361 DLLLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKKNQPHVSI CADVKLALKGMNK
CqAHAS2    361 DLLLLAFGVRFDDRVTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKKNQPHVSI CADVKLALKGMNK
          *****

CqAHAS1    421 ILEFRKGKLNLDYSSWREELDEQKKK FPLSFKTFGEAIPPQYAIQMLDELTDGNAVISTG
CqAHAS2    421 ILESRKGKLNLDYSSWREELGEQKKK FPLSFKTFGEAIPPQYAIQMLDELTDGDAVISTG
          *** *****

CqAHAS1    481 VGQHQMWA AQHYKYRNPRQWLTS GGLGAMGFGLPAAI GA AVARPE SVVVDIDGDGSFIMN
CqAHAS2    481 VGQHQMWA AQHYKYRNPRQWLTS GGLGAMGFGLPAAI GA AVARPE SVVVDIDGDGSFIMN
          *****

CqAHAS1    541 VQELATIRVENLPVKIMLLNNQH LGMVVQWEDRFYKANRAHTY LGNPSKAAE I FPDMLKF
CqAHAS2    541 VQELATIRVENLPVKIMLLNNQH LGMVVQWEDRFYKANRAHTY LGNPAKEAE I FPDMLKF
          ***** * *****

CqAHAS1    601 AEACDIPAARVTKVSELRAAMQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHLVLPMPISGA AFKDTITEG
CqAHAS2    601 AEACDIPAARVTKVSELRAAMQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHLVLPMPISGA AFKDI INEG
          ***** * **

CqAHAS1    661 DGRTSY
CqAHAS2    661 DGRTSY
          *****

```

Anexo 2 Alineamiento múltiple de las dos isoformas de *CqAHAS* en y *AtAHAS*

<i>AtAHAS</i>	1	MAAATTTTTTSSSISFSTKPSPPSSKSPLPIS-RFSLPFLNPNKSSSSRRRGIKSSSP
<i>CqAHAS1</i>	1	MAAT-----STNPSFSPFPTL-SSKTPKPQSSIYALPFPSNPKTPS-SFLRRPLQISAS
<i>CqAHAS2</i>	1	MAAT-----SSNPSFSPFPTL-SSKTPKPQSSIYSLPFPNPKTPS-SFLRRPLQISAS
<i>AtAHAS</i>	60	SSISAVLNTTNTVTTTPSPTKPKPETFISRFPDQPRKGADILVEALERQGVETVVFAYP
<i>CqAHAS1</i>	53	QSANPKPPSA-TQTAVPSPLTDENPQSFVSRFAPDEPRKGCVDLVEALEREGVTNVFAYP
<i>CqAHAS2</i>	53	QSANPKPPSA-TQTAVPSPLTDENPQSYVSRFAPDEPRKGCVDLVEALEREGVTNVFAYP
		aa a
<i>AtAHAS</i>	120	GGASMEIHQALTRSSSIRNVLPREHQQGVFAAEGYARSSGKPGICIATSGPGATNLVSGL
<i>CqAHAS1</i>	112	GGASMEIHQALTRSSSIRNVLPREHQQGVFAAEGYARATGRVGVCIATSGPGATNLVSGL
<i>CqAHAS2</i>	112	GGASMEIHQALTRSGSIRNVLPREHQQGVFAAEGYARATGRVGVCIATSGPGATNLVSGL
		aa aa aa
<i>AtAHAS</i>	180	ADALLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVMDVEDIPRIIEEAF
<i>CqAHAS1</i>	172	ADALLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRVVKEAF
<i>CqAHAS2</i>	172	ADALLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRVVKEAF
		a
<i>AtAHAS</i>	240	FLATSGRPGPVLVDVPKDIQQQLAIPNWEQAMRLPGYMSRMPKPP----EDSHLEQIVRL
<i>CqAHAS1</i>	232	YLANGRPGPVLIDIPKDIQQQLVVPNWDQPIKLGGYVSRLPKSKFSANEGLLEQIVRL
<i>CqAHAS2</i>	232	YLANGRPGPVLIDIPKDIQQQLVVPNWDQPIKLGGYVSRLPKSKFSANEGLLEQIVRL
		a
<i>AtAHAS</i>	296	ISESKKPVLYVGGGCLNSSDELGRFVELTGIPVASTLMGLGSYPCDDELSDLHMLGMHGTV
<i>CqAHAS1</i>	292	MSEAKKPVLYVGGGCLNSGEELRKFVELTGIPVASTLMGLGAYPCNDELSDLHMLGMHGTV
<i>CqAHAS2</i>	292	MSEAKKPVLYVGGGCLNSSEELRKFVELTGIPVASTLMGLGAYPCNDELSDLHMLGMHGTV
		aa
<i>AtAHAS</i>	356	YANYAVEHSDLLAFGVRFDDEVGTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNTPHVSVCGDV
<i>CqAHAS1</i>	352	YANYAVDKADLLAFGVRFDDEVGTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNTPHVSVICADV
<i>CqAHAS2</i>	352	YANYAVDKADLLAFGVRFDDEVGTGKLEAFASRAKIVHIDIDSAEIGKNTPHVSVICADV
<i>AtAHAS</i>	416	KLALQGMNKVLENRAEELKLDGFWRNELNVQKQKFPPLSFKTFGEAIPPQYAIKVLDELTA
<i>CqAHAS1</i>	412	KLALKGMNKILEFRKGLNLDYSSWREELDEQKKKFPPLSFKTFGEAIPPQYAIQMLDELTA
<i>CqAHAS2</i>	412	KLALKGMNKILESARKGLNLDYSSWREELGEQKKKFPPLSFKTFGEAIPPQYAIQMLDELTA
<i>AtAHAS</i>	476	DGKAIISTGVGQHQMWAQAQFYNYKPRQWLSSGGLGAMGFGLPAAIGASVANPDIAIVVDI
<i>CqAHAS1</i>	472	DGNAVIISTGVGQHQMWAQAQHYKYRNPRQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGAAVARPESVVDI
<i>CqAHAS2</i>	472	DGDAVIISTGVGQHQMWAQAQHYKYRNPRQWLTSGGLGAMGFGLPAAIGAAVARPESVVDI
		aa a
<i>AtAHAS</i>	536	DGDGSFIMNVQELATIRVENLPVKVLLLNQHLGMVQWEDRFYKANRAHTFLGDPAQED
<i>CqAHAS1</i>	532	DGDGSFIMNVQELATIRVENLPVKIMLLNQHLMVQWEDRFYKANRAHTYLGNPASKAA
<i>CqAHAS2</i>	532	DGDGSFIMNVQELATIRVENLPVKIMLLNQHLMVQWEDRFYKANRAHTYLGNPAPKEA
		aa
<i>AtAHAS</i>	596	EIFPNMLLFAAACGIPAARVTKKADLREAIQTMLDTPGPYLLDVICPHQEHVLPMPISGG
<i>CqAHAS1</i>	592	EIFPDMLKFAEACDIPAARVTKVSELRAAMQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPISGA
<i>CqAHAS2</i>	592	EIFPDMLKFAEACDIPAARVTKVSELRAAMQKMLDTPGPYLLDVIVPHQEHVLPMPISGA
<i>AtAHAS</i>	656	TFNDVITEGDGRIKY
<i>CqAHAS1</i>	652	AFKDTITEGDGRTSY
<i>CqAHAS2</i>	652	AFKDIINEGDGRTSY

Anexo 3 Sustituciones de aminoácidos de ALS que confieren resistencia a herbicidas y que se identificaron en poblaciones de malezas resistentes a herbicidas.

residue and number ^c	Substitution conferring resistance	Weed species	SU	IMI	Reference
Ala 122	Thr	<i>Xanthium strumarium</i> L.	S	R	Bernasconi et al. (1995)
	Thr	<i>Amaranthus hybridus</i> L.	S	R	Hager and Tranel, unpublished data
	Thr	<i>Solanum ptycanthum</i> L.	S	R	Milliman et al. (2000); D. Riechers, personal communication
Pro 197	His	<i>Lactuca serriola</i> L.	R	r	Guttieri et al. (1992)
	Thr	<i>Kochia scoparia</i> (L.) Shrad	R	S	Guttieri et al. (1995)
	Arg	<i>Kochia scoparia</i> (L.) Shrad	R	ND	Guttieri et al. (1995)
	Leu	<i>Kochia scoparia</i> (L.) Shrad	R	ND	Guttieri et al. (1995)
	Gln	<i>Kochia scoparia</i> (L.) Shrad	R	ND	Guttieri et al. (1995)
	Ser	<i>Kochia scoparia</i> (L.) Shrad	R	ND	Guttieri et al. (1995)
	Ala	<i>Kochia scoparia</i> (L.) Shrad	R	ND	Guttieri et al. (1995)
	Ala	<i>Brassica tournefortii</i> Gouan	R	S	Boutsalis et al. (1999)
	Ile	<i>Sisymbrium orientale</i> L.	R	r	Boutsalis et al. (1999)
	Leu	<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	R	R	Sibony et al. (2001)
Ala 205 Trp 574	Val	<i>Xanthium strumarium</i> L.	r	r	Woodworth et al. (1996a)
	Leu	<i>Xanthium strumarium</i> L.	R	R	Bernasconi et al. (1995)
	Leu	<i>Amaranthus rudis</i> Sauer	R	R	Woodworth et al. (1996b)
	Leu	<i>Amaranthus hybridus</i> L.	R	R	Schmenk et al. (1997)
	Leu	<i>Kochia scoparia</i> (L.) Shrad	R	R	Foes et al. (1999)
	Leu	<i>Sisymbrium orientale</i> L.	R	R	Boutsalis et al. (1999)
	Leu	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.	R	R	Patzoldt et al. (2001)
	Leu	<i>Ambrosia trifida</i> L.	R	R	Patzoldt and Tranel (2002)
Ser 653	Thr	<i>Amaranthus powellii</i> S. Wats.	S	R	McNaughton et al. (2001); F. Tardif, personal

Thr	<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	S	R	communication McNaughton et al. (2001); F. Tardif, personal communication
Asn	<i>Amaranthus rudis</i> Sauer	S	R	Patzoldt and Tranel (2001)
Thr	<i>Amaranthus rudis</i> Sauer	S	R	Patzoldt and Tranel (2001)

a Additions and updates are available at www.weedscience.com.

b Abbreviations: ALS, acetolactate synthase; ND, not determined.

c Amino acid number is standardized to the *Arabidopsis thaliana* sequence.

d S, r, and R indicate little or no resistance (sensitive), moderate resistance (< 10-fold relative to S biotype), and high resistance (> 10-fold) respectively, to sulfonylurea (SU) or imidazolinone (IMI) herbicides. S, r, and R classifications should be considered generalizations (the 10-fold cutoff between r and R classifications in particular) because different herbicides within the SU and IMI classes may provide different responses and results from only one or a few herbicides within each herbicide class have been reported for most R biotypes. (Tranel & Wright, 2002)