



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CAMPECHE

POSTGRADO EN BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD
AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

Identificación y caracterización de tres genes de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasas de *Agave*. Análisis de la correlación de su expresión con la acumulación de saponinas en *A. angustifolia* var. *costero* bajo condiciones de sequía

ZURISADAI MONROY GONZÁLEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

CAMPECHE

2019

La presente tesis titulada: **Identificación y caracterización de tres genes de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasas de *Agave*. Análisis de la correlación de su expresión con la acumulación de saponinas en *A. angustifolia* var. *costero* bajo condiciones de sequía** realizada por la alumna: **Zurisadai Monroy González**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

BIOPROSPECCIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



DRA. AÍDA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

ASESOR



DR. LUIS MANUEL PEÑA RODRÍGUEZ

ASESORA



DRA KARINA VERDEL ARANDA

Sihochac, Champotón, Campeche, enero 2019

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS
REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe Zurisadaí Monroy González, alumna de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección de la Profesora Dra. Aída Martínez Hernández, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis: Identificación y caracterización de tres genes de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasas de *Agave*. Análisis de la correlación de su expresión con la acumulación de saponinas en *A. angustifolia* var. *costero* bajo condiciones de sequía y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos que se pueden derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y El que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

Sihochac, Champotón, Campeche a 13 de febrero de 2019.



Ing. For. Zurisadaí Monroy González

Firma



Dra. Aída Martínez Hernández
Vo.Bo. del Consejero de Tesis

Identificación y caracterización de tres genes de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasas de *Agave*. Análisis de la correlación de su expresión con la acumulación de saponinas en *A. angustifolia* var. *costero* bajo condiciones de sequía

Zurisadai Monroy González, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

Las saponinas son compuestos glucosídicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, donde desempeñan un papel importante en respuesta a factores bióticos y abióticos. Además, se ha demostrado que poseen diversas actividades biológicas con potencial biotecnológico. En el género *Agave* se han identificado diversos tipos de saponinas esteroidales, sin embargo, no se han estudiado los genes involucrados en su biosíntesis. El objetivo de esta investigación fue identificar genes de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa (F26G) de *A. tequilana* y analizar si su expresión correlaciona con la acumulación de saponinas en *A. angustifolia*. Mediante análisis bioinformático, se identificaron en la base de datos AgaveEST-DB tres distintos genes homólogos a F26G, los cuáles poseen un patrón de expresión tisular diferencial: específicos de raíz, anteras o de expresión constitutiva. La presencia del dominio conservado en las glicósido hidrolasas I, los residuos catalíticos y el péptido señal, confirman su identidad. Sin embargo, no se observó correlación entre sus niveles de expresión y el incremento en el contenido de saponinas y actividad hemolítica de saponinas en hojas de *A. angustifolia* bajo condiciones de sequía, lo que sugiere que la regulación de la expresión de F26G no ocurre a nivel transcripcional sino a nivel post-transcripcional o post-traducciona. Por vez primera se reportan genes de enzimas involucradas en la biosíntesis de saponinas en *Agave*, estos resultados servirán como base para estudios posteriores enfocados a comprender la ruta biosintética de las saponinas y su regulación en las plantas, así como la manipulación de estos genes con fines de aprovechamiento biotecnológico.

Palabras Clave: furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa, cDNA, *A. tequilana*, *A. angustifolia*, saponinas.

Identification and characterization of three furostanol glycoside 26-O- β -glucosidases genes from *Agave*. Analysis of the correlation of its expression with the accumulation of saponins in *A. angustifolia* var. coastal under drought conditions

Zurisadai Monroy González, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

Saponins are glycosidic compounds widely distributed in plant kingdom, playing an important role in response to biotic and abiotic factors. It has been shown that they have several biological activities with biotechnological potential. Many steroidal saponins have been identified in the *Agave* genus, however, the genes involved in steroidal saponin biosynthesis have not been studied. The goal of this work was identify genes of furostanol glycoside 26-O- β glucosidase (F26G) in *A. tequilana* and analyze the correlation between its expression and saponins accumulation in *A. angustifolia*. Using bioinformatic approaches, three different homologous genes to F26G were identified in AgaveEST-DB database. Those genes have a differential tissue expression pattern: specific in roots or anthers, or constitutive. The presence of the the glycoside hydrolases I conserved domain, the catalytic residues and the signal peptide, confirm their identity as F26G. However, there is no correlation between their expression levels and the increased saponin content and hemolytic activity of saponins in *A. angustifolia* leaves on drought conditions. This suggest that regulation of F26G expression does not occur at transcriptional level but at the post-transcriptional or post-translational level. For the first time, genes of enzymes involved in the saponin biosynthesis of *Agave* are reported. These results will be the base for further studies focused to understand the saponin biosynthetic pathway and its regulation in plants, but also to manipulate these genes for its biotechnological use.

Keywords: furostanol glycoside 26-O- β -glucosidase, cDNA, *A. tequilana*, *A. angustifolia*, saponins.

DEDICATORIA

A mi hija Isvara Jiménez Monroy, por ser el ángel que vino a iluminar mi vida, por todo su apoyo y comprensión

A mis padres Fidel Monroy Garay y Virginia González Trejo, por apoyarme siempre, por sus consejos y la confianza depositada en mí. Sin su ayuda no estaría aquí.

A mis suegros Ma. Elsa Torres Mendoza y Adalberto Jiménez Delgadillo por su apoyo incondicional y por estar al pendiente de Isvara y de mí, en todo momento.

A mi hermano Ismael Monroy González, por todo el apoyo que me ha brindado, por estar siempre que lo necesito.

A mis hermanos Isai, Ilse y Martha Monroy González, por apoyarme siempre, por su amor.

A todos ustedes Dios los bendiga siempre

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme fortaleza en las situaciones difíciles y por demostrarme su amor infinito.

A los millones de **mexicanos** que, gracias a sus impuestos, a través del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** y al **Colegio de Postgraduados**, se me otorgó la beca No. 453332 para realizar mis estudios de posgrado

A la **Dra. Aída Martínez Hernández** por todo el apoyo, paciencia y comprensión durante la realización del proyecto de investigación. Por el tiempo dedicado en mi formación y desarrollo académico y la confianza depositada en mi.

A la **Dra. Kariana Verdel Aranda**, por los comentarios y valiosas sugerencias realizados durante el desarrollo del proyecto de investigación.

Al **Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez**, por las valiosas sugerencias realizadas a la presente investigación y así como el apoyo otorgado durante mi estancia en el Centro de Investigación Científica de Yucatán.

A **Dr. Joel Lara Reyna** por todo el apoyo incondicional que me ha brindado, el cual fue de vital importancia para concluir con éxito esta etapa, por sus consejos, y todas las consideraciones hacia mi persona.

A mis **amigos y compañeros**: Guadalupe Arena O, Pablo A. Godínez E., Mariana A. Huicab H, Luis Ramos C., por todo su apoyo y comprensión, por escucharme y estar conmigo en los momentos difíciles, por abrirme las puertas de su hogar, por su amistad, y por todo lo que han hecho por mi, estaré eternamente agradecida con todos.

A **Elmi Cen Cen** por todo el apoyo durante el desarrollo de la parte experiemetal del trabajo de tesis, gracias por su amistad y su confianza.

A **Karlina Garcia Sosa** por todo el apoyo otorgado durante mi estancia en el Laboratorio de Química Orgánica del CICY, por sus valiosas aportaciones en el desarrollo experiemetal.

Al **Dr. Fulgencio Alatorre Cobos**, por las sugerencias realizadas al escrito, por su amistad y por ayudarme a resolver mis dudas.

A **Carlos Mejía** y **Elia Abdesa Hernández** por su valiosa ayuda brindada durante mi estancia en el CICY y por su amistad.

A todos los **campañeros de la maestría BIOSAT** por su apoyo y amistad, en especial a Jorge Villegas C, Angel Yañez Z, Luis F. Maceda y Elizabeth Alfaro V.

A todos los **doctores, técnicos, administrativos y personal de campo del CP Campeche** por participar de forma directa o indirecta en mi formación académica, por sus consejos.

A mi esposo, **Jesús Adalberto Jiménez Torres**, por todas las enseñanzas de vida...

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Descripción de los <i>Agaves</i>	3
2.2 Usos e importancia de los <i>Agaves</i>	4
2.3 Las saponinas esteroidales: estructura y biosíntesis	7
2.4 Saponinas de <i>Agave</i>	8
2.5 Saponinas de <i>A. tequilana</i> y <i>A. angustifolia</i>	9
2.7 Furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa (F26G)	11
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	14
3.1 Objetivo general	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
3.3 Hipótesis.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
4.1 Material biológico.....	15
4.2 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	15
4.3 Análisis de contenido de saponinas de <i>A. angustifolia</i>	16
4.3.1 Extracción de saponinas de <i>A. angustifolia</i>	16
4.3.1.1 Evaluación de la actividad hemolítica de las saponinas de <i>A. angustifolia</i>	16
4.3.2 Extracción de sapogeninas de <i>A. angustifolia</i>	17
4.3.2.1 Cromatografía en capa fina	18
4.3.2.2 Cuantificación de sapogeninas mediante cromatografía de gases.....	18
4.4 Identificación y análisis de secuencias codificantes de la enzima furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa de <i>A. tequilana</i> Weber var <i>Azul</i> ..	20

4.4.1	Análisis de las secuencias de <i>A. tequilana</i> similares a furostanol 26-O- β -glucosidasa.....	20
4.4.2	Diseño de oligos específicos para los tres diferentes tipos de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa de <i>A. tequilana</i>	21
4.4.3	Extracción de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	22
4.4.4	Verificación del tamaño del inserto de las clonas control.....	23
4.4.5	Purificación del ADN plasmídico de clonas control	24
4.4.6	Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	24
4.5.	Análisis de expresión de los genes de <i>Agave</i> potencialmente codificantes de la furostanol glicósido 26-O- β glucosidasa.....	26
4.5.1	Manejo de los tejidos durante la colecta	26
4.5.2	Extracción de ARN total y purificación de ARNm	26
4.5.3	Condiciones de reacción para RT-PCR.....	28
5.	RESULTADOS.....	30
5.1.	Identificación de secuencias de <i>A. tequilana</i> potencialmente codificantes para furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa	30
5.2.	Análisis de los transcritos de <i>A. tequilana</i> potencialmente codificantes de furostanol glicósido 26-O- β glucosidasas	32
5.3	Los ESTs de <i>A. tequilana</i> codifican proteínas estructuralmente similares a la furostanol glicósido 26-O- β glucosidasa	39
5.4	Análisis de clonas conteniendo cDNAs de <i>A. tequilana</i> similares a furostanol glicósido 26-O- β glucosidasa	51
5.4.1	Verificación del tamaño de los cDNAs clonados	51
5.5	Confirmación de identidad de las clonas mediante PCR y análisis de especificidad de oligos	54
5.6	Análisis de expresión de los genes de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa en <i>A. tequilana</i>	56
5.7	Expresión de los genes de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa de <i>A. angustifolia</i> y su correlación con la producción de sapogeninas	57
5.7.1	Extracción de saponinas y cuantificación de sapogeninas a partir de tejidos vegetativos de <i>A. angustifolia</i>	58
5.7.2	Separación y cuantificación de sapogeninas de <i>A. angustifolia</i> con cromatografía en capa fina y cromatografía de gases.....	59
5.7.3	Evaluación de la actividad hemolítica de saponinas en <i>A. angustifolia</i>	62

5.8 Análisis de expresión de genes homólogos a furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa en hojas de <i>A. angustifolia</i>	64
6. DISCUSIÓN	67
6.1 Caracterización estructural de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa de <i>A. tequilana</i>	67
6.2 Expresión de furostanol glucósido 26-O- β glucosidasa en tejidos de <i>A. tequilana</i>	71
6.3 Análisis de la correlación entre la cantidad de saponinas y la expresión de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa en <i>A. angustifolia</i> bajo condiciones de sequía.....	72
6.3.1. Cuantificación de sapogeninas en tejidos de <i>A. Angustifolia</i>	72
6.3.2. Actividad hemolítica de saponinas de <i>A. angustifolia</i>	74
6.4 Análisis de expresión de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa en hojas de <i>A. angustifolia</i>	76
7. CONCLUSIONES	78
8. PERSPECTIVAS.....	80
9. LITERATURA CITADA	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo usado para la cuantificación de sapogeninas de <i>A. angustifolia</i> por cromatografía de gases.....	19
Tabla 2. <i>Contigs</i> de la AgaveEST-DB similares a furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa de <i>A. tequilana</i>	22
Tabla 3. Oligos diseñados para amplificar los distintos tipos de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa conforme los <i>contigs</i> identificados en <i>A. tequilana</i>	25
Tabla 4. Secuencias de EST's similares a F26G, identificadas en la base de datos AgaveEST-DB de <i>A. tequilana</i>	31
Tabla 5. Identidad de <i>contigs</i> de <i>A. tequilana</i> identificados por homología mediante BLASTP	46
Tabla 6. Tamaños de productos generados de la digestión con la enzima <i>BsrG I</i> del ADN plasmídico del vector pDONR™221conteniendo los cDNAs de <i>A. tequilana</i> similares a F26G	54
Tabla 7. Peso fresco y seco de tejidos de plantas de <i>A. angustifolia</i> colectadas en época de sequía y de lluvia	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de ESTs que componen cada uno de los <i>contigs</i> seleccionados por su homología a F26G, conforme al tejido a partir del cual fueron clonados y secuenciados	32
Figura 2. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de los <i>contigs</i> de <i>A. tequilana</i> similares a F26G de <i>C. speciosus</i>	34
Figura 3. Identificación de clonas más largas del lado 5' mediante el alineamiento interno de los <i>clusters</i> potencialmente codificantes de F26G	38
Figura 4. Alineamiento de secuencias proteínicas de los <i>contigs</i> de <i>A. tequilana</i> con la F26G de <i>C. speciosus</i> y secuencias de F26G de plantas monocotiledóneas y β -glucosidasas de otras especies	40
Figura 5. Dominios conservados de los <i>contigs</i> de <i>A. tequilana</i> similares familia I glucósido hidrolasa	47
Figura 6. Análisis de las secuencias de proteínas con la herramienta Phobius, mostrando el péptido de señal de cada uno de los <i>contigs</i> de <i>A. tequilana</i>	48
Figura 7. Filograma de F26G y β -glucosidasas	50
Figura 8. Mapa del vector de entrada pDONR™221, donde fueron clonados los cDNAs de <i>A. tequilana</i>	52
Figura 9. Verificación del tamaño del inserto mediante digestión con BsrG I de las clonas control que contienen el gen de F26G	53
Figura 10. Amplificación de las clonas conteniendo los cDNAs de <i>A. tequilana</i> similares a F26G	55
Figura 11. Expresión de genes homólogos a la enzima furostanol glucósido 26-O- β glucosidasa en tejidos de <i>A. tequilana</i> y anteras de <i>A. angustifolia</i>	56
Figura 12. Cromatografía en capa fina de los extractos metanólicos de hojas y piñas de <i>A. angustifolia</i>	60
Figura 13. Perfil cromatográfico de los extractos sapogeninas de <i>A. angustifolia</i> con cromatografía de gases	61
Figura 14. Cuantificación de tigogenina en tejidos de <i>A. angustifolia</i> de plantas colectadas en lluvia y sequía	62

Figura 15. Ensayo de actividad hemolítica de los extractos de <i>A. angustifolia</i> de hojas y piñas colectadas en lluvia y sequia	63
Figura 16. Halo de inhibición generado a las 24-72 horas por extractos de hojas y piñas de <i>A. angustifolia</i> colectadas en lluvia y sequía	64
Figura 17. Análisis de expresión de genes putativamente codificantes de la enzima furostanol glucósido 26-O- β glucosidasa en <i>A. angustifolia</i>	65

1. INTRODUCCIÓN

El término saponina es empleado para definir a un grupo de moléculas de estructuras diversas denominadas químicamente como triterpenos y glucósidos esteroidales que consisten en agliconas no polares unidas covalentemente a una o más unidades de azúcares (hidrofílica). Esta combinación de elementos polares y no polares explica su comportamiento como jabón en soluciones acuosas (Agustín *et al.*, 2011).

La mayoría de las saponinas tienen propiedades farmacológicas, lo que las ha convertido en objeto de estudio para el desarrollo de nuevos medicamentos (Agustín *et al.*, 2011), entre tales actividades se encuentran efectos antiinflamatorios (Tapondjou *et al.*, 2008) anticancerígenos (Man *et al.*, 2010), actividad hemolítica (Baumann *et al.*, 2000), antibacteriales, antifúngicos y antivirales, precursores únicos de medicamentos esteroides como hormonas sexuales, entre otras (Sparg *et al.*, 2004).

Las saponinas ya sean esteroidales o terpenoides, se obtienen a partir de la vía de los isoprenoides. Todos los terpenoides se derivan de la condensación de 3-isopentenil pirofosfato (IPP) y dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Los cuales a su vez se derivan de la condensación de acetyl-Co-A. La reacción de condensación de IPP y DMAPP produce geranyl pirofosfato (GPP) con 10 átomos de carbono, el cual al unirse con otra unidad de IPP, da origen al farnesil pirofosfato (FPP). Dos unidades de FPP dan lugar al escualeno (C₃₀), cuya subsecuente epoxigenación genera 2,3-oxidosqualeno (C₃₀), el cual es un precursor común de saponinas triterpenoides, fitoesteroles y saponinas esteroidales. (Agustín *et al.*, 2011).

Actualmente las investigaciones realizadas en saponinas están enfocadas al descubrimiento de nuevas moléculas de saponinas y a su elucidación estructural. Mientras que los estudios realizados en su ruta de biosíntesis han sido descritos mayormente en saponinas triterpénicas, donde se han estudiado las enzimas involucradas su biosíntesis, tal es el caso del análisis del transcriptoma de

Eleutherococcus senticosus (Rupr. Ex Maxim.) Maxim. donde se estudiaron los genes codificantes de enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de saponinas. Las enzimas involucradas son la oxidoescualeno ciclasa (OSCs), una enzima que participa en la ciclación del 2,3-oxido escualeno, las enzimas citocromo (CYP 450) también involucradas en la ruta biosintética de saponinas, así como la enzima uridin trifosfato glicosiltransferasa (UGTs), la cual cataliza la adición de un azúcar de UTP a una molécula de sapogenina, estas son importantes en la regulación de biosíntesis de saponinas ya que actúan en la última etapa de los metabolitos secundarios y tienen un papel significativo en la estabilidad de los productos y la modificación de la actividad biológica (Hwang *et al.*, 2015; Agustín *et al.*, 2011).

Se considera que las saponinas y las enzimas involucradas en su biosíntesis, se da en respuesta a factores de estrés, como una estrategia para combatir el ataque por agentes patógenos, pero también son producidas de forma independiente a las señales externas del medio ambiente (Faizal y Geelen, 2013).

Las plantas del género *Agave* son una buena fuente de saponinas esteroidales, estas han sido extraídas de hojas *A. cocui* Trel. (Blunden *et al.*, 1980b), fermentos de hojas de *A. americana* L. (Jin y Yang, 2003), jugo de hojas en *A. intermixta* (Quilez *et al.*, 2004), cultivo de callos en *A. amanuensis* (Indrayanto, *et al.*, 1994) y flores en *A. offoyana* Jacobi (Pérez *et al.*, 2013). Diversos estudios han sido realizados en el aislamiento e identificación de saponinas en el género *Agave*, entre las principales se encuentran la hecogenina, diosgenina entre otras.

Debido a sus propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas, las saponinas son de gran interés en la industria alimenticia, agroquímica, cosmética y farmacéutica.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Descripción de los Agaves

Los agaves son plantas de gran relevancia económica, biológica y cultural para México. Forman parte de la familia Asparagaceae subfamilia Agavoideae (The Angiosperm Phylogeny Group, 2009) y conforman un amplio género constituido por 210 especies que se distribuyen desde el sur de los Estados Unidos de América hasta Ecuador, aunque varias especies han sido introducidas en diversos países alrededor del mundo.

Se considera que el centro de diversidad de los agaves es México, donde se han reportado 159 especies, 119 de las cuales son endémicas (García-Mendoza, 2011; García-Mendoza y Galván, 1995; García-Mendoza, 2002).

Este género cuyo nombre asignado por Carlos Linneo en 1753 significa *noble* o *admirable*, posee características biológicas ciertamente notables y admirables. Conforme lo recopilado por García-Mendoza *et al.*, 2017, los agaves son plantas perennes, monocotiledóneas con hojas suculentas y fibrosas, con la base dilatada y carnosa, margen y punta con espinas. Las hojas conforman una roseta distribuidas en espiral sobre el tallo o “piña”. Su roseta es de tamaño muy variable entre las diversas especies, alcanzando un diámetro hasta de 5 m en las especies más grandes. Con ciclo de vida largo, emiten una sola floración antes de su senescencia, entre 8-30 años dependiendo de la especie, lo que mereció otorgarles el nombre de “century plant”. La inflorescencia es espigada (subgénero *Littaea*) o racemosa o paniculada (subgénero *Agave*). Las flores son bisexuales, con seis tépalos, seis estambres y producen néctar. El fruto es una cápsula seca, trilocular, con semillas dispuestas en dos hileras por lóculo, negras, aplanadas y rodeadas por un ala corta en su parte distal. La reproducción es sexual o asexual mediante la generación de hijuelos a partir de los rizomas, interfoliares o en las inflorescencias (bulbillos).

Las diferentes especies de agaves se distribuyen en una gran diversidad de ambientes desde el nivel del mar hasta los 3,000 m de altitud, incluyendo planicies, laderas o picos montañosos, acantilados, dunas costeras; encontrándoseles en casi todos los tipos de vegetación de México, los agaves son especialmente abundantes en el bosque tropical caducifolio, bosque de *Pinus-Quercus* y matorral xerófilo (García-Mendoza, 2002).

Como plantas xerófitas adaptadas a crecer bajo condiciones áridas y semiáridas, los agaves presentan adaptaciones morfológicas y bioquímicas. Entre ellas: hojas suculentas, raíces superficiales, cutículas cerosas gruesas y metabolismo tipo CAM (de *Crassulacean Acid Metabolism* o Metabolismo Ácido de las Crasuláceas) (Matiz *et al.*, 2013; Nobel., 2003; Nobel, 1994; Nobel, 1988; Nobel, 1985; Nobel, 1976). La organización de las hojas en forma de roseta en los agaves, permite captar mayor radiación para el proceso de fotosíntesis y canalizar el agua hacia las raíces superficiales, las cuales en épocas de sequía pueden disminuir de tamaño y así evitar la pérdida de agua mediante este sistema (Nobel 1994; Nobel y Sanderson 1984). Estas adaptaciones les permiten tolerar ambientes con temperaturas altas, sequía, y suelos poco profundos y pobres en nutrientes, como en las zonas costeras. Un recuento de los cambios fisiológicos que ocurren en plantas de agave bajo condiciones de sequía puede leerse en García-Mendoza *et al* (2017).

2.2 Usos e importancia de los Agaves

Varias especies de *Agave* o maguey son aprovechadas como materia prima en procesos agroindustriales (revisado por Narváez y Sánchez, 2009). Por ejemplo, *A. tequilana* F. A. C. Weber var. *azul*, especie y variedad a partir de la cual se produce el tequila, un producto de exportación con denominación de origen de gran importancia económica para México (Dalton, 2005; Cedeño, 1995).

Otras especies de *Agave* utilizadas para producir fermentos y destilados son *A. salmiana* Otto ex Salm Dyck y *A. atrovirens* Karw ex Salm Dyck se utilizan para producción de pulque, bebida fermentada tradicional a la que se le adjudica alto

valor nutritivo. Conforme la NOM-070-SCFI-2016, las especies para la producción de mezcal son *A. angustifolia* Haw., *A. asperrima* Jacobi, *A. weberi* F. Cels ex J. Poiss, *A. potatorum* Zucc. y *A. salmiana*. Sin embargo, García-Mendoza (2010), reporta que hasta 28 diferentes especies de *Agave* se utilizan para hacer mezcal. La bacanora, que también cuenta con denominación de origen, se produce a partir de *A. angustifolia* (Gutiérrez *et al.*, 2007).

Los agaves también han sido ampliamente utilizados para la obtención de fibras naturales. El henequén (*A. fourcroydes* Lem.), denominado el “oro verde”, tuvo una gran relevancia económica en la Península de Yucatán. De acuerdo con la FAO, *A. sisalana* Perrine ex Engelm, sigue siendo aprovechada actualmente para la extracción de fibra en países como Brasil, Kenia y Tanzania (<http://www.fao.org/economic/futurefibres/fibres/sisal/es/>).

Más allá de sus usos agroindustriales, este género ha sido aprovechado desde épocas prehispánicas en múltiples usos tradicionales, entre los que se incluyen: producción de agua miel, extracción de fibras para utensilios y vestido, consumo de sus partes para alimentación, construcción, como ornamento, combustible, sustituto de jabón (Colunga-García Marín and May-Pat, 1993; Gentry, 1982) y también diversos usos medicinales (Estrada-Castillón *et al.*, 2014; Davidson y Ortiz, 1983).

García-Mendoza *et al.*, (2017) destacan que prácticamente todas las estructuras morfológicas de estas plantas son aprovechadas: botones florales, bases de las hojas y qurote cocidos como alimento; hojas, tallo, qurote como combustible; quotes, hojas como material de construcción; plantas completas como cerco vivo; hojas y savia en medicina; hojas para la obtención de fibras; espinas como agujas; raíces como sustituto de jabón;, fermentos y piñas cocidas para producción de aguamiel, pulque, mezcal y tequila; y otros.

Los agaves y sus productos fueron de tal importancia para las culturas mesoamericanas, que incluso los asociaban a la deidad Mayahuel. Dichos usos fueron originalmente documentados por relatores españoles, y algunos están plasmados en los códices y murales precolombinos (Hernández, 1942; Goncalves,

1956; Sahagún, 2001). Para los grupos nómadas árido-americanos, los agaves significaron fuente de agua y alimentos nutritivos fundamentales para su supervivencia (Gentry, 1982; Parsons y Darling, 2000). Su consumo como alimento humano parece datar de hace más de 9000 años (Callen, 1965).

Recientemente se ha despertado mucho interés en los agaves por su potencial para la producción de bioenergía en zonas áridas (Cushman *et al.*, 2015; Stewart, 2015; Escamilla-Treviño, 2012; Davis *et al.*, 2011).

Respecto a los usos medicinales tradicionales de los agaves y el potencial farmacológico y nutracéutico de los compuestos bioactivos aislados a partir de sus extractos, revisiones recientes abordan este tema correlacionándolo con la oportunidad de aprovechar los desechos de la industria tequilera y mezcalera como materia prima para la extracción de metabolitos secundarios de interés industrial.

Santos-Zea *et al.*, (2012) enumera que diversas especies y sus productos se utilizan para prevenir la constipación, cicatrizante, como agentes diuréticos, antibacteriano, reducir la resistencia a la insulina, disminuir la presión sanguínea, tratamiento de enfermedades del hígado y corazón, ictericia, tuberculosis y sífilis.

Estudios farmacológicos utilizando extractos crudos acuosos u orgánicos de diversas especies de *Agave* muestran potencial anticancerígeno, efecto antibacteriano, antifúngico, antiinflamatorio, antioxidante, antihipertensivo, inmunomodulador o antiparasítico (revisado en Santos-Zea *et al.*, 2012). Los extractos de agave también han mostrado potencial de uso en la agroindustria por sus efectos como molusquicida, larvicida y fitotóxico (revisado en Sidana *et al.*, 2016) e insecticida (Herbert-Doctor *et al.*, 2016).

Las actividades biológicas y farmacológicas de los extractos de agaves se deben a su metabolismo secundario, a través del cual sintetizan compuestos bioactivos como saponinas, flavonoides, homoisoflavonoides, terpenos, glicósidos, esteroides, taninos, fenoles, cumarinas (revisado por López-Romero *et al.*, 2018; Sidana *et al.*,

2016; Santos-Zea *et al.*, 2012). Estos metabolitos poseen propiedades como antibióticos (Davidson y Ortiz de Montellano, 1983); dermoirritantes (Salinas *et al.*, 2001; Genillier-Foin y Avenel-Audran, 2007); actividad inmunosupresora (Chen *et al.*, 2009). Sin embargo, la mayor parte de la bioactividad de los productos de *Agave* han sido atribuidos a las saponinas (Santos-Zea *et al.*, 2012).

2.3 Las saponinas esteroidales: estructura y biosíntesis

Las saponinas son metabolitos secundarios cuyo nombre deriva del latín *sapo* que significa *jabón*, adjudicado por sus propiedades surfactantes y capacidad para producir espuma. Estos compuestos son sintetizados en muchas especies de plantas principalmente para defenderse contra ataques de patógenos y plagas (Sahu *et al.*, 2008; Wink, 1999).

Saponinas aisladas de diversas fuentes han mostrado actividades biológicas como anticancerígenos, adyuvantes, inmunoestimulantes, antiinflamatorios, anticoagulantes, antimicrobianos, hepatoprotectores, hipocolesterolémicos y antioxidantes; por lo que son de gran interés para el descubrimiento de nuevos fármacos (Sidana *et al.*, 2016; Rao y Gurfinkel, 2000; Balandrin, 1996).

Las saponinas de plantas presentan una gran diversidad estructural. Están constituidas en su estructura general por una parte glicosilada polar unida a una parte no polar o aglicona tipo triterpénica (C30) o esteroidea (C27). Se clasifican según su estructura en glicósidos de triterpenos (saponinas triterpénicas) o glicósidos de esteroides (saponinas esteroidales), dependiendo de la naturaleza de su aglicona (sapogenina) (Vincken *et al.*, 2007). La presencia de un grupo polar y uno no polar confieren a las saponinas su propiedad como tensoactivos, responsable de muchos de sus efectos biológicos (Makkar *et al.*, 2007).

La parte glicosídica de las sapogeninas esteroidales son oligosacáridos lineares o ramificados (glucosa, galactosa, ácido glucurónico, xilosa, rhamnosa o methylpentosa) unidos al grupo hidroxilo del C3 de la aglicona a través de un enlace tipo acetilo. Las agliconas de las saponinas esteroidales se subdividen en

tipo furostanol o espirostanol dependiendo del tipo de estructura unida al C26 de la aglicona: una tipo furostanol (con una glucosa unida) o un ciclo tipo espirostanol (Sahu *et al.*, 2008). Los furostanol glucósidos son precursores de los espirostanol glucósidos.

Las saponinas son sintetizadas en el cloroplasto vía la ruta de biosíntesis del escualeno-cicloartenol-sitosterol. De acuerdo con lo revisado por Sahu *et al.*, (2008), el escualeno es previamente sintetizado a partir del isopentil-pirofosfato (IPP) generado a través de la vía del mevalonato. La enzima escualeno monooxigenasa oxidada (OSC) al escualeno produciendo 2,3-oxidoescualeno, el precursor de las saponinas esteroidales vía cicloartenol y colesterol. La oxidación del colesterol en el C16, C22 y C26/27, así como la subsecuente ciclación de colesterol oxigenado conduce a la formación del anillo tipo espirocetal. El grupo hidroxilo del C26/27 es glucosilado para formar el anillo espirocetal, formando así al furostanol 26-b-D-glucósido (aglicona) el cuál entonces es glicosilado por la enzima UDP-Glucosiltransferasa (UDP-Glc) en el hidroxilo del C3, formando la saponina glicosilada tipo furostano. La unidad de glucosa unida al hidroxilo del C26 del furostanol glucósido es entonces escindida por una enzima tipo β -glucosidasa para formar el anillo espirocetálico de los glicósidos esteroidales tipo espirostanol: la furostanol glicósido 26-O β glucosidasa (F26G).

2.4 Saponinas de *Agave*

La producción de saponinas en el género *Agave* es un hecho bien documentado. Las primeras saponinas aisladas a partir de este género se describieron décadas atrás (Jones *et al.*, 1932). A partir de entonces más de 50 especies de *Agave* han sido estudiadas en cuanto a su producción de saponinas. Una amplia revisión realizada por Sidana *et al.*, (2016) enumera las diversas saponinas (141) aisladas a partir de planta completa, hojas, savia, rizomas, flores e incluso callos de cultivo *in vitro* de diferentes especies de *Agave*, describiendo sus estructuras químicas, fuente de aislamiento y bioactividad.

Las saponinas de *Agave* son saponinas esteroidales tipo espirostanol y furostanol. De acuerdo con Santos-Zea *et al.*, (2012), su aglicona puede ser de tipo tigenina, esmilagenina, gitogenina, clorogenina, hecogenina o sarsapogenina, neotigenina.

Se han descrito saponinas de *Agave* con propiedades antiinflamatorias, antiulcerogénicas, antiparasitarias, hemolíticas, molusquicidas y larvicidas (Peana *et al.*, 1997; Pizarro *et al.*, 1999; Abdel- Kader *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2006; Guerra *et al.*, 2008; Monterrosas-Brisson *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2017) y saponinas citotóxicas, inductoras de apoptosis, con potencial anticancerígeno (Bianchi y Cole, 1969; Ohtsuki *et al.*, 2004; Yokosuka *et al.*, 2009; Santos-Zea *et al.*, 2016). Revisiones al respecto han sido realizadas por López-Romero *et al.*, 2018; Sidana *et al.*, 2016; Santos-Zea *et al.*, 2016; Simmons-Boyce y Tinto, 2007.

2.5 Saponinas de *A. tequilana* y *A. angustifolia*

A pesar de la importancia agroindustrial y económica de *A. tequilana*, y de la necesidad de encontrar usos alternativos a los productos de desecho de la industria tequilera (hojas), hay muy pocos estudios caracterizando las actividades biológicas y aislando e identificando metabolitos bioactivos en esta especie. Los únicos reportes indican que sus extractos poseen actividad antioxidante, antibacteriana (Ahumada-Santos *et al.*, 2013), antiinflamatoria (Monterrosas-Brisson *et al.*, 2013) e insecticida y nematocida (Herbert-Doctor *et al.*, 2106).

Hasta donde llega nuestro conocimiento, no hay ninguna saponina o sapogenina aislada e identificada a partir de *A. tequilana*. El único metabolito secundario aislado son homoisoflavonas reportadas por Morales-Serna *et al.*, 2010.

A. angustifolia es la especie de *Agave* con distribución geográfica más amplia. Conforme lo reportado por Trejo *et al.*, (2018) y por Colunga y May-Pat (1997), *A. angustifolia* es el ancestro de *A. tequilana*. Esta especie crece en diversas partes del país crece como variedades o ecotipos distintos, mostrando características

morfológicas diferentes. Algunas de estas variedades son utilizadas para la fabricación de mezcal, bacanora y otras bebidas.

En las costas de la Península de Yucatán crece un ecotipo de *A. angustifolia* denominado var. *costero*, el cual se diferencia morfológica y isoenzimáticamente de la variedad de *A. angustifolia* que se desarrolla en la región selvática de la Península. (Cervera *et al.*, 2018; Colunga y May-Pat, 1997; Colunga *et al.*, 1999).

A. angustifolia se utiliza en la medicina tradicional para el tratamiento de inflamaciones. A diferencia de lo mencionado para *A. tequilana*, en *A. angustifolia* existen diversos trabajos caracterizando las actividades biológicas de sus extractos y de sus saponinas. Monterrosas-Brisson *et al.*, (2013) encontraron actividad antiinflamatoria en sus extractos acetónicos.

También los constituyentes químicos de sus extractos activos han sido investigados. Abdel *et al.*, (2010), reportan el aislamiento de dos saponinas tipo espirostano presente en extractos metanólicos que producen notorios efectos antiinflamatorio, analgésico, esquistosomicida, cercaricida y miracidicidal. Mina *et al.*, 2013, reportaron el aislamiento de otras dos saponinas tipo espirostano (glicósidos de hecogenina) a partir de hojas de *A. angustifolia*. Ambas saponinas habían sido previamente aisladas de *A. macroacantha* Tod. Abdel *et al.*, (2015), reportan el aislamiento de tres compuestos a partir de *A. angustifolia*. Entre ellos, la tigogenin-3-O-b-D-glucopiranosil (1J3)-b-D-xilopiranosido mostró una actividad molusquicida moderada contra *Biomphalaria alexandrina*.

La tigogenina es una saponina esteroidal tipo espirostano. Recientemente, Pereira *et al.*, (2017), reportaron el aislamiento de una nueva saponina esteroidal tipo furostano a partir de hojas de *A. angustifolia* var. *marginata* Trel. Este compuesto mostró actividad moderada tanto antiulcerogénica como hemolítica. Al comparar su efecto contra el de una saponina tipo espirostano aislada de *A. brittoniana* Trel, se encontró que la segunda posee mayor actividad protectora contra las úlceras, así como una mayor actividad hemolítica.

2.7 Furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa (F26G)

Como fue establecido arriba, la furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa (F26G) es la enzima que cataliza la conversión del glicósido tipo furostanol al tipo espirostanol. Esta enzima escinde la unidad de glucosa unida al hidroxilo del C26 del furostanol glicósido y entonces mediante una ciclación espontánea, se forma el anillo heterocíclico espirocetálico de los glicósidos esteroidales tipo espirostanol. Aunque Sahu *et al.*, (2008) reportan que β -glucosidasas aisladas de plantas son capaces de realizar esta transformación *in vitro*, hasta donde llega nuestro conocimiento, la única furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa que ha sido purificada a homogeneidad y se ha demostrado su actividad enzimática tanto de la enzima nativa (Inoue y Ebizuka, 1996a y 1996b) como de la enzima recombinante producida a partir del cDNA clonado (Inoue *et al.*, 1996), es la furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa aislada a partir de rizomas de *Chelicostus speciosus* J. Koenig Sm. (Q42707.1 UniProtKB/Swiss-Prot). *C. speciosus* es una Zingiberaceae del sudeste de Asia que produce altas cantidades de diosgenina en su rizoma y semillas (Inoue y Ebizuka, 1996b). La diosgenina es una sapogenina esteroide tipo espirostanol.

La F26G de *C. speciosus* está constituida por 562 aminoácidos, es una proteína dimerica con un peso molecular aparente en su forma nativa de 110,000 Da y las subunidades son de 54 y 58 KDa. La secuencia del extremo N-terminal presenta alta similitud con las secuencias N-terminal de las beta-glucosidasas de plantas (Inoue y Ebizuka, 1996a). La F26G de *C. speciosus* produce *in vitro* protogracilina (espirostanol glicósido) a partir de protodioscina (furostanol glicósido), mostrando actividad de beta-glucosidasa específica para romper el enlace glucosídico del C26 de furostanol glicósidos (Inoue *et al.*, 1996).

Adicionalmente a la secuencia del gen codificante para la enzima F26G de *C. speciosus*, en la base de datos de nucleótidos del *National Center for Biotechnology Information* (ncbi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se encuentran reportadas otras secuencias para este gen halladas en otras plantas, pero, para ninguno de esos casos existen reportes confirmando su actividad enzimática.

A pesar de los numerosos estudios reportando la presencia de saponinas esteroidales en plantas, y de que sus estructuras químicas han sido dilucidadas y se han demostrado sus actividades biológicas y farmacológicas, la ruta de biosíntesis propuesta no ha sido demostrada.

Con excepción de la F26G de *C. speciosus* y *Dioscorea esculenta* (Inoue *et al.*, 1996, Nakayasu *et al.*, 2015), otras F26G no han sido caracterizadas y el resto de las enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis no han sido aisladas, sus genes no han sido clonados y su regulación por factores intrínsecos o medioambientales para controlar la producción de saponinas, no ha sido estudiada.

En este trabajo, se reportan las secuencias de cDNAs, análisis estructural de las proteínas codificadas y el patrón de expresión tisular de tres tipos de genes de *A. tequilana* potencialmente codificantes para furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasas identificadas en los ESTs (Expressed Sequence Tags) de la base de datos AgaveEST-DB del Colegio de Postgraduados. Los ESTs fueron secuenciados por Sanger (Simpson *et al.*, 2011) a partir de bibliotecas de cDNAs expresados en raíz, anteras, hojas, piña y ovarios construidas conforme lo publicado por Martínez-Hernández *et al.*, (2010). La AgaveEST-DB fue construida con información generada a partir del análisis bioinformático de los ESTs, incluyendo *contigs* o secuencias consenso reconstruidas a partir de los *clusters* o grupos de ESTs similares, así como de los resultados de BLASTX contra la base de datos nr (non-redundant) de The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El patrón de expresión de los genes identificados fue evaluado en tejidos de *A. tequilana*.

Así mismo, se analizó la expresión de estos genes en respuesta a sequía para evaluar la correlación de sus niveles de expresión con la cantidad de saponinas y actividad hemolítica de saponinas esteroidales en diversos tejidos (hoja, piña y raíz) de plantas de *A. angustifolia* colectadas en época de lluvia contra plantas colectadas en época de sequía.

Con base a la relación evolutiva entre *A. angustifolia* y *A. tequilana*, así como la presencia de saponinas esteroidales tipo espirostano en *A. angustifolia*,

consideramos que esta especie es un buen modelo para evaluar la expresión de los genes de F26G identificados en *A. tequilana*.

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 Objetivo general

Identificar y caracterizar los genes de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasas de *Agave*. y analizar la correlación de su expresión con la acumulación saponinas en *Agave angustifolia* var. *costero*.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar los posibles genes de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasas en *Agave tequilana* y sus proteínas codificadas
- Determinar la expresión tisular de los genes de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasas *Agave tequilana*.
- Determinar en qué órganos de *Agave angustifolia* se acumula la mayor cantidad de saponinas y sapogeninas.
- Determinar si la cantidad de saponinas en tejidos de *Agave angustifolia* esta correlacionada con los niveles de expresión genes codificantes para furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasas.

3.3 Hipótesis

Las secuencias (cDNAs) halladas en el transcriptoma de *A. tequilana* similares a la F26G de *Chelicostus speciosus* codifican b-glucosidasas que participan en la ruta de biosíntesis de saponinas en el género *Agave* y su expresión correlaciona con la acumulación de las saponinas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

Se colectaron hojas, piñas y raíces de plantas adultas silvestres de *A. angustifolia*, distribuidas en la costa del Estado de Campeche (19°06' 22.7" N 91°00' 56.5" W), en dos épocas del año. Una colecta se realizó en el periodo de sequía, en el mes de mayo del 2017. La segunda colecta se realizó en el mes de septiembre del 2017 en época de lluvia. Se colectaron 5 plantas, 2 en sequía y 3 en periodo de lluvia.

También se colectaron en el mes de abril, durante la época de sequía, plantas de *Agave tequilana* provenientes de Tequila, Jalisco, establecidas en el Colegio de Postgraduados Campus Campeche (19° 29' 50.3" N 90° 32' 38.2" W).

El ARN de anteras de *A. angustifolia* utilizado fue extraído en el laboratorio de Biología Molecular y Genómica Funcional del CP Campeche a partir de anteras colectadas en la estación de la UNAM en Sisal, Yucatán (21° 09' 47.3" N 92° 02' 42.8" W) en época de floración (noviembre 2018).

4.2 Cepas de *Escherichia coli*

Cepas de *Escherichia coli* conteniendo cDNAs (DNA complementario) clonados a partir de *A. tequilana*, similares a furostanol 26-O- β -glucosidasa (F26G) de *Cheilocostus speciosus* (Tabla 2), fueron cultivadas a partir del banco de cDNAs de la Dra. Aída Martínez resguardado a -80°C en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica Funcional del Campus Campeche del Colegio de Postgraduados.

4.3 Análisis de contenido de saponinas de *A. angustifolia*

4.3.1 Extracción de saponinas de *A. angustifolia*

La extracción y cuantificación de saponinas se realizó en el laboratorio de Química Orgánica de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

Para la extracción de saponinas se utilizó toda la raíz y la piña de las plantas colectadas y 10 hojas de la roseta (forma en la que crecen las hojas alrededor del tallo) de cada planta, las cuales se cortaron en pequeños pedazos de aproximadamente 10 cm. Para el secado de las muestras, se colocaron en estufa de aire forzado (SHEL LAB Mod. FX28-2), a 50 °C hasta peso constante; una vez secos los tejidos, se molieron en una licuadora industrial hasta obtener una consistencia de polvo. Treinta gramos del material vegetal seco (hojas, piñas y raíz), se desengrasó usando 200 mL de hexano en un extractor Soxhlet. Una vez desengrasada la muestra, se realizó una extracción con 200 mL de metanol durante 6 horas, para obtener las saponinas, después el extracto metanólico fue concentrado en un evaporador rotatorio (Büchi), posteriormente se guardaron a -20 °C durante dos días, después en un ultra congelador a -80 °C por cuatro días y finalmente se liofilizaron a 200 mbar y -41 °C, para eliminar los restos de agua del extracto.

4.3.1.1 Evaluación de la actividad hemolítica de las saponinas de *A. angustifolia*

Para determinar la presencia de saponinas en los extractos de *Agave* se realizó un ensayo de actividad hemolítica. Se preparó una solución al 5 %, con los extractos metanólicos de cada tejido, usando como control positivo la saponina sakurososaponina al 0.25 % y como control negativo metanol.

Se usaron placas de agar sangre (BAS c/5 % SC), a las cuales se le hicieron pequeños pozos con ayuda de la boquilla de una pipeta Pasteur. Una vez disueltos los extractos en metanol, se depositaron 25 μ L por pozo de cada una de las concentraciones de los extractos, 25 μ L del control positivo y 25 μ L control negativo. La actividad hemolítica se evaluó a las 24, 48 y 72 horas.

Para la toma de datos se tomaron fotografías de las placas a los tiempos establecidos, usando una regla (mm) como referencia, las imágenes fueron procesadas con el programa Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

4.3.2. Extracción de sapogeninas de *A. angustifolia*

Para la obtención de sapogeninas por hidrólisis ácida de las saponinas correspondientes, se extrajeron 30 g del material vegetal (hojas, piñas y raíz) con 200 mL de metanol y ácido clorhídrico 2 N (95:5), en un aparato Soxhlet durante 6 horas. El extracto metanólico fue concentrado al vacío en un evaporador rotatorio (Büchi) hasta la mitad del volumen inicial diluido con agua y extraído con acetato de etilo (2:1) en embudo de separación. La mezcla se agitó vigorosamente y posteriormente se dejó reposar hasta observar la formación de dos fases, la fase acuosa (parte inferior) que contiene los azúcares hidrolizados, y la fase orgánica (parte superior) conteniendo las sapogeninas.

Se descartó la fase acuosa y la fase del acetato de etilo se concentró al vacío en rotavapor, después se agregó bicarbonato de sodio 5% (1:1) para neutralizar el pH, se procedió a separar la fracción de acetato de etilo del bicarbonato de sodio en un embudo de separación, y la fracción de acetato de etilo se combinó con el mismo volumen (1:1) de una solución saturada de NaCl, para eliminar el resto de agua de la fracción del acetato de etilo, y se separó en embudo de decantación.

Después en el fondo de un embudo se colocó un pedazo de algodón y se sobre éste una capa de sulfato de sodio anhidro de aproximadamente 3.5 cm, a través del cual se filtró la fracción de acetato de etilo, finalmente el acetato de etilo se eliminó en un rotavapor.

4.3.2.1 Cromatografía en capa fina

Para determinar de manera cualitativa la presencia de sapogeninas en los extractos de *A. angustifolia* se realizó una cromatografía en capa fina (TLC). Para esto se cortó cada placa de TLC (TLC SILICA GEL 60 F254, MERCK) horizontalmente en secciones de 5 cm de alto (el ancho dependió del número de muestras a manejar). Se midieron 0.5 cm tanto en la parte superior e inferior de la placa y con un lápiz se dibujó una línea (línea de origen en parte inferior) a través de la placa en la marca de 0.5 cm, y sobre ella se marcaron las distancias (0.4 cm) donde debían colocarse las muestras y su respectivo nombre debajo de la línea.

Posteriormente 1 mg de cada extracto y se disolvió en 100 μ l de metanol, y con un capilar se tomó parte del extracto y se hicieron 3 aplicaciones sobre la línea base la placa de TLC. Después se agregó el solvente a la cámara, el cual consistió en una mezcla de hexano-acetato de etilo (80:20). La placa de TLC se colocó se dentro de la cámara y se cubrió con una placa de vidrio y se dejó correr hasta que el solvente llegó por debajo de línea de la parte superior de la placa (0.5 cm), inmediatamente después se retiró la placa de TLC de la cámara y se dejó secar. Finalmente, se sumergió en una solución reveladora de ácido fosfomolibdico, y se aplicó calor para secarla y así poder visualizar las muestras. Se usó la stigogenina y β -sitosterol como referencia de la presencia de estos en los extractos, ya que han sido los compuestos que se han reportado en *A. angustifolia*.

4.3.2.2 Cuantificación de sapogeninas mediante cromatografía de gases

Los extractos metanólicos hidrolizados fueron usados para la cuantificación de sapogeninas por cromatografía de gases, usando un cromatógrafo de gases FID (Agilent 7890A).

Los compuestos se separaron en una columna capilar HP-5MS Agilent (30 m x 320 μm x 0.25 μm). El detector de ionización de llama (FID) fue operado a 250 °C, el flujo del gas acarreador (H_2) fue de 30 mL/min, la temperatura del inyector fue de 250 °C y con una temperatura inicial del horno a 200 °C.

El método usado para la cuantificación fue el reportado por Taylor *et al.*, (2000), con algunas modificaciones, el cual consiste en 2 minutos a una temperatura inicial del horno de 200 °C, después de un minuto la temperatura se elevó 5 °C por minuto hasta llegar a 270 °C, finalmente aumenta 1 °C por minuto hasta llegar a 290 °C. (Tabla 1).

Tabla 1 Protocolo usado para la cuantificación de sapogeninas de *A. angustifolia* por cromatografía de gases.

	Rate °C/min	Value °C	Hold time min	run time min
Initial		200	2	2
Ramp 1	5	270	1	17
Ramp 2	1	290	10	47

Con base a lo publicado por Abdel-Gawad *et al.*, (2015), para la elaboración de la curva estándar, se usó una mezcla de tigogenina/ β -sitosterol (10mg/1mL) disueltos en metanol/diclorometano (1:1), en 5 concentraciones, 1 %, 0.5 %, 0.25 %, 0.12 % y 0.065 %, usando como estándar interno hecogenina (10 mg/1 mL). De la mezcla de tigogenina/ β -sitosterol se tomaron 100 μL y se mezclaron con 25 μL del estándar interno, una vez homogenizada la muestra se inyectó 1 μL por cada concentración en el cromatógrafo de gases, las inyecciones se hicieron por triplicado.

Posteriormente se procedió a cuantificar cada uno de los extractos de los tejidos de *A. angustifolia*, para lo cual se usaron 10 mg/mL de cada extracto disueltos en metanol/diclorometano (1:1), se tomaron 100 μL del extracto y se mezclaron con

25 μ L hecogenina (estándar interno) y se inyectó 1 μ L de la mezcla en el cromatógrafo de gases.

4.4 Identificación y análisis de secuencias codificantes de la enzima furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa de *A. tequilana* Weber var *Azul*

Las secuencias de los ESTs (Expressed sequence Tags) putativamente codificantes de la enzima furostanol glucósido 26-O- β glucosidasa, se obtuvieron de la base de datos **AgaveEST-DB** de EST's de *Agave tequilana* Weber var. *Azul* del Colegio de Postgraduados, la cual contiene más de 35,000 secuencias generadas a partir de diferentes tejidos, agrupadas en "*clusters*". Las búsquedas se hicieron analizando la identidad de los mejores "hits" identificados por análisis de BLAST tanto de los ESTs como de los *contigs* de las secuencias agrupadas por similitud.

4.4.1 Análisis de las secuencias de *A. tequilana* similares a furostanol 26-O- β -glucosidasa

Se hicieron alineamientos internos de cada una de las secuencias que conforman cada *cluster* y la secuencia consenso (contig) de cada grupo de genes. Se verificó que la secuencia consenso fuera correcta. En caso de no serlo se corrigió la secuencia de nucleótidos, generando secuencias corregidas que serán depositadas en el Genebank de NCBI. Se identificó dentro de cada *cluster* la clona más larga del lado 5', la cual contiene la versión más completa entre los cDNAs clonados dentro de cada *cluster*. Dichas clonas se usaron como control positivo en las reacciones de PCR (Tabla 2).

Posteriormente se realizó la traducción de la secuencia de los *contigs* de nucleótidos a proteínas de los *contigs* corregidos. La traducción se realizó con EXPASy Translate tool (<https://web.expasy.org/translate/>).

Para identificar secuencias homólogas a los genes de *A. tequilana*, se hizo un BLASTn y BLASTp con la secuencia de los *contigs* contra la base de datos nr (no redundant) en The National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias con mayor homología a cada contig, identificadas como furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa fueron seleccionadas para posteriores análisis comparativos.

Para analizar las similitudes y divergencias entre las secuencias de los *contigs* de *A. tequilana* con la secuencia de *C. speciosus* y visualizar las zonas conservadas y variables entre los contigs, se realizaron alineamientos de los *contigs* a nivel nucleótido y aminoácido de *A. tequilana*, usando como referencia la secuencia de la enzima furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa de *Cheilocostus speciosus*, y otras secuencias homólogas identificadas como posibles furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa usando el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Los alineamientos fueron visualizados en el programa BioEdit.

Los alineamientos fueron utilizados para generar un filograma con el fin de visualizar los agrupamientos de las secuencias analizadas con base en su homología.

4.4.2 Diseño de oligos específicos para los tres diferentes tipos de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa de *A. tequilana*

Con base en los resultados obtenidos en los alineamientos de proteínas y nucleótidos se diseñaron oligonucleótidos dirigiéndolos a la zona diferencial observada entre los tres grupos de *contigs* de *A. tequilana* encontrados en el extremo 5' (5 prima). Para el diseño de oligos, se seleccionó como contig blanco el contig conformado con mayor número de ESTs (Tabla 2) de cada uno de los tres grupos de diferentes genes identificados con la herramienta de Primer design tool de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Los parámetros considerados para el diseño de los oligos fueron el porcentaje de CG (mayor al 50 %), el porcentaje de auto complementariedad para evitar la formación de dímeros,

así como el tamaño del producto amplificado (entre 100-200 pb para cuantificación por tiempo real) y temperaturas de fusión de 58 a 65 °C. Los oligos fueron sintetizados por Invitrogen. Las secuencias de los oligos se muestran en la tabla 3.

Tabla 2. *Contigs* de la AgaveEST-DB similares a furostanol glicósido 26-O-β-glucosidasa de *A. tequilana*.

Grupo	Contig	Clona
I	aC2842_2*	flant008_b07 ⁺
II	aC2256_4*	raraz002_g10 ⁺
	aC2147_3	raraz005_d09
III	aC2988_12*	flant015_e11 ⁺
	aC2778_14	flant013_a03
	aC3048_5	flant019_e10

Los nombres de los contig incluyen después del guion bajo el número de secuencias contenidas dentro del *cluster* que le da origen. Los “grupos” se refieren a los posibles genes similares a F26G. Las clonas son Cepas de *Escherichia coli* conteniendo cDNAs representativo de cada contig. *Contig usados para el diseño de oligos. Clonas más largas del lado 5’ de cada contig. +Clonas seleccionadas como control positivo para las reacciones de PCR.

4.4.3 Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* conteniendo plásmidos con los cDNAs de interés, fueron cultivadas en 3 mL de medio líquido Luria Bertani (LB) con kanamicina (50 µg/µL) (antibiótico de selección). Las bacterias se cultivaron en un agitador orbital a 37 °C durante 12 horas, para la extracción del ADN plasmídico.

La extracción del ADN plasmídico se realizó siguiendo el protocolo de TENS (Zhou *et al.*, 1990), el cual consiste una lisis alcalina, usando un detergente (SDS) y una base fuerte (NaOH), el detergente corta la bicapa de fosfolípidos de la membrana y el NaOH desnatura las proteínas que participan en el mantenimiento de la estructura de la membrana celular, provocando la ruptura de las células.

Para la extracción, 1.5 mL del cultivo de bacterias crecidas toda la noche se centrifugó a 14,000 rpm por 10 segundos, para sedimentar las células, se decantó el sobrenadante, dejando de 50-100 μ L con la pastilla. Se adicionaron 300 μ L de TENS (Tris-HCL pH 8 1M, EDTA 0.5 M, NaOH 10 N, SDS 10 %, H₂O-UP) para lisar las células, y se agitó en vortex de 2-5 segundos, hasta que la mezcla se volvió viscosa. Se adicionaron 150 μ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2 para precipitar el debris celular, y se colocó en vortex de 2-5 segundos para homogenizar la mezcla. Se centrifugó 2 min a 14, 000 rpm para sedimentar los restos celulares y el ADN cromosomal. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, mezclando suavemente con 900 μ L de etanol absoluto previamente enfriado a -20 °C. Se centrifugó 2 min a 14, 000 rpm para sedimentar el ADN plasmídico y el ARN, observándose una pastilla blanca. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se enjuagó dos veces con 1 mL de etanol 70 %, después la pastilla se secó a 37 °C por 5 min. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 20-40 μ L agua ultra pura (H₂O-UP) estéril y se guardó a -20 °C.

4.4.4 Verificación del tamaño del inserto de las clonas control

Para verificar que el tamaño del inserto (cDNA) corresponde al esperado conforme el tamaño del CDS de *C. speciosus* más los UTRs (aproximadamente de 1,900 pb), se realizó una digestión al ADN extraído de la clonas usadas como control positivo para las reacciones de PCR, usando la enzima de restricción *Bsr*I / la cual tiene una secuencia de reconocimiento y corte que permite liberar el cDNA clonado en el plásmido.

Para un volumen final de 10 μ L, se adicionó 3 μ L de H₂O-UP estéril, 1 μ L de Buffer NEB 1X, 1 μ L de BSA 10X (Invitrogen Cat. No. 15561-020), 4.5 μ L de ADN plasmídico y 0.5 μ L de enzima *Bsr*I / (Cat. No. R0575S, BioLabs). La reacción se incubó a 37°C por 16 horas. Posteriormente se adicionó 0.3 μ L de Rnasa y nuevamente se colocó a 37°C por 15 minutos. Transcurridos los 15 minutos, se colocó en termoblock a 70°C por 10 minutos, para inactivar la RNasa.

Los fragmentos digeridos fueron visualizados en gel de agarosa al 1 % en TAE 1X, con 0.4 μ L BrEt (10mg/mL) en cámara de electroforesis horizontal, usando como referencia el marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen Cat. No. 15615-016). La electroforesis se realizó a 78 volts por Los fragmentos fueron visualizados en transluminador de luz UV (ChemiDoc MP).

4.4.5 Purificación del ADN plasmídico de clonas control

Una vez verificado que el tamaño del inserto corresponde al esperado para el gen de interés, las clonas más largas del lado 5' (Tabla 2) fueron purificadas para ser utilizadas como control en los ensayos de PCR. Para ello, fueron cultivadas en medio Luria Bertani (LB) con kanamicina. Se usaron 9 mL de medio líquido LB para inocular cada clona, a los cuales se les agregó Kanamicina (50 μ g/mL), por último, las bacterias se pusieron a crecer en un agitador orbital a 37°C durante 12 horas.

La extracción y purificación del ADN se realizó usando las columnas de purificación QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen No. Cat. 27104) conforme a lo establecido en el protocolo, usando los volúmenes correspondientes a la cantidad del mL de cada uno de los reactivos, en relación al cultivo de bacterias usado. Para la elución del ADN plasmídico, se hicieron dos eluciones con 15 μ L de H₂O-UP.

La cuantificación de la concentración del ADN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro (Nanodrop 1000 Thermo scientific). La calidad e integridad del ADN fue visualizada en geles de agarosa al 1 % en TAE IX con 0.4 μ L BrEt (10 mg/mL), a 80 volts.

4.4.6 Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para establecer las condiciones de PCR óptimas, se probaron varias temperaturas de alineamiento para probar los oligos diseñados para cada contig utilizando el

DNA plasmídico purificado de las clonas seleccionadas como control positivo (Tabla 3).

Se utilizó la enzima IQ SYBRGreen Supermix 2X (BioRad Cat. No. 170-8880) conforme lo recomendado por el proveedor en un volumen final de 25 μ L agregando 12 μ L de la enzima, 1 μ L de cada oligo Fwd y Rev a 20 pmoles/ μ L y 10 ng de ADN plasmídico. La reacción se llevó a cabo en un termociclador de iCycler iQ™ (BioRad). El programa de PCR consistió de un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido de 25-30 ciclos de: 30 s a 95 °C, 30 s a la temperatura de alineamiento de cada oligo conforme lo indicado en la tabla 3 y 30 s a 72 °C. Un ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min.

Tabla 3. Oligos diseñados para amplificar los distintos tipos de furostanol furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa conforme los *contigs* identificados en *A. tequilana*.

contig blanco	Tm	Secuencia del oligo	Tamaño (pb)
aC2842_2	63°C	Fwd: GCATTCCATCAACCAACTGCT Rev: TATCCTGCACGTTACAGGGC	101
aC2256_4	67.5°C	Fwd: GGCACAACCTCCTTAGCTTCCCA Rev: TGGTGGCAGTCACCTTCACG	126
aC2988_124	63°C	Fwd: ACTCCTTAGCTTCCCACCTTGC Rev: TTTAGCAGGGATGGCTGTGG	127

Tm: temperaturas de alineamiento utilizadas en las reacciones de PCR. Pb: tamaño del producto de amplificación.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de PCR se probó la especificidad de los oligos contra las clonas conteniendo cDNAs de los otros tipos de furostanol glicósido 26-O- β glucosidasa.

4.5 Análisis de expresión de los genes de *Agave* potencialmente codificantes de la furostanol glicósido 26-O- β glucosidasa

4.5.1 Manejo de los tejidos durante la colecta

Durante el proceso de colecta, los tejidos fueron manipulados con guantes estériles. Las hojas se limpiaron con un papel húmedo con alcohol al 70 %, después con un cúter previamente desinfectado con alcohol al 70 %, se seleccionó la parte media de cada hoja (respecto a su longitud) y procedió a cortar un segmento de cada hoja en tiras de 5 cm de longitud aproximadamente. Se mezclaron los fragmentos de las cinco hojas conformando así la muestra de hoja de cada planta.

En el caso del tallo de la planta (piña), ésta se cortó a la mitad, y con un bisturí se cortaron pequeños cubos de aproximadamente 1 cm³. Las raíces se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se cortaron en tiras de 5 cm aproximadamente.

Todos los tejidos se almacenaron en tubos estériles de plástico de 50 mL e inmediatamente se colocaron en nitrógeno líquido después de ser colectados. Por último, los tejidos se guardaron en ultra congelador a -80 °C hasta la extracción del ARN.

4.5.2 Extracción de ARN total y purificación de ARNm

Previo a la extracción de ARN todos los materiales (cristalería, plástico, morteros y agua) y reactivos fueron tratados toda la noche con Dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.05 % y esterilizados a 121 °C, durante 15 minutos o, en su caso, fueron horneados a 250 °C, durante 4 horas para inactivar las RNasas.

Los tejidos fueron molidos en mortero con nitrógeno líquido, previamente congelado, hasta obtener una consistencia de polvo muy fino, evitando el descongelamiento de la muestra durante el proceso de molienda.

La extracción de ARN total de los tres tejidos colectados se realizó usando el método comercial de extracción con TRIzol (Invitrogen Cat. No. 15596026) con algunas modificaciones, de acuerdo a lo reportado con Martínez-Hernández *et al.*, (2010); partiendo de 500 mg de tejido previamente molido, utilizando los volúmenes correspondientes de cada reactivo en relación a la cantidad de mg usados conforme al manual.

De manera general, el tejido molido se homogenizó con TRIzol, se centrifugó para eliminar restos celulares, al sobrenadante se le agregó cloroformo para extraer compuestos orgánicos, se centrifugó para la separación de las fases, recuperando la fase acuosa que contiene el ARN, el cual se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó con isopropanol. La pastilla compactada por centrifugación se lavó dos veces con etanol al 75 % con H₂O-DEPC, finalmente la pastilla se resuspendió con H₂O UP-DEPC en un volumen variable dependiendo del tamaño de la pastilla.

La purificación de ARNs mensajeros (ARNm) se realizó de acuerdo con Martínez-Hernández *et al.*, (2010), usando microesferas magnéticas, Dynabeads® Oligo (dT)₂₅ (Invitrogen Cat. No. 610-02), partiendo de 10-30 µg de ARN total, siguiendo las instrucciones del manual, con las siguientes modificaciones: al momento de la elución del ARNm, se colocó en termoblock a 80 °C y se eluyó dos veces con H₂O-UP DEPC en un volumen variable dependiendo del tamaño de la pastilla. La cantidad de dynabeads y los volúmenes de los buffers fueron ajustados a los µg usados para cada muestra.

La concentración del ARN se cuantificó en un espectrofotómetro (Nanodrop 1000 Thermo scientific) usando 2 µL de cada muestra. La calidad e integridad del ARN se evaluó mediante la separación electroforética en geles de agarosa (Ultra pure™, GIBCO BRL) al 1.2 % en TAE 1X teñido con Bromuro de Etidio (BrEt) (10 mg/mL) en cámara de electroforesis horizontal, a 78 volts. Los fragmentos fueron visualizados en transluminador de luz UV (ChemiDoc MP).

4.5.3 Condiciones de reacción para RT-PCR

Para analizar la cantidad relativa de mensajero de cada posible gen de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa se realizó la síntesis de cDNA de toda la población de mensajeros de cada tejido, especie y condición de colecta mediante una retrotranscripción. Posteriormente el mensajero de cada posible gen de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa se amplificó mediante PCR utilizando sus oligos específicos (Tabla 3).

La síntesis de cDNAs se realizó conforme lo publicado en Martínez *et al.*, 2010, utilizando la Transcriptasa reversa SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen Cat. No. 18080-093), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se preparó la mezcla de reacción en un volumen final de 20 μ L, usando 1 μ L de oligo dT (50 μ M), 0.5 μ L de dNTPS (25 mM), se usaron 1.6 μ g de ARN total o 160 ng de ARNm, la mezcla se homogenizó con agitador mecánico y se desnaturalizó el ARNm a 65 °C durante 5 minutos. Se transfirió la reacción a 45 °C y se agregó 4 μ L de Buffer 1st 5X y 2 μ L de DDT 0.1 M, se dejó estabilizar a 45 °C de 1 a 2 min, finalmente se agregó 1.2 μ l de enzima SuperScript III, la reacción se dejó a 45 °C por 60 min, la enzima se inactivó a 70 °C por 15 min.

Para la amplificación mediante PCR de los distintos cDNAs de la enzima furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa sintetizados a partir de los diversos tejidos de *A. tequilana* y *A. angustifolia*, se usaron 1 o 1.5 μ L de cDNA, dependiendo del nivel de expresión del gen. La reacción de PCR se llevó a cabo conforme lo establecido con las clonas control para cada par de oligos, utilizando 20-25 ciclos de amplificación, dependiendo del nivel de expresión de los genes evaluados. En todos los casos se colocó agua en lugar de cDNAs para los controles NTC (Non template control).

La temperatura de fusión de los productos generados en cada tejido evaluado con cada par de oligos utilizados fueron determinadas mediante un análisis de curva de disociación térmica (melt curve) de 55 a 90 °C cada 0.5 °C.

Los niveles relativos de expresión génica al punto final de la reacción de PCR fueron valorados mediante visualización de la intensidad del producto amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, en TAE IX con 0.4 μ L BrEt (10mg/mL) en cámara de electroforesis horizontal, usando como referencia el marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen Cat. No. 15628-050). La electroforesis se realizó a 78 volts. Los fragmentos fueron visualizados en transluminador de luz UV (ChemiDoc MP).

5. RESULTADOS

5.1 Identificación de secuencias de *A. tequilana* potencialmente codificantes para furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa

La base de datos AgaveEST-DB de *A. tequilana* disponible en el grupo de trabajo de la Dra. Aída Martínez fue consultada utilizando su interfase de búsqueda para identificar secuencias homólogas a genes codificantes de la enzima furostanol glucósido 26-O- β glucosidasa (F26G). Para ello se consultaron los hits del BLASTX realizado en trabajo previo (Martínez-Hernández, *et al.*, 2007; Martínez-Hernández *et al.*, 2010) en el cuál se comparó toda la base de datos AgaveEST-DB contra la base datos non-redundant (nr) de NCBI.

De dicho análisis se encontraron 46 ESTs, cuyo primer hit del BLASTX es el CDS de la enzima F26G de *Cheliocoustus speciosus*. Estos ESTs provienen de siete tejidos diferentes, aunque la mayoría pertenece a anteras (Tabla 4).

Tabla 4. Secuencias de ESTs similares a F26G, identificadas en la base de datos AgaveEST-DB de *A. tequilana*.

Tejido	EST's			
Anteras	<i>flant002_e11</i>	<i>flant006_f02</i>	<i>flant013_a03</i>	<i>flant017_c05</i>
	<i>flant003_g09</i>	<i>flant007_e01</i>	<i>flant014_g07</i>	<i>flant017_g05</i>
	<i>flant004_g04</i>	<i>flant007_g11</i>	<i>flant015_e05</i>	<i>flant019_e10</i>
	<i>flant005_b01</i>	<i>flant008_b07</i>	<i>flant015_e11</i>	<i>flant021_d11</i>
	<i>flant005_d11</i>	<i>flant009_d11</i>	<i>flant016_a04</i>	<i>flant021_h08</i>
	<i>flant006_a04</i>	<i>flant011_f12</i>	<i>flant016_a05</i>	
Raíz	<i>raraz001_f05</i>	<i>raraz011_a11</i>	<i>raraz002_g10</i>	<i>raraz015_h05</i>
	<i>raraz001_g07</i>	<i>raraz012_a09</i>	<i>raraz003_e05</i>	<i>raraz018_a09</i>
	<i>raraz007_h08</i>	<i>raraz012_c07</i>	<i>raraz005_d09</i>	
Ovario	<i>flovo002_e17</i>	<i>flovo005_p07</i>	<i>flovo009_b14</i>	<i>flovo011_n23</i>
	<i>flovo002_f17</i>	<i>flovo006_j05</i>	<i>flovo011_a09</i>	
Piña	<i>hppib022_c17</i>			
Bulbillo	<i>ble02011_b04</i>			
Hoja	<i>hphoc014_c12</i>			
	<i>hphoc032_f05</i>			
Meristemo	<i>mqmeq009_g17</i>			

Cuarenta de los EST's similares a F26G se agrupan en seis diferentes *clusters* y seis ESTs pertenecen a *singletons*, los cuales parecen ser fragmentos agrupables en los seis *clusters* identificados (datos no mostrados). Los *clusters* son grupos de EST's agrupados por su alta similitud entre ellos. Los "contigs" son las secuencias consenso derivadas de todos los ESTs agrupados en el *cluster*. La base de datos AgaveEST-DB contiene los "contigs" de los *clusters* generados previamente con el programa CAP3 a partir de los 35,000 ESTs (Martínez-Hernández *et al.*, 2007). Con la interfase de búsqueda de la AgaveEST-DB se identificó dentro de la base de datos los *clusters* de

los “*contigs*” cuyo primer hit del BLASTX indicaran homología con una furostanol glicósido 26-O-β-glucosidasa

En la figura 1, se muestra la frecuencia de ESTs en el banco (tejido) de origen de los ESTs contenidos en cada *cluster*. El guion después del nombre de cada contig indica el número de ESTs similares agrupadas en ese *cluster*. Se observa que el grupo I y grupo II son específicos de ciertos tejidos, anteras y raíz, respectivamente, mientras que el grupo III contiene EST’s provenientes de diversos tejidos.

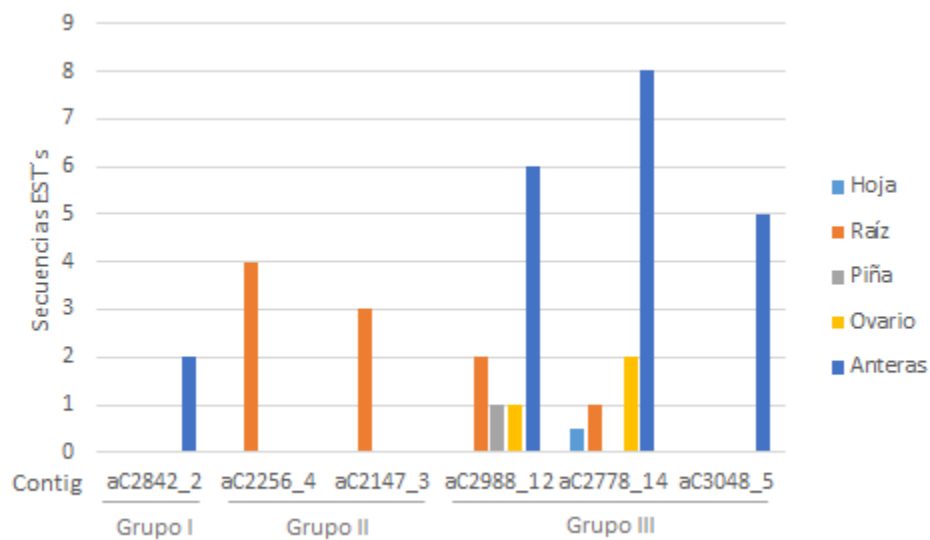


Figura 1. Distribución de ESTs que componen cada uno de los *contigs* seleccionados por su homología a F26G, conforme al tejido a partir del cual fueron clonados y secuenciados.

5.2 Análisis de los transcritos de *A. tequilana* potencialmente codificantes de furostanol glicósido 26-O-β glucosidasas

Para comparar los *contigs* de *A. tequilana* contra la secuencia de F26G de *C. speciosus*, y analizar similitudes y divergencias, se realizó un alineamiento comparando las secuencias consenso de nucleótidos de los seis *contigs* con la secuencia de la enzima furostanol glicósido 26-O-β glucosidasa de *C. speciosus*

(Figura 2). Se observa una zona del lado 5' altamente divergente y una zona menos divergente a partir del nucleótido 300 de *C. speciosus*.

A lo largo de todo el alineamiento, se identifican tres grupos o tipos de *contigs* de *A. tequilana* con base a la similitud o divergencias entre ellos. El primer tipo (I) está conformado por el *contig* aC2842_2 constituido por solo dos ESTs clonados a partir de anteras de *A. tequilana*, diverge del resto de los *contigs* identificados como similares a la F26G de *C. speciosus*. El segundo grupo conteniendo los *contigs* aC2147_3 y aC2256_4 está conformado por siete ESTs clonados todos exclusivamente en el banco de raíz. El tercer grupo conformado por los *contigs* aC2988_12, aC2778_14 y aC3048_5. Este grupo está conformado por la mayoría de los ESTs, conteniendo 31 secuencias provenientes de tejidos de anteras, raíz, hoja, piña y ovario, por lo que parece ser un gen de expresión más generalizada que los dos anteriores.

En el alineamiento también se puede observar que, aunque las secuencias de *A. tequilana* son similares a la de *C. speciosus*, cuatro de los seis *contigs*, pertenecientes al tipo I y II y el *contig* aC3048_5 del grupo tres, son más cortas, por lo tanto, están incompletos en el extremo 3', mientras que los *contigs* aC2988_12 y aC2778_14, ambos del grupo III, están completamente secuenciados de lado 3', incluso hasta el poliA. Por ello se decidió completar la secuenciación del *cluster* aC2842_2 y aC22256_4 representativos de los grupos I y II, respectivamente. Para ello se utilizaron oligos disponibles en el laboratorio dirigidos al extremo 3' de las clonas flant008_b07 y raraz002_g10 pertenecientes a cada *cluster*.

1 10
Cspeciosus_F26GATG.....GCGGTCAGH... GRUPO I
Atequillana_ac2842_2CCT...CAATTGACAG... GRUPO II
Atequillana_ac2147_3CTAGAAGTATGGCAGAACTGCTTAGCTTCACATTC... GRUPO II
Atequillana_ac2256_4AGAGCTAGTATGTCACAAAGTCCTTAGCTTCACATTC... GRUPO II
Atequillana_ac2778_14 TGGAGGCAAGCTAAGAACTAAGCGAATATGTCACAAAGTCCTTAGCTTCACATTC... GRUPO II
Atequillana_ac2988_12 ...GCAGAGTTAGGAAGTAAAGCGAATATGTCACAAAGTCCTTAGCTTCACATTC... GRUPO III
Atequillana_ac3048_5 ...AGCAGAGTTAGGAAGTAAAGCGAATATGTCACAAAGTCCTTAGCTTCACATTC... GRUPO III

20 30 40 50
Cspeciosus_F26GAGGCGTTCACAGCTGCTCTCTGCCACCGGGCGCCAGCCAAAGCTGTC GRUPO I
Atequillana_ac2842_2 GAAATGGTATTGTTAAAGCAATTCAGAAAGCAAAAGCTTCCTAGCTTCAGCTTC GRUPO II
Atequillana_ac2147_3 CAAAACCCAC...ATTGCTCCCAAGCAACCTCTGATTCACAGCAAGGCAATGCTTC GRUPO II
Atequillana_ac2256_4 CAAAACCCAC...ATTGCTCCCAAGCAACCTCTGATTCACAGCAAGGCAATGCTTC GRUPO II
Atequillana_ac2778_14 CAAAAGGTTCAC...ACTGCTCCCAAGCAACCTCTGATTCACAGCAAGGCAATGCTTC GRUPO III
Atequillana_ac2988_12 CAAAAGCTTCAC...ATTGCTCCCAAGCAACCTCTGATTCACAGCAAGGCAATGCTTC GRUPO III
Atequillana_ac3048_5 CAAAAGCTTCAC...ATTGCTCCCAAGCAACCTCTGATTCACAGCAAGGCAATGCTTC GRUPO III

60 70 80 90 100 110
Cspeciosus_F26G CATTAGCAGCGCCCACTGGCCCGGCCCGAGCCCATCATGACAGGCCGGGAACAGGAG GRUPO I
Atequillana_ac2842_2 CATTAGCAGCGCCCACTGGCCCGGCCCGAGCCCATCATGACAGGCCGGGAACAGGAG GRUPO II
Atequillana_ac2147_3 CATTAGCAGCGCCCACTGGCCCGGCCCGAGCCCATCATGACAGGCCGGGAACAGGAG GRUPO II
Atequillana_ac2256_4 CATTAGCAGCGCCCACTGGCCCGGCCCGAGCCCATCATGACAGGCCGGGAACAGGAG GRUPO II
Atequillana_ac2778_14 CATTAGCAGCGCCCACTGGCCCGGCCCGAGCCCATCATGACAGGCCGGGAACAGGAG GRUPO III
Atequillana_ac2988_12 CATTAGCAGCGCCCACTGGCCCGGCCCGAGCCCATCATGACAGGCCGGGAACAGGAG GRUPO III
Atequillana_ac3048_5 CATTAGCAGCGCCCACTGGCCCGGCCCGAGCCCATCATGACAGGCCGGGAACAGGAG GRUPO III

120 130 140 150 160 170
Cspeciosus_F26G GCAGAAGTATGAGCGCCGCCGGCGCTACGGACAGGGTGTTCGCCCCGGTGTGGCTGTC GRUPO I
Atequillana_ac2842_2AGGCTGCCACTCACA..AACAA...GAAACCC... GRUPO II
Atequillana_ac2147_3GAGGAGCGCTGCTGGCTCC..C... GRUPO II
Atequillana_ac2256_4GAGGAGCGCTGCTGGCTCC..C... GRUPO II
Atequillana_ac2778_14CAGAGAGCC...G..T... GRUPO III
Atequillana_ac2988_12ACAGAGCGCC...G..T... GRUPO III
Atequillana_ac3048_5ACAGAGCGCC...G..T... GRUPO III

180 190 200 210 220 230
Cspeciosus_F26G GGATGCTGCGTGGGCTTCGCTCCAGCACTGAGCAGGACAGGGGGTCGAGTCCGGC GRUPO I
Atequillana_ac2842_2 AAGCTTCTCCCTGGGGCGGACCGACA...AGCCACCCCTGTGAAAGCA GRUPO II
Atequillana_ac2147_3 AAGCTTCTCCCTGGGGCGGACCGACA...AGCCACCCCTGTGAAAGCA GRUPO II
Atequillana_ac2256_4 AAGCTTCTCCCTGGGGCGGACCGACA...AGCCACCCCTGTGAAAGCA GRUPO II
Atequillana_ac2778_14 TGTTCCTCGCTGGGGAGAGCGGACAAAA...AACCTACCTGTGAAAGCA GRUPO III
Atequillana_ac2988_12 TGTTCCTCGCTGGGGAGAGCGGACAAAA...AACCTACCTGTGAAAGCA GRUPO III
Atequillana_ac3048_5 TGTTCCTCGCTGGGGAGAGCGGACAAAA...AACCTACCTGTGAAAGCA GRUPO III

240 250 260 270 280 290
Cspeciosus_F26G CACCCCACTCCGTTCTCAGAGTCCCTTCCTGGCCAGGACACTTCCCTCCGGGGT GRUPO I
Atequillana_ac2842_2 ACCACCGAGGCTGTTCCGGCCAGTCTCTGCTGGGAGCAAGACTTCCCTCCGGGGT GRUPO II
Atequillana_ac2147_3 GCG...AGAAATGCTCCAGCAATGCTCTCTGCTGGGAGTCCAGACTTCCCTCCGGGGT GRUPO II
Atequillana_ac2256_4 GCG...AGAAATGCTCCAGCAATGCTCTCTGCTGGGAGTCCAGACTTCCCTCCGGGGT GRUPO II
Atequillana_ac2778_14 GCG...AGAAATGCTCCAGCAATGCTCTCTGCTGGGAGTCCAGACTTCCCTCCGGGGT GRUPO III
Atequillana_ac2988_12 GCG...AGAAATGCTCCAGCAATGCTCTCTGCTGGGAGTCCAGACTTCCCTCCGGGGT GRUPO III
Atequillana_ac3048_5 GCG...AGAAATGCTCCAGCAATGCTCTCTGCTGGGAGTCCAGACTTCCCTCCGGGGT GRUPO III

300 310 320 330 340 350
Cspeciosus_F26G TATCTTTGCTGCAAGCTCTGCTGCTTAGCAAGTCAAGCAGCTTGGAAATGAGGAGGGA GRUPO I
Atequillana_ac2842_2 TCAAGTTCGCGTTCCTCTGCTTAGCAAGTCAAGCAGCTTGGAAATGAGGAGGGA GRUPO II
Atequillana_ac2147_3 TCAAGTTCGCGTTCCTCTGCTTAGCAAGTCAAGCAGCTTGGAAATGAGGAGGGA GRUPO II
Atequillana_ac2256_4 TCAAGTTCGCGTTCCTCTGCTTAGCAAGTCAAGCAGCTTGGAAATGAGGAGGGA GRUPO II
Atequillana_ac2778_14 TCAAGTTCGCGTTCCTCTGCTTAGCAAGTCAAGCAGCTTGGAAATGAGGAGGGA GRUPO III
Atequillana_ac2988_12 TCAAGTTCGCGTTCCTCTGCTTAGCAAGTCAAGCAGCTTGGAAATGAGGAGGGA GRUPO III
Atequillana_ac3048_5 TCAAGTTCGCGTTCCTCTGCTTAGCAAGTCAAGCAGCTTGGAAATGAGGAGGGA GRUPO III

360 370 380 390 400 410
Cspeciosus_F26G GAGCCCAAGCATATGGCAACCTTACACAGGAGCAACCGGAGAAATATGAGACACCA GRUPO I
Atequillana_ac2842_2 GAGCCCAAGCATATGGCAACCTTACACAGGAGCAACCGGAGAAATATGAGACACCA GRUPO II
Atequillana_ac2147_3 GAGCCCAAGCATATGGCAACCTTACACAGGAGCAACCGGAGAAATATGAGACACCA GRUPO II
Atequillana_ac2256_4 GAGCCCAAGCATATGGCAACCTTACACAGGAGCAACCGGAGAAATATGAGACACCA GRUPO II
Atequillana_ac2778_14 GAGCCCAAGCATATGGCAACCTTACACAGGAGCAACCGGAGAAATATGAGACACCA GRUPO III
Atequillana_ac2988_12 GAGCCCAAGCATATGGCAACCTTACACAGGAGCAACCGGAGAAATATGAGACACCA GRUPO III
Atequillana_ac3048_5 GAGCCCAAGCATATGGCAACCTTACACAGGAGCAACCGGAGAAATATGAGACACCA GRUPO III

420 430 440 450 460 470
Cspeciosus_F26G GCAATGGCGATAGGCAACTGATTCGACATGATATACAGGAGGATGAGCTTGGCTCA GRUPO I
Atequillana_ac2842_2 GCAATGGCGATAGGCAACTGATTCGACATGATATACAGGAGGATGAGCTTGGCTCA GRUPO II
Atequillana_ac2147_3 GCAATGGCGATAGGCAACTGATTCGACATGATATACAGGAGGATGAGCTTGGCTCA GRUPO II
Atequillana_ac2256_4 GCAATGGCGATAGGCAACTGATTCGACATGATATACAGGAGGATGAGCTTGGCTCA GRUPO II
Atequillana_ac2778_14 GCAATGGCGATAGGCAACTGATTCGACATGATATACAGGAGGATGAGCTTGGCTCA GRUPO III
Atequillana_ac2988_12 GCAATGGCGATAGGCAACTGATTCGACATGATATACAGGAGGATGAGCTTGGCTCA GRUPO III
Atequillana_ac3048_5 GCAATGGCGATAGGCAACTGATTCGACATGATATACAGGAGGATGAGCTTGGCTCA GRUPO III

480 490 500 510 520 530
Cspeciosus_F26G AAGATCTCCGCTGACAGCTTACCAATTCATGCTGCGCAAGGATATTCCGAAAGC GRUPO I
Atequillana_ac2842_2 AAGATCTCCGCTGACAGCTTACCAATTCATGCTGCGCAAGGATATTCCGAAAGC GRUPO II
Atequillana_ac2147_3 AAGATCTCCGCTGACAGCTTACCAATTCATGCTGCGCAAGGATATTCCGAAAGC GRUPO II
Atequillana_ac2256_4 AAGATCTCCGCTGACAGCTTACCAATTCATGCTGCGCAAGGATATTCCGAAAGC GRUPO II
Atequillana_ac2778_14 AAGATCTCCGCTGACAGCTTACCAATTCATGCTGCGCAAGGATATTCCGAAAGC GRUPO III
Atequillana_ac2988_12 AAGATCTCCGCTGACAGCTTACCAATTCATGCTGCGCAAGGATATTCCGAAAGC GRUPO III
Atequillana_ac3048_5 AAGATCTCCGCTGACAGCTTACCAATTCATGCTGCGCAAGGATATTCCGAAAGC GRUPO III

540 550 560 570 580 590
Cspeciosus_F26G GCAATATGAGAGCGGCATTAATGAGGAGCGGATTAATGATACAAAGAGGATCAACG
Atequillana_ac2842_2 CAAATATGAGAGCGGCATTAATGAGGAGCGGATTAATGATACAAAGAGGATCAACG
Atequillana_ac2147_3 CAGACAAAGAA...AATAATTAATGAGGAGCGGATTAATGATACAAAGAGGATCAACG
Atequillana_ac2256_4 GCAACAAAGAA...AATAATTAATGAGGAGCGGATTAATGATACAAAGAGGATCAACG
Atequillana_ac2778_14 GCAACAAAGAA...AATAATTAATGAGGAGCGGATTAATGATACAAAGAGGATCAACG
Atequillana_ac2988_12 GCAACAAAGAA...AATAATTAATGAGGAGCGGATTAATGATACAAAGAGGATCAACG
Atequillana_ac3048_5 GCAACAAAGAA...AATAATTAATGAGGAGCGGATTAATGATACAAAGAGGATCAACG

600 610 620 630 640 650
Cspeciosus_F26G AGGAGCAAAATAATGCTATTAAGCCCTATGCTAGCAATGTTCAATGGCAAGCTCCACAGC
Atequillana_ac2842_2 ACCATAATGCAAAATGCTATTAAGCCCTATGCTAGCAATGTTCAATGGCAAGCTCCACAGC
Atequillana_ac2147_3 AATGCTGCAAAATGCTATTAAGCCCTATGCTAGCAATGTTCAATGGCAAGCTCCACAGC
Atequillana_ac2256_4 AATGCTGCAAAATGCTATTAAGCCCTATGCTAGCAATGTTCAATGGCAAGCTCCACAGC
Atequillana_ac2778_14 AATGCTGCAAAATGCTATTAAGCCCTATGCTAGCAATGTTCAATGGCAAGCTCCACAGC
Atequillana_ac2988_12 AATGCTGCAAAATGCTATTAAGCCCTATGCTAGCAATGTTCAATGGCAAGCTCCACAGC
Atequillana_ac3048_5 AATGCTGCAAAATGCTATTAAGCCCTATGCTAGCAATGTTCAATGGCAAGCTCCACAGC

660 670 680 690 700 710
Cspeciosus_F26G CGTTGCAAGACTCCRAAAAAGGTTTCGAAAGCTICGAGATTGCTAAAGAGTTCAGCAAGC
Atequillana_ac2842_2 CACTGCAAGACTCCRAAAAAGGTTTCGAAAGCTICGAGATTGCTAAAGAGTTCAGCAAGC
Atequillana_ac2147_3 ATTTCGAAAGACTCCRAAAAAGGTTTCGAAAGCTICGAGATTGCTAAAGAGTTCAGCAAGC
Atequillana_ac2256_4 ATTTCGAAAGACTCCRAAAAAGGTTTCGAAAGCTICGAGATTGCTAAAGAGTTCAGCAAGC
Atequillana_ac2778_14 ACTTCGAAAGACTCCRAAAAAGGTTTCGAAAGCTICGAGATTGCTAAAGAGTTCAGCAAGC
Atequillana_ac2988_12 ACTTCGAAAGACTCCRAAAAAGGTTTCGAAAGCTICGAGATTGCTAAAGAGTTCAGCAAGC
Atequillana_ac3048_5 ACTTCGAAAGACTCCRAAAAAGGTTTCGAAAGCTICGAGATTGCTAAAGAGTTCAGCAAGC

720 730 740 750 760 770
Cspeciosus_F26G ACGCCGACATATGCTTCAAAAGAAATTCGGGAGAGAGTGAAGCAGTGGATCACAATTAATC
Atequillana_ac2842_2 ACTGTGAAGTATGCTTCAAAAGAAATTCGGGAGAGAGTGAAGCAGTGGATCACAATTAATC
Atequillana_ac2147_3 TTGCTAGAAATGCTTCAAAAGAAATTCGGGAGAGAGTGAAGCAGTGGATCACAATTAATC
Atequillana_ac2256_4 TTGCTAGAAATGCTTCAAAAGAAATTCGGGAGAGAGTGAAGCAGTGGATCACAATTAATC
Atequillana_ac2778_14 TTGCTAGAAATGCTTCAAAAGAAATTCGGGAGAGAGTGAAGCAGTGGATCACAATTAATC
Atequillana_ac2988_12 TTGCTAGAAATGCTTCAAAAGAAATTCGGGAGAGAGTGAAGCAGTGGATCACAATTAATC
Atequillana_ac3048_5 TTGCTAGAAATGCTTCAAAAGAAATTCGGGAGAGAGTGAAGCAGTGGATCACAATTAATC

780 790 800 810 820 830
Cspeciosus_F26G ACCCTGCGAGTTTGAAGCAATCCGCTAGCGGTTCGGAGCAGTCCAGCCAGCCGGGAGCTCT
Atequillana_ac2842_2 ACCCTGCGAGTTTGAAGCAATCCGCTAGCGGTTCGGAGCAGTCCAGCCAGCCGGGAGCTCT
Atequillana_ac2147_3 AGCCCTGCGAGTTTGAAGCAATCCGCTAGCGGTTCGGAGCAGTCCAGCCAGCCGGGAGCTCT
Atequillana_ac2256_4 AGCCCTGCGAGTTTGAAGCAATCCGCTAGCGGTTCGGAGCAGTCCAGCCAGCCGGGAGCTCT
Atequillana_ac2778_14 AGCCCTGCGAGTTTGAAGCAATCCGCTAGCGGTTCGGAGCAGTCCAGCCAGCCGGGAGCTCT
Atequillana_ac2988_12 AGCCCTGCGAGTTTGAAGCAATCCGCTAGCGGTTCGGAGCAGTCCAGCCAGCCGGGAGCTCT
Atequillana_ac3048_5 AGCCCTGCGAGTTTGAAGCAATCCGCTAGCGGTTCGGAGCAGTCCAGCCAGCCGGGAGCTCT

840 850 860 870 880
Cspeciosus_F26G CAACATGGT...ACGGCTGCCCTGCAAGGACTCTGCTAATGAACCT
Atequillana_ac2842_2 CTGAGCC...ATGGCTGCCCTGCAAGGACTCTGCTAATGAACCT
Atequillana_ac2147_3 CACCGGATTTATTCATATCCAGAGACATGTCCTGCAAGGACTCTGCTAATGAACCT
Atequillana_ac2256_4 CACCGGATTTATTCATATCCAGAGACATGTCCTGCAAGGACTCTGCTAATGAACCT
Atequillana_ac2778_14 CACCGGATTTATTCATATCCAGAGACATGTCCTGCAAGGACTCTGCTAATGAACCT
Atequillana_ac2988_12 CACCGGATTTATTCATATCCAGAGACATGTCCTGCAAGGACTCTGCTAATGAACCT
Atequillana_ac3048_5 CACCGGATTTATTCATATCCAGAGACATGTCCTGCAAGGACTCTGCTAATGAACCT

890 900 910 920 930 940
Cspeciosus_F26G ACGAAATCAACAGAACTCCCTTCCTGCAATGCAAAATCCGCTCAAAATTTACAGGATA
Atequillana_ac2842_2 ACATTTGAGCAACAGAACTCCCTTCCTGCAATGCAAAATCCGCTCAAAATTTACAGGATA
Atequillana_ac2147_3 ACATTTGAGCAACAGAACTCCCTTCCTGCAATGCAAAATCCGCTCAAAATTTACAGGATA
Atequillana_ac2256_4 ACATTTGAGCAACAGAACTCCCTTCCTGCAATGCAAAATCCGCTCAAAATTTACAGGATA
Atequillana_ac2778_14 ACATTTGAGCAACAGAACTCCCTTCCTGCAATGCAAAATCCGCTCAAAATTTACAGGATA
Atequillana_ac2988_12 ACATTTGAGCAACAGAACTCCCTTCCTGCAATGCAAAATCCGCTCAAAATTTACAGGATA
Atequillana_ac3048_5 ACATTTGAGCAACAGAACTCCCTTCCTGCAATGCAAAATCCGCTCAAAATTTACAGGATA

950 960 970 980 990 1000
Cspeciosus_F26G ACTATAGGCTACTCAAACGGCGAAATAGGGATTACTTTGAACAGCTTGTGGTATGAGC
Atequillana_ac2842_2 AAGTTCAGAGGACA...
Atequillana_ac2147_3 ...
Atequillana_ac2256_4 ...
Atequillana_ac2778_14 ACTTTCAGGCTACACAGGAGGTAATGTTGGAATTACTAGTACTAGTAAAGTTTGTGGTTATGC
Atequillana_ac2988_12 ACTTTCAGGCTACACAGGAGGTAATGTTGGAATTACTAGTACTAGTAAAGTTTGTGGTTATGC
Atequillana_ac3048_5 ...

1010 1020 1030 1040 1050 1060
Cspeciosus_F26G CATACTCAAAGTCTCAGCAAGATGTTGGAGGAGCCACTAGAGCTTCTGACTTTCATGTTTG
Atequillana_ac2842_2 ...
Atequillana_ac2147_3 ...
Atequillana_ac2256_4 CACTACAGAAATCTCCTCAAGATAAAGATCGGGCTACAAGAGCACTTGAATTTATGTTTG
Atequillana_ac2778_14 CACTTACAGAAATCTCCTCAAGATAAAGATCGGGCTACAAGAGCACTTGAATTTATGTTTG
Atequillana_ac2988_12 CACTTACAGAAATCTCCTCAAGATAAAGATCGGGCTACAAGAGCACTTGAATTTATGTTTG
Atequillana_ac3048_5 CACTTACAGAAATCTCCTCAAGATAAAGATCGGGCTACAAGAGCACTTGAATTTATGTTTG

1070 1080 1090 1100 1110 1120
Cspeciosus_F26G GATGGTACATGGACCCCTTGGTGAACGGCGACTATCCATTTCATCATGAGGGCACTGGTGA
Atequillana_ac2842_2 ...
Atequillana_ac2147_3 ...
Atequillana_ac2256_4 ...
Atequillana_ac2778_14 GATGGTTCATGGATCCCTTGACAACGGGAGATTACCCATTTCATCATGAGGGCACTGGTGA
Atequillana_ac2988_12 GATGGTTCATGGATCCCTTGACAACGGGAGATTACCCATTTCATCATGAGGGCACTGGTGA
Atequillana_ac3048_5 ...

1130 1140 1150 1160 1170 1180
Cspeciosus_F26G GGGACAGACTGCCCTTCITTTACCCAGCGGAGTCTGAGCTGATCAAAGGATCTTATGACT GRUPO I
Atequilana_ac2842_2 GRUPO II
Atequilana_ac2147_3 GRUPO II
Atequilana_ac2256_4 AGGAGAGGCTTCCATCAITTTACAGATGATGAGAAGGACATGCTTAAAGATCTTATGACT GRUPO III
Atequilana_ac2778_14 AAGAGAGACTTCCATACITTTAGTAAATGAAGAGAAGGAGATGATTAAGGATCTTTTGGACT
Atequilana_ac2988_12 AGGAGAGACTTCCGTACTTTACTAATGAAGAGAAGGACATGATTAAGGATCTTTTGGACT
Atequilana_ac3048_5

1190 1200 1210 1220 1230 1240
Cspeciosus_F26G TCATTGGAATCAAITTTACACTTCAAATATGCTCCAGCATGCCCCAGTCACTGAAGACC GRUPO I
Atequilana_ac2842_2 GRUPO II
Atequilana_ac2147_3 GRUPO II
Atequilana_ac2256_4 TTATAGGACTTAACTATTACAGTCCAGATATGCTACTTCAATCCATCTCTGAAGGAT GRUPO III
Atequilana_ac2778_14 TTATAGGATTAAGTATTACAGTCCAGATATGTTACTCCCTTAACC.....T
Atequilana_ac2988_12 TTATAGGATTAATTTATACAGTCCAGATATGTTACTCCCTTAACC.....T
Atequilana_ac3048_5

1250 1260 1270 1280 1290 1300
Cspeciosus_F26G ACACACCTTGACAATAGCTACTTTGATTCTTATGTAATCAATCGGGTGA...AAAGAAATG GRUPO I
Atequilana_ac2147_3 GRUPO II
Atequilana_ac2256_4 TTGGCCCTCCCTTGGCATACTGATTCATTTACGACAAAGGGGCGAA...AAAGATG GRUPO III
Atequilana_ac2778_14 ATCAGCCCTCCCTTGGCATACTTGTATTCATTTACTGAACAAGGGGAAAAAATAAGGATG
Atequilana_ac2988_12 ACCAGCCCTCCCTTGGCATACTTGTATTCATTTACTGAACAAGGGGAAAAAATAAGGATG
Atequilana_ac3048_5

1310 1320 1330 1340 1350 1360
Cspeciosus_F26G GTGTTCCAAATAGGGCCATTTGCAAGGTTCCCTGGATATACITTTTATCCACGGGGCTGAAG GRUPO I
Atequilana_ac2842_2 GRUPO II
Atequilana_ac2147_3 GRUPO II
Atequilana_ac2256_4 GAGTCAAAATGGAGACCTTGCATGGCTCTTGGATATATGTCGTTCCCTGATGGAATAAAG GRUPO III
Atequilana_ac2778_14 GAGTCCAAATGGAGAGCTTGCATGGCTCTTGGATATATGTCGTTCCCTGATGGAATAAAG
Atequilana_ac2988_12 GAGTCCAAATGGAGAGCTTGCATGGCTCTTGGATATATGTCGTTCCCTGATGGAATAAAG
Atequilana_ac3048_5

1370 1380 1390 1400 1410 1420
Cspeciosus_F26G AACITCTGCTTACGTAAGAGAAGATACTGCAACCCAAAGATCTACATCACCAGAAATG GRUPO I
Atequilana_ac2842_2 GRUPO II
Atequilana_ac2147_3 GRUPO II
Atequilana_ac2256_4 ATCTGCTTACTTACATAAAGGAGACATACAAATATCCAAAGATCTACATACTGAGAAATG GRUPO III
Atequilana_ac2778_14 AACTATTACTATACATAAAGGAGAGATACAAATAACCCGAAGATCTACATACTGAGAAATG
Atequilana_ac2988_12 AACTATTATTACATAAAGGAGAGATACAAATAACCCGAAGATCTACATACTGAGAAATG
Atequilana_ac3048_5

1430 1440 1450 1460 1470
Cspeciosus_F26G GAACITGCTGAGGTGCAAAAAGGAG.....AAGGGCG.TACCACITTCATGACCCCTGAGA GRUPO I
Atequilana_ac2842_2 GRUPO II
Atequilana_ac2147_3 GRUPO II
Atequilana_ac2256_4 GAACITGCTGAGAGAGAAAACCTCAAAAGTATCACTGGAGCTAGCTATCCGCTGATGAGCATA GRUPO III
Atequilana_ac2778_14 GAACITGCTGAGAAAAGAGGATCCAGAACTGCCAAGGGGAGAAAGCAGTTCATGATGAGCATA
Atequilana_ac2988_12 GAACITGCTGAGAAAAGAGGATCCAGAACTGCCAAGGGGAGAAAGCAGTTCATGATGAGCATA
Atequilana_ac3048_5

1480 1490 1500 1510 1520 1530
Cspeciosus_F26G GAAAGGAATACCTCACTACCATCTCCGCCAAGTCCCTCCAAGCCATTCGGGAGGGAGTTC GRUPO I
Atequilana_ac2842_2 GRUPO II
Atequilana_ac2147_3 GRUPO II
Atequilana_ac2256_4 GAAITGACTACATGCTACTCATCTTCTCAAGTCCGACAAAGCAATGAGGGAGGGAGGCTG GRUPO III
Atequilana_ac2778_14 GAAITGACTACATGCTACTCATCTTCTCAAGTCCGACAAAGCAATGAGGGAGGGGCGG
Atequilana_ac2988_12 GAAITGACTACATGCTACTCATCTTCTCAAGTCCGACAAAGCAATGAGGGAGGGAGGCTG
Atequilana_ac3048_5

1540 1550 1560 1570 1580 1590
Cspeciosus_F26G GCGTGAAGGGGCACTTTACTTGGCGCTGACTGATAACTTCGAGTGGGACAAAGGCTACA GRUPO I
Atequilana_ac2842_2 GRUPO II
Atequilana_ac2147_3 GRUPO II
Atequilana_ac2256_4 ATGTGCAAGGATACATGCTACTCATCTTCTCAAGTCCGACAAAGCAATGAGGGAGGGAGGCTG GRUPO III
Atequilana_ac2778_14 ATGTGCAAGGATACCTTGGCATGGTCTATTAAGATAAATTCGAGTGGGATGAGGATACT
Atequilana_ac2988_12 ATCTGCAAGGATACCTTGGCATGGTCTATTAAGATAAATTCGAGTGGGATGAGGATACT
Atequilana_ac3048_5

1600 1610 1620 1630 1640 1650
Cspeciosus_F26G CAGAGCGTITTTGGTCTCATTTATATGATTAAGACAAGGATTTCAATCGTCAACCCAAGG GRUPO I
Atequilana_ac2842_2 GRUPO II
Atequilana_ac2147_3 GRUPO II
Atequilana_ac2256_4 TTAGACCGTITTTGACTTACTATGTTGACTTTAAGGATGCTTTAAGATATATCCAAAGT GRUPO III
Atequilana_ac2778_14 TTAGACCGTITTTGACTTACTATGTTGACTTTAAGGATGCTTTAAGATATATCCAAAGT
Atequilana_ac2988_12 TTAGACCGTITTTGACTTACTATGTTGACTTTAAGGATGCTTTAAGATATATCCAAAGT
Atequilana_ac3048_5

1660 1670 1680
Cspeciosus_F26G ATTTTACCAAGTGGTTCAGCAAGTTCCTTGGAGGCGTGA..... GRUPO I
Atequilana_ac2842_2 GRUPO II
Atequilana_ac2147_3 GRUPO II
Atequilana_ac2256_4 CATCATTCAGTACTACAAACAATTCCTTTCATTCATAAGAAATCATGTTGTTATCCATTC GRUPO III
Atequilana_ac2778_14 CATCATTCAGTATTAACAACAATTCCTTTCATTCATAAGAAATCATGTTGTTATCCATTC
Atequilana_ac2988_12 CATCATTCAGTATTAACAACAATTCCTTTCATTCATAAGAAATCATGTTGTTATCCATTC
Atequilana_ac3048_5

Cspeciosus_F26G GRUPO I
Atequilana_ac2842_2 GRUPO II
Atequilana_ac2147_3 GRUPO II
Atequilana_ac2256_4 GRUPO III
Atequilana_ac2778_14 CCTCTTTTGGTGTGGTTCCTTCTTCTTCTTACTAGCTTGTGTTTGGATGCGCAAGAT
Atequilana_ac2988_12 CCTCTTTTGGTGTGGTTCCTTCTTCTTCTTACTAGCTTGTGTTTGGATGCGCAAGAT
Atequilana_ac3048_5

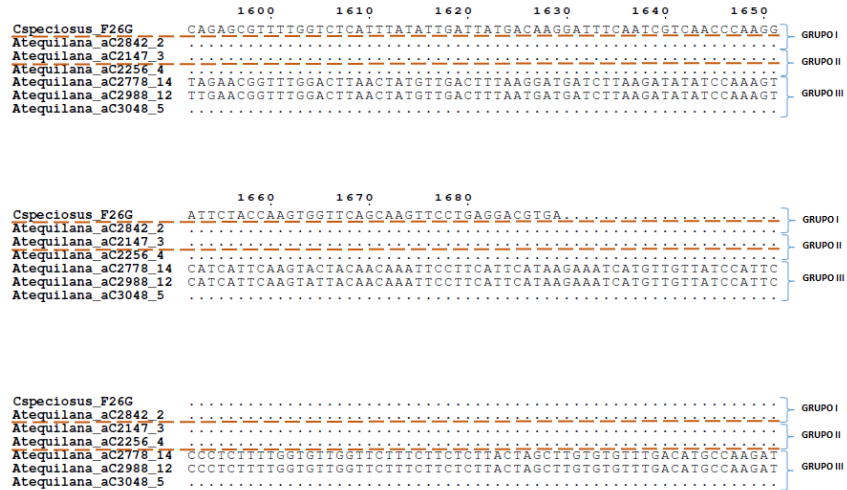


Figura 2. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de los *contigs* de *A. tequilana* similares a F26G de *C. speciosus*. Recuadro naranja muestra donde se localiza el ATG de cada *contig*. Líneas punteadas en color café, muestran el agrupamiento de las secuencias en tres grupos. Grupo I: aC2842_2; Grupo II: aC2147_3 y aC2256_4; Grupo III: aC2778_14, aC2988_12 y Ac3048_5. En recuadro rosa se observa la zona conservada entre los *contigs*, Se muestran los sitios donde se localizan los oligos (fwd y rev) usados en las reacciones de PCR correspondientes a cada *contig*: recuadros en color azul, morado y verde.

Las secuencias de los *contigs* identificados en la base de datos de AgaveEST-DB homólogas a F26G fueron analizadas para verificar si las secuencias contenidas dentro de cada *cluster* realmente son similares entre sí y si la secuencia del contig no contienen errores. Para ello se realizó un alineamiento entre ellas y los *contigs* derivados de los *clusters* a los que pertenecen.

En la figura 3, se puede observar que las secuencias que componen cada *cluster* son agrupables entre ellas y que el contig generado como secuencia consenso es correcto para la identificación las clonas conteniendo cDNAs completos (“Full lenght cDNAs”) de los tres grupos de *contigs* identificados en el alineamiento, se seleccionaron los tres *contigs* constituidos por el mayor número de secuencias, identificando la clona que contiene el cDNA más largo del lado 5´, (Figura 3) el cuál puede corresponder a un cDNA completo (“full lenght cDNAs”). Estas se usaron para análisis posteriores y como control positivo en las reacciones de PCR.

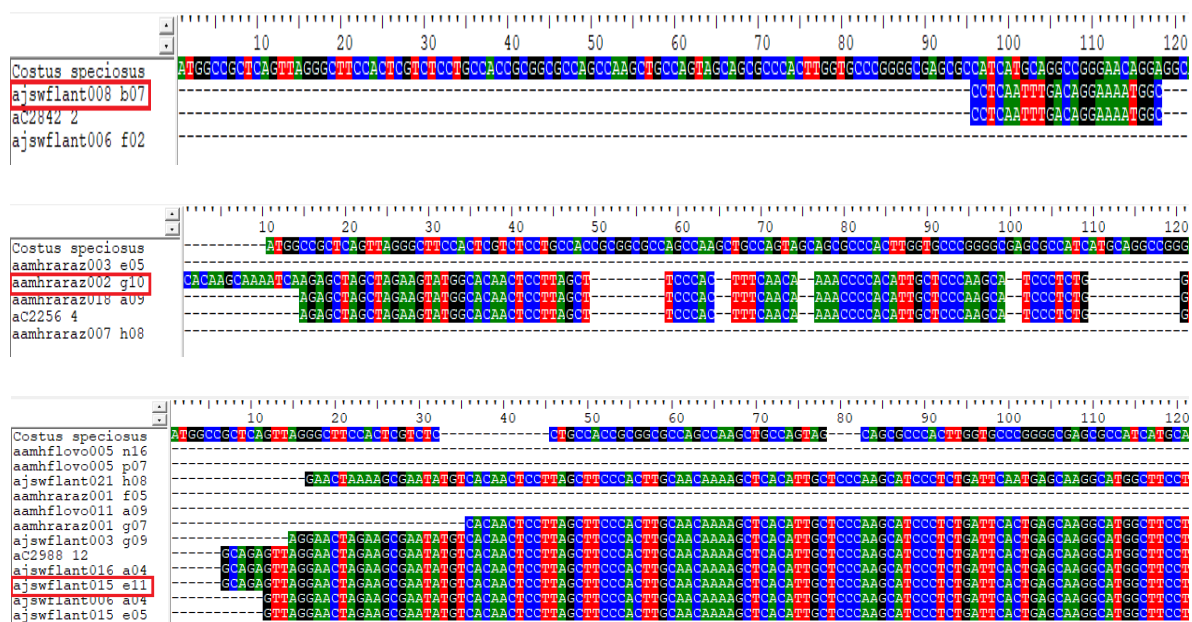


Figura 3. Identificación de clonas más largar del lado 5´ mediante el alineamiento interno de los *clusters* potencialmente codificantes de F26G. El recuadro rojo muestra, para cada clúster, la secuencia más larga del lado 5´ (EST). Arriba_aC2842_2, en medio: aC2256_4, abajo: aC2988_12.

5.3 Los ESTs de *A. tequilana* codifican proteínas estructuralmente similares a la furostanol glicósido 26-O- β glucosidasa

Las secuencias de los seis *contigs* de *A. tequilana* similares a F26G fueron traducidas a proteínas y se ubicó su posible Marco de Lectura Abierto (ORF u Open Reading Frame). Las secuencias proteicas deducidas a partir de los cDNAs, fueron comparadas con BLASTP contra la base de datos nr de NCBI, así como Phobius y Enzyme del European Bioinformatics Institute.

De los resultados de BLASTP se seleccionaron algunas de estas secuencias para analizar la similitud o divergencias entre las posibles F26G de diversos géneros, incluyendo las de *Agave* aquí identificadas, y la secuencia de *C. speciosus*. Se incluyeron también secuencias de *A. tequilana* y *A. desertii* bioinformáticamente reconstruidas por Lledías *et al.*, (2017) a partir de transcriptomas de seqRNA (Gross *et al.*,2013). Con fines comparativos se incluyeron en el alineamiento secuencias de otras b-glucosidasas no catalogadas como F26G. El alineamiento se observa en la figura 4.

En el alineamiento se puede observar que los tres grupos de *contigs* de *A. tequilana* son homólogos a la enzima F26G de *C. speciosus* y poseen una zona altamente conservada entre las secuencias proteicas, la cual corresponde a el dominio de las F26G con base en el análisis de BLASTP. También se observa que las secuencias de los cDNAs aC2842_2, aC2147_3 y aC3048_5 están incompletas del lado 3', conforme a lo observado en el alineamiento de nucleótidos


```

1          10
Ppersica_BGlul2_IsX2      .....MALQ...FRSL.LLC
Pmiliaceum_BGlul24      .....MP.....RLS
Gsoja_BGlul24           .....MA...F.SGYF.LLG
Vradiata_BGlul2         .....MA...Y.KEYV.VLP
Vradiata_BGlul2_IsX1    .....MA...Y.KEYV.LLP
Csativus_BGlul2        .....MA...MGF.ATS
Psomniferum_BGlul2     .....MKKKT.VGSRGV.LTG
Cquinoa_BGlul2         .....MRVDVQ.THVF.LVQ
Humbratica_BGlul2      .....MAI.P.GY.LLH
Ppersica_BGlul2         .....MAMQ...FGSL.VLG
Hbrasiliensis_BGlul2_IsX2 .....MAI.ENYY.LLS
Jcurcas_BGlul2         .....MRIQKN.QNYF.LLS
Atequilana_ac2147_3     MAQLLSFPLSTKPHIAPKHPS.GSI SKAWLP...SLNVKVT...TK...RRA...AA
Atequilana_ac2256_4     MAQLLSFPLSTKPHIAPKHPS.GSI SKAWLP...SLNVKVT...TK...RRA...AA
Atequilana_F26G         MSLLSFPLATKAHIAPKRPS.DSI SKAWLP...CSRLDVKV...TTAIPDQNK...RR
Adeserti_F26G          .....MKV.....TTAI.....
Atequilana_ac2778_14    MSQLLSFPLATKRGHTAPKHPS.DSI SKAWLP...CSRLDVKV...TAAIPAKN...KR
Atequilana_ac2988_12    MSQLLSFPLATKAHIAPKHPS.DSI SKAWLP...CSHLDVKV...TTAIPAKNN...RR
Atequilana_ac3048_5     MSQLLSFPLATKAHIAPKHPS.DSI SKAWLP...CSHLDVKV...TTAIPAKNN...RR
Aofficinalis_BGlul2    .MALSKAQLSNFTSPSPK...WSKAISPS...LLVIKPRLLKTFI
Aofficinalisb_F26G     .MEPAIVISSKCIFPMP...EG...KIRVILTDRK...H
Atequilana_ac2842_2    .MALVSIPTNCF SARPP...EG...KVRLPLTNKK...P
Aofficinalis_F26G     .MAKLRYARIQATNDVSH...GRGTPLATNEI...RTRCQIRRRS...S
Pdactylifera_F26G_IsX3 .MALLSVVPSATAHAASQ...KARMLSTNKT...HS
Pdactyliferab_F26G_IsX2 .MALLSVVPSATAHAASQ...KARMLSTNKT...HS
Cspeciosus_F26G       .MAAQGLPLVLSCHRGAS...SSA.HLVPGASAIMQAGNRRQKMRAPALDRVV...FARV
Macuminatamalaccensisb_F26G .MALLGLPLSSCYHATIA...KQHLPRQ.SR...K
Macuminatamalaccensis_F26G .MALLCVPLNKGTLASLE...KARVOPCHGRR...TL
Pdactylifera_F26G     .MALLHVQLP...NCTFNSSPKVP...TL...KAKVPGN.TRR...RV
Pdactylifera_F26G_IsX2 .....M
Pdactylifera_F26G_IsX1 .....M

```

```

20          30          40          50          60
Ppersica_BGlul2_IsX2      V...VLLLLGF...ALANTNAARTDPPVVCATLNRTHFDLTFPGFTFGAATAAYQIEGA
Pmiliaceum_BGlul24      LLL...LLL...FFFAVSTAKPEKTIISRSQF...PKGFLFGAASSAYQIEGA
Gsoja_BGlul24           LIALVIVRSSK...VTCEELAVNTVSPIDISLSRNSF...PEGFIFGAGSSAYQIEGA
Vradiata_BGlul2         LIALLSSLITV...TESV...ALTPQID.LLNRNSF...PTGFIFGTASSAYQIEGA
Vradiata_BGlul2_IsX1    LIALLSSFIIV...TESI...ALTPQID.LLNRNSF...PTGFIFGTASSAYQIEGA
Csativus_BGlul2        LPLVSLLS...ILAVVSASSRDDGANISRSF...PTGFIFGTASSAYQIEGA
Psomniferum_BGlul2     FLVIQIIVAL...VSLVHFTEAVDNPPEQFNRSCT...PAGTTFCTASSAYQIEGA
Cquinoa_BGlul2         LLVLVLFMLGH...SNGAPEIDVIRADYGIGALNRSSF...PAGFVFGSASSAYQIEGA
Humbratica_BGlul2      LFLWAF...LVTSSKAVTPTKVTDPSEFSRKT...PAGFVFGTASSAYQIEGA
Ppersica_BGlul2         VLLLTGFA...LTSSKAAFVPSHYDTAF...PAGFIFGTASSAYQIEGA
Hbrasiliensis_BGlul2_IsX2 .LLLV...LS...C.TSSVLATAPNYDTALLNRSSF...PAGFLFCTASSAYQIEGA
Jcurcas_BGlul2         LLLV...LG...SVTSNAVSVESRYDTSFNRSF...PVGF...PAGFVFGTASSAYQIEGA
Atequilana_ac2147_3     LPIACSLGGDATT...TVVKEPPEAVPASVVLGRSSF...PFGFTFGVASSAYQIEGA
Atequilana_ac2256_4     LPIACSLGGDATT...TVVKEPPEAVPASVVLGRSSF...PFGFTFGVASSAYQIEGA
Atequilana_F26G        AAVVCLVGGDGTK...SAVEKDLEA.LARQLGRSSF...PPDFAFGVASSAYQIEGA
Adeserti_F26G          PVVVC...SVVKEPEAAPASVVLGRSSF...PFGFTFGVASSAYQIEGA
Atequilana_ac2778_14    AVVVCVSGGDGTK...PTVVKEPEVAPASVVLGRSSF...PFGFAFGVASSAYQIEGA
Atequilana_ac2988_12    AVVVCVSGGDGTK...PTVVKEPEVAPASVVLGRSSF...PFGFAFGVASSAYQIEGA
Atequilana_ac3048_5     AVVVCVSGGDGTK...PTVVKEPEVAPASVVLGRSSF...PFGFAFGVASSAYQIEGA
Aofficinalis_BGlul2    AP...LCKKSSDGS...SRKNTKKG...MVI...GRKLF...PFGFIFGAASSAYQIEGG
Aofficinalisb_F26G     HPITCRI...GNIDDAQQTFFGPKSF...PFGFVFGAATSAAYQIEGG
Atequilana_ac2842_2    GPVTCRI...GKMDEV...RKNF...PFGFTFGAASSAYQIEGG
Aofficinalis_F26G     LR...ISSV...NETATATDPLK...VVLGRSSF...PLGFAFGTASSAYQIEGA
Pdactylifera_F26G_IsX3 .LNVRCI...RGGAAVVNDAVEAKPSVLLGRKSF...PFGFTFGAASSAYQIEGG
Pdactyliferab_F26G_IsX2 .LNVRCI...RGGAAVVNDAVEAKPSVLLGRKSF...PFGFTFGAASSAYQIEGG
Cspeciosus_F26G       VPPV...DGSVGFAGSSTEQETAVESATPTAVPSKV...PFGFIFGAASSAYQIEGA
Macuminatamalaccensisb_F26G .RPPRAAVD...GTALGKLETIPTAVPAKV...PGRGFVFGAASSAYQIEGA
Macuminatamalaccensis_F26G .SPI...LCSV...QNGNVAVKPPATLPPH...PDDFAFGAASSAYQIEGA
Pdactylifera_F26G     LPIVRS...NGNV.AVVEAPEEVP...PFGFAFGVASSAYQIEGA
Pdactylifera_F26G_IsX2 .EPPVELP...QKKR.KRSEPPTGVP...PFGFVFGAATSAAYQIEGA
Pdactylifera_F26G_IsX1 .EPPVELP...QKKR.KRSEPPTGVP...PFGFVFGAATSAAYQIEGA

```

	70	80	90	100	110	120																																																						
Ppersica_BGLu12_IsX2	A	N	I	D	G	R	G	P	S	V	W	D	N	F	T	H	E	H	E	P	K	I	D	G	S	N	G	D	V	A	I	D	Y	H	R	Y	K	E	D	V	A	I	M	K	D	M	G	L	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S		
Pmiliaceum_BGLu24	V	R	E	G	G	R	G	P	S	I	W	D	T	Y	T	H	T	H	P	E	K	I	A	N	G	S	N	G	D	I	A	I	D	S	Y	H	R	Y	Q	E	D	V	K	I	M	K	H	I	G	F	N	A	Y	R	F	S	I	S	W	T
Gsoja_BGLu24	A	K	E	G	G	R	E	P	S	V	W	D	T	F	T	H	N	Y	P	E	K	I	M	D	R	S	N	G	D	V	A	I	D	S	Y	H	H	Y	K	E	D	V	G	M	M	K	D	M	N	L	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S
Vradiata_BGLu12	A	N	E	G	R	G	P	S	I	W	D	T	F	T	H	K	Y	P	E	K	I	E	D	R	S	N	G	D	V	A	V	D	S	Y	H	R	Y	K	E	D	V	I	M	K	M	N	L	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S			
Vradiata_BGLu12_IsX1	A	N	E	G	R	G	P	S	I	W	D	T	F	T	H	K	Y	P	E	K	I	E	D	R	S	N	G	D	V	A	V	D	S	Y	H	R	Y	K	E	D	V	I	M	K	M	N	L	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S			
Csativus_BGLu12	A	K	E	G	G	R	G	P	S	I	W	D	T	F	V	E	K	H	A	D	Q	V	A	D	G	S	N	G	N	V	A	I	D	S	Y	H	R	Y	K	E	D	V	K	I	M	K	E	M	G	L	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S
Psomniferum_BGLu12	A	S	K	D	G	R	G	P	S	I	W	D	T	F	T	H	K	F	P	E	K	I	L	D	G	S	N	G	D	V	A	V	D	S	Y	H	Q	Y	K	E	D	V	K	I	M	Q	E	M	G	L	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S
Cquinoa_BGLu12	A	H	L	D	G	K	G	L	S	I	W	D	T	F	T	H	K	F	P	D	K	I	K	D	R	S	N	G	D	V	A	I	D	S	Y	H	R	Y	K	E	D	V	K	I	L	Q	M	G	L	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S	
Humbratica_BGLu12	A	K	E	G	G	R	G	P	S	I	W	D	T	F	T	H	K	Y	P	E	K	I	A	D	G	S	N	G	D	V	A	I	D	S	Y	H	R	Y	K	E	D	V	G	I	M	K	E	M	G	L	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S
Ppersica_BGLu12	A	K	E	D	G	R	G	P	S	I	W	D	T	F	T	H	K	Y	P	E	K	I	K	D	G	S	N	G	D	V	A	N	D	E	Y	H	R	Y	K	E	D	V	G	I	M	K	N	M	G	L	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S
Hbrasiliensis_BGLu12_IsX2	A	N	E	D	G	R	G	P	S	I	W	D	T	Y	T	H	R	Y	P	E	K	I	K	D	G	S	N	G	D	V	A	I	D	A	Y	H	R	Y	K	E	D	V	G	I	M	K	E	M	G	L	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S
Jcurcas_BGLu12	A	N	E	G	G	R	G	P	S	I	W	D	T	Y	T	H	R	Y	P	E	K	I	K	D	G	S	N	G	D	V	A	I	D	A	Y	H	R	Y	K	E	D	V	G	I	M	K	E	M	G	L	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S
Atequilana_ac2147_3	W	N	E	D	G	R	G	P	S	I	W	D	T	Y	T	H	E	Q	P	H	K	I	K	D	R	S	N	G	D	V	A	T	D	S	Y	H	R	Y	E	E	D	I	E	R	L	K	E	L	G	V	D	S	Y	R	F	S	I	S	W	S
Atequilana_ac2256_4	W	N	E	D	G	R	G	P	S	I	W	D	T	Y	T	H	E	Q	P	H	K	I	K	D	R	S	N	G	D	V	A	T	D	S	Y	H	R	Y	E	E	D	I	E	R	L	K	E	L	G	V	D	S	Y	R	F	S	I	S	W	S
Atequilana_F26G	W	N	K	D	G	R	G	P	S	I	W	D	T	F	T	H	K	Q	P	H	K	I	K	D	G	S	N	G	D	V	A	T	D	S	Y	H	R	Y	E	E	D	I	K	L	K	E	L	G	V	N	S	Y	R	F	S	I	S	W	S	
Adeserti_F26G	W	N	V	D	G	K	G	P	S	I	W	D	T	F	T	H	E	Q	P	H	K	I	K	D	G	S	N	G	D	V	A	T	D	S	Y	H	R	Y	E	E	D	I	E	L	K	E	L	G	V	D	S	Y	R	F	S	I	S	W	P	
Atequilana_ac2778_14	W	N	L	D	G	R	G	P	S	I	W	D	T	F	T	H	E	Q	P	H	K	I	K	D	G	S	N	G	D	V	A	T	D	S	Y	H	R	Y	E	E	D	I	E	L	K	E	L	G	V	D	S	Y	R	F	S	I	S	W	S	
Atequilana_ac2988_12	W	N	I	D	G	R	G	P	S	I	W	D	T	F	T	H	E	Q	P	H	K	I	K	D	G	S	N	G	D	V	A	T	D	S	Y	H	R	Y	E	E	D	I	E	L	K	E	L	G	V	D	S	Y	R	F	S	I	S	W	S	
Atequilana_ac3048_5	W	N	I	D	G	R	G	P	S	I	W	D	T	F	T	H	E	Q	P	H	K	I	K	D	G	S	N	G	D	V	A	T	D	S	Y	H	R	Y	E	E	D	I	E	L	K	E	L	G	V	D	S	Y	R	F	S	I	S	W	S	
Aofficinalis_BGLu12	A	N	E	G	G	R	G	P	S	I	W	D	T	F	S	H	D	H	P	E	K	I	A	D	G	S	T	G	I	A	C	D	S	Y	N	R	Y	K	E	D	V	K	L	L	K	D	A	G	M	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S	
Aofficinalisb_F26G	A	N	E	G	G	K	G	S	I	W	D	T	F	T	H	N	H	P	E	K	I	A	D	H	S	N	G	D	V	A	V	D	S	Y	H	R	Y	K	E	D	V	K	I	L	K	D	L	G	A	D	A	Y	R	F	S	I	A	W	S	
Atequilana_ac2842_2	V	E	E	R	.	.	G	P	N	I	W	D	T	F	T	H	T	Y	P	E	K	I	E	G	H	S	N	G	D	I	A	C	D	S	Y	H	R	Y	K	E	D	V	H	Q	L	K	H	M	G	M	D	A	Y	R	F	S	I	A	W	A
Aofficinalis_F26G	W	N	E	G	G	K	G	P	S	I	W	D	T	F	N	H	Q	Q	G	K	I	K	D	G	S	N	G	D	V	A	T	D	A	Y	H	K	Y	K	K	D	I	E	L	M	K	Q	M	G	V	D	S	Y	R	F	S	I	S	W	S	
Pdactylifera_F26G_IsX3	V	D	.	.	S	R	G	T	T	I	W	D	T	F	C	R	E	F	P	D	K	I	A	D	K	S	N	G	D	V	A	V	D	S	Y	N	R	Y	Q	E	D	V	K	L	L	K	D	M	G	L	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S
Pdactyliferab_F26G_IsX2	V	D	.	.	S	R	G	T	T	I	W	D	T	F	C	R	E	F	P	D	K	I	A	D	K	S	N	G	D	V	A	V	D	S	Y	N	R	Y	Q	E	D	V	K	L	L	K	D	M	G	L	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S
Cspiciosus_F26G	W	N	E	G	G	R	G	P	S	I	W	D	T	F	T	H	D	H	P	E	K	I	A	D	H	S	N	G	D	V	A	T	D	S	Y	K	K	Y	K	E	D	V	K	L	L	K	D	L	G	L	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S
Macuminatamalaccensisb_F26G	W	N	E	G	R	G	P	S	I	W	D	T	F	T	H	N	Q	P	E	K	I	Q	D	G	S	N	G	D	V	A	T	D	S	Y	N	K	Y	K	E	D	V	K	L	T	K	E	M	G	L	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S	
Macuminatamalaccensis_F26G	W	N	E	A	G	R	G	P	S	I	W	D	T	L	T	H	D	H	P	E	K	I	A	D	K	K	N	G	D	V	A	T	D	S	Y	R	R	Y	K	D	D	I	E	I	M	K	N	M	G	M	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S
Pdactylifera_F26G	W	N	E	G	G	R	E	P	S	I	W	D	T	F	T	H	E	Q	P	H	K	I	T	D	H	S	T	G	I	A	T	D	S	Y	H	R	Y	K	E	D	V	K	I	M	K	D	M	G	L	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S	
Pdactylifera_F26G_IsX2	W	N	E	G	G	K	G	P	S	I	W	D	T	F	T	H	N	N	K	D	K	I	Q	D	K	S	T	G	I	A	T	D	S	Y	H	R	F	K	E	D	V	K	I	M	K	D	I	G	M	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S	
Pdactylifera_F26G_IsX1	W	N	E	G	G	K	G	P	S	I	W	D	T	F	T	H	N	N	K	D	K	I	Q	D	K	S	T	G	I	A	T	D	S	Y	H	R	F	K	E	D	V	K	I	M	K	D	I	G	M	D	A	Y	R	F	S	I	S	W	S	

	130	140	150	160	170	180																																																				
Ppersica_BGLu12_IsX2	R	E	L	P	N	G	K	L	S	G	G	I	N	K	K	G	I	E	Y	N	L	T	N	E	L	L	R	N	G	I	E	P	V	T	L	F	H	W	D	V	P	O	A	L	V	D	E	Y	G	L	L	S	P	R	I	V		
Pmiliaceum_BGLu24	R	E	L	P	N	G	K	L	S	G	G	I	N	M	E	G	I	K	Y	D	N	L	I	N	K	L	I	S	E	G	V	E	P	V	T	L	F	H	W	D	S	P	O	A	L	E	Q	Y	G	G	F	L	S	Q	H	I	V	
Gsoja_BGLu24	R	E	L	P	K	G	K	L	S	G	G	I	N	O	E	G	I	N	N	L	I	N	E	L	V	A	N	G	I	O	P	V	T	L	F	H	W	D	P	O	A	L	E	D	E	Y	G	G	F	L	S	P	R	I	V			
Vradiata_BGLu12	R	E	L	P	N	G	K	L	S	G	G	V	N	O	E	G	I	D	Y	N	K	L	I	N	E	L	A	N	G	L	E	P	V	T	L	F	H	W	D	P	O	P	L	E	D	E	Y	G	G	F	L	S	P	R	I	V		
Vradiata_BGLu12_IsX1	R	E	L	P	N	C	T	V	S	G	G	I	N	O	E	G	I	D	Y	N	K	L	I	N	E	L	A	N	G	L	E	P	V	T	L	F	H	W	D	P	O	S	L	E	D	E	Y	G	G	F	L	S	P	R	I	V		
Csativus_BGLu12	R	E	L	P	N	C	S	L	S	G	G	I	N	O	E	G	I	N	N	L	I	N	E	L	D	E	L	I	S	K	G	L	T	P	V	T	L	F	H	W	D	P	O	A	L	E	D	E	Y	G	G	F	L	S	N	R	I	A
Psomniferum_BGLu12	R	E	L	P	T	C	K	L	S	G	G	V	N	K	E	G	I	K	Y	N	N	L	I	N	E	L	L	S	K	G	V	O	P	V	T	L	F	H	W	D	P	O	G	L	E	D	A	Y	G	G	F	L	S	P	H	I	V	
Cquinoa_BGLu12	R	E	L	P	Y																																																					

	190	200	210	220	230	240
			*			
Ppersica_BGLu12_IsX2	DDFKAYADTCYK	EFGRVVKHWIT	NEPWTISNHCY	TIGIHAPGRCS	DWY...NQNC	LGGD
Pmiliaceum_BGLu24	EDFHDIANTCF	REFGRVKNWIT	NEPWSFSVPGY	ASGILAPGRCS	SSWK...NSG	CSIGD
Gsoja_BGLu24	KDFRDYAEICF	REFGRVVKYVIT	NEPWSYSQNGY	ANGRMAPGRCS	AWM...NLN	CTGGD
Vradiata_BGLu12	KDFQDYADTCF	REFGRVKKWIT	NEPWTLSNHCY	ALGAKAPGRCS	SSW...SPK	CNGGD
Vradiata_BGLu12_IsX1	KDFQDYAEICF	REFGRVKKWIT	NEPLTLSQECY	TLGIIYAPGRCS	SWL...NPS	CNGGD
Csativus_BGLu12	EDFRDYAGVCF	REFGRVVKHWIT	NEPWSYAADGY	ATGDPAPGRCS	PEI...AAN	CNGGD
Psomniferum_BGLu12	DDFKDYAEICY	KEFGRVVKHWIT	NEPWTFSNGCY	ALGNFAPGRCS	KYV...DPN	CTAGH
Cquinoa_BGLu12	DDFRDYANVCF	KEFGRVVKHWIT	NEPWTYSNGCY	AYGILAPGRCS	KWV...QLN	CTGGD
Humbratica_BGLu12	DDFRDYANVCF	KEFGRVVKHWIT	NEPWSYSSG	YASGFLAPGRCS	AWQ...KLN	CTGGD
Ppersica_BGLu12	NHFDQYAEICM	REFGRVVKHWIT	NEPWTYSNGCY	ASASTAPGRCS	DWQ...NLN	CTGGD
Hbrasiliensis_BGLu12_IsX2	DDFRDYAEICY	KNFGDRVKHWIT	NEPWSYSNGCY	TVGLLAPGRCS	SSW...QLN	CTGGD
Jcurcas_BGLu12	KDFEYAGICF	ENFGDRVKHWIT	NEPWSLSSG	YALGILAPGRCS	DWQ...RLN	CTGGD
Atequilana_ac2147_3	DDFVEFARICY	REFGRVVKHWIT	NEPWSFSSM	GYCLGRHAPGRCS	CTPDLFPYPET	CPAX.
Atequilana_ac2256_4	DDFVEFARICY	KEFGRVVKSWIT	NEPWSFSSM	GYCLGRHAPGRCS	CTPDLFPYPET	CPAGD
Atequilana_F26G	DDFVEFAKICY	KEFGRVVKHWIT	NEPWTFSVCGY	CLGKHAPGRCS	CTPSLFKDSES	CPAGD
Adeserti_F26G	DDFVEFAKICM	KEFGRVVKHWIT	NEPWTFSVCGY	CLGKHAPGRCS	CTPSLFKDSES	CPAGD
Atequilana_ac2778_14	DYFVEFAKICM	KEFGRVVKHWIT	NEPWTFSVCGY	SLGRHAPGRCS	CTPSLFKDSES	CPAGD
Atequilana_ac2988_12	DDFVEFAKICM	KEFGRVVKHWIT	NEPWTFSVCGY	SLGRHAPGRCS	CTPSLFKDSES	CPAGD
Atequilana_ac3048_5	DDFVEFAKICM	KEFGRVVKHWIT	NEPWTFSVCGY	SLGRHAPGRCS	CTPSLFKDSES	CPAGD
Aofficinalis_BGLu12	DDFKDFSEICM	YEFGRVVKHWIT	NEPWTFSVCGY	DTGSFAPGRCS	KSL...GCL	AGD
Aofficinalisb_F26G	DDFKDYCEVCF	KEFGRVVKHWIT	NEPWSFSTI	GYGLYHAPGRCS	QDL...G	QSGD
Atequilana_ac2842_2	QNFKEYCEVCF	KEFGRVVKHWIT	NEPWSFSTI	GYGLYHAPGRCS	QDL...G	QSGD
Aofficinalis_F26G	DDFKDYARVCF	YEFGRVVKHWIT	NEPWSFSTI	GYGLYHAPGRCS	QDL...G	QSGD
Pdactylifera_F26G_IsX3	DDFKDYVEICM	YEFGRVVKHWIT	NEPWTFSVCGY	GLTHAPGRCS	SEVL...G	CPVGD
Pdactyliferab_F26G_IsX2	DDFKDYVEICM	YEFGRVVKHWIT	NEPWTFSVCGY	GLTHAPGRCS	SEVL...G	CPVGD
Cspeciosus_F26G	NDFKDYADICF	KEFGRVVKHWIT	NEPWSLSTM	GYAFGRHAPGRCS	TWY...G	CPAGD
Macuminatamalaccensisb_F26G	NDFKDFASICF	EFGDRVVKHWIT	NEPWSFSSM	GYTFGRHAPGRCS	SWF...G	CTVGD
Macuminatamalaccensis_F26G	NDFKNFASVCF	QKFGDRVVKHWIT	NEPWSFSSM	GYSLGKHAPGRCS	QLL...G	CPVGD
Pdactylifera_F26G	HDFKDFANICF	EFGDRVVKHWIT	NEPWSFSSM	GYSLGSHAPGRCS	EFL...G	CPVGD
Pdactylifera_F26G_IsX2	NDFKDFANICF	EFGDRVVKHWIT	NEPWSFSSM	GYSLGSHAPGRCS	EFL...G	CPVGD
Pdactylifera_F26G_IsX1	NDFKDFANICF	EFGDRVVKHWIT	NEPWSFSSM	GYSLGSHAPGRCS	EFL...G	CPVGD

	250	260	270	280	290	300
Ppersica_BGLu12_IsX2	SGIEPYLVTHY	LLAHAAVKLYR	EKYOAYQNGV	TGITVVS	HWFEPASE	SQQDKDAAFQA
Pmiliaceum_BGLu24	SGKEPYIVAHN	LLAHAAVQVYR	DKYQKQK	IGITLVS	NWMIPI	SNSKDKDAVKRA
Gsoja_BGLu24	SSTEPYLVTHH	LLAHATAVRVYK	TKYQASQSGV	IGITLVAN	WFLPLR	LDTKSDQKATERA
Vradiata_BGLu12	SGTEPYLATHH	LLAHAAVNVYK	TKYQRFQNGV	IGITLVS	TWYEP	SDSKLDRKAAERA
Vradiata_BGLu12_IsX1	SGIEPYLVAAH	LLAHAAVNVYK	TKYKRIQNGL	IGIALN	NFLWGV	PSENKLDREATER
Csativus_BGLu12	SGREPYTVASH	LLSHAAVNVYR	RKYQASQK	KGIGITLVS	NWMIPI	SDSKRDMDAVERG
Psomniferum_BGLu12	SGTEPYLTGHY	LLSHAAVHVYK	LKYQASQK	KGIGITLVS	HWMV	PFSNAKSDQHAAERA
Cquinoa_BGLu12	SSTEPYLVTHH	LLAHAAVDLYR	RKYQVQK	GVIGITLVS	WVPL	LFVQRHQFAMARS
Humbratica_BGLu12	SGTEPYLVGHY	LLAHAAVKLYR	QNYQATQK	GIIGITLVS	HWFV	PSNARHKKNAALRA
Ppersica_BGLu12	SATPEYLVAAH	LLSHAAVKLYR	DKYQASQK	GVIGITLVS	HWFV	PSKAKHKKNAALRS
Hbrasiliensis_BGLu12_IsX2	SATPEYIVAHN	LLAHAAVKMYK	MKYQASQK	GMIGITLVS	HWFV	PSNAKHNKNAAKRA
Jcurcas_BGLu12	SGTEPYITAHN	LLAHAAVKLYK	TKYQATQK	GIIGITLVS	NWV	PSKAKNQNAAKRA
Atequilana_ac2147_3
Atequilana_ac2256_4
Atequilana_F26G
Adeserti_F26G
Atequilana_ac2778_14	SSVPEYIVTHN	LLAHAKAARLYK	DHFQATQ	GGVIGITLVS	LWFM	PLTESPQDKDAATRS
Atequilana_ac2988_12	SSVPEYIVTHN	LLAHAKAARLYK	DHFQATQ	GGVIGITLVS	LWFM	PLTESPQDKDAATRS
Atequilana_ac3048_5	SSVPEYIVTHN	LLAHAKAARLYK	DHFQATQ	GGVIGITLVS	LWFM	PLTESPQDKDAATRS
Aofficinalis_BGLu12
Aofficinalisb_F26G	SAREPYMAHNL	LLAHAAVKLYR	EKFOATQ	KGEIGITLNT	QWIL	PFNSKDKIEAAERQ
Aofficinalisb_F26G	SLREPYTVSHN	LLAHAAVFRLYN	DKFDVQK	GEVIGISLIS	YWF	PSNCRPDYEAARIS
Atequilana_ac2842_2	SLTEPYIVAAH	LLAHAAFRLYQ	EEVQGX
Aofficinalis_F26G	SLTEPYIVAHN	LLAHAAALYR	HNFKAVQ	RGEIGITQIT	TFIP	PSNSHEDKAAARS
Pdactylifera_F26G_IsX3	STVEPYTVTHN	LLAHAARLYK	DKFOASQ	QGEVIGITLVS	CMWY	EPYDHLHMNDEAKARS
Pdactyliferab_F26G_IsX2	STVEPYTVTHN	LLAHAARLYK	DKFOASQ	QGEVIGITLVS	CMWY	EPYDHLHMNDEAKARS
Cspeciosus_F26G	SANEPYEVTHN	LLAHANAVKLYR	DNYKATQ	NGEIGITLVS	SLWY	EPYSKHEDVEAATRA
Macuminatamalaccensisb_F26G	SSTPEYIVTHN	LLAHAAVKLYK	KEFOATQ	KGEIGITLVS	MMWY	EPYSKSHDKEAANRA
Macuminatamalaccensis_F26G	SLKPEYIVTHN	LLAHAAATLYK	KEFRAIQ	GEVIGITLVS	MMWY	EPYTSHQDIEAANRA
Pdactylifera_F26G	SMTPEYIVAHN	LLAHAAARLYK	KEFOATQ	KGEIGISLVS	MWY	EPYSNFYQDREAANRS
Pdactylifera_F26G_IsX2	SMKPEYIVTHN	LLSHAAVARLYK	NQFOAEQ	QGEVIGITLVS	MMWY	EPYSKLYQDKEAANRA
Pdactylifera_F26G_IsX1	SMKPEYIVTHN	LLSHAAVARLYK	NQFOAEQ	QGEVIGITLVS	MMWY	EPYSKLYQDKEAANRA

	310	320	330	340	350	360										
Ppersica_BGlul2_IsX2	LDLFMY	GWFM	DPLTR	GDYPI	MRSL	ILGAR	LPNF	TEEQ	SKSL	SGSY	DI	GIN	YYS	AR	YAS	AY
Pmiliaceum_BGlul24	LEFMY	GWFM	DPLTK	GDYPL	SMKIL	VNNR	LRP	RFTKE	QSKAI	NGS	FDF	IGL	NYYT	AR	YIQ	NT
Gsoja_BGlul24	IDFMY	GWFD	DPLTS	GDYPK	SMRSL	VLR	TRLP	KFTA	EQSKL	LIG	SFDF	IGL	NYYT	TT	YAS	DA
Vradiata_BGlul2	MEFLF	GWFM	DPLTR	GDYPE	SMRSL	VKS	SRLP	KFTKE	QSKLL	INS	SFDF	IGL	NYYT	AN	FV	SDA
Vradiata_BGlul2_IsX1	VDFMF	GWFM	DPLTK	GDYPK	SMRLL	VKS	SRLP	KFTKN	QSRLL	INS	SFDF	IGL	NYYT	AR	YV	SDA
Csativus_BGlul2	LDLFMF	GWFM	DPLTQ	GDYPL	SMKAL	VDR	DRLP	KFTKE	QSKMV	KGS	SFDF	IGL	NYYT	TN	YAR	SL
Psomniferum_BGlul2	LDLFMY	GWFM	DPLTF	GDYPL	SMQSL	VGD	DRLP	KFNKE	ESDMV	KGS	SFDF	IGL	NYYT	GN	YAE	HV
Cquinoa_BGlul2	LDLFMF	GWFM	DPLTK	GEYPT	HMQSL	VKV	VRLP	KFSAE	QSRMV	NGS	SFDF	IGL	NYYT	AN	YAA	YS
Humbratica_BGlul2	LDLFMF	GWFM	DPLTI	GSYPT	HMQSL	VGG	RLP	KFNKE	QSEML	KGS	SFDF	IGL	NYYT	AN	YAA	YS
Ppersica_BGlul2	LDLFMF	GWFM	EPLTS	GDYPH	SMRSL	VGN	RLP	KFTKE	QSKAV	MGS	SFDF	IGL	NYYT	AY	YAT	YA
Hbrasiliensis_BGlul2_IsX2	LDLFMF	GWFM	DPLIY	GDYPH	ALRSL	VGN	RLP	KFSAE	QAKMV	KGS	IDF	IGL	NYYT	AN	FA	AYL
Jcurcas_BGlul2	LDLFMF	GWFM	EPLTY	GDYPT	HLRSL	VGN	RLP	KFTKE	QSEML	KGS	IDF	IGL	NYYT	AN	YAA	YV
Atequilana_aC2147_3
Atequilana_aC2256_4	LEFMY	GWFM	DPLVST	GDYPT	SMKAL	VKER	RLP	SFTDE	EKDM	LKDG	SYDF	IGL	NYYT	SR	YAT	SI
Atequilana_F26G	LEFMY	GWFM	DPLTT	GDYPT	SMRAI	VKER	RLP	YFNE	EKDM	LKDG	SYDF	IGL	NYYT	SR	YV	TP
Adeserti_F26G	LEFMY	GWFM	DPLTT	GDYPT	SMRAI	VKER	RLP	YFNE	EKDM	LKDG	SYDF	IGL	NYYT	SR	YV	TP
Atequilana_aC2778_14	LQFML	GWFM	DPLTT	GDYPT	SMRAI	VKER	RLP	YFSNE	EKDM	LKDG	SYDF	IGL	NYYT	SR	YV	TP
Atequilana_aC2988_12	LEFMY	GWFM	DPLTT	GDYPT	SMRAI	VKER	RLP	YFNE	EKDM	LKDG	SYDF	IGL	NYYT	SR	YV	TP
Atequilana_aC3048_5
Aofficinalis_BGlul2	LDFA	YGWY	LDPLVH	GDYPT	MKAIV	KDR	LP	SFTDE	EESN	MIK	GSY	DF	IGL	NY	TA	YSL
Aofficinalisb_F26G	LDLFM	GWYME	PLAF	GDYPT	IMRAV	KDR	LP	YFTE	EETE	IVK	SYD	F	IGV	NY	TR	YARN
Atequilana_aC2842_2
Aofficinalis_F26G	IDFML	GWFM	DPLVNV	GDYPT	IMRLI	VGD	DRLP	SFTK	KESE	MIK	GSY	DFM	G	L	NY	TA
Pdactylifera_F26G_IsX3	LDFML	AWYMD	PLVH	GDYPT	FNMR	AIV	RDRLP	YFTNE	EEST	MIK	GSY	DF	IGL	NY	TA	YAR
Pdactyliferab_F26G_IsX2	LDFML	AWYMD	PLVH	GDYPT	FNMR	AIV	RDRLP	YFTDE	EEST	MIK	GSY	DF	IGL	NY	TA	YAR
Cspeciosus_F26G	LDLFMF	GWYMD	PLVNV	GDYPT	IMRAL	VDR	DRLP	FFTH	AESE	LIK	GSY	DF	IGL	NY	TA	YAR
Macuminatamalaccensisb_F26G	IEFML	GWYMD	PLVY	GDYPT	IMRAL	VDR	ERLP	HFTHT	QSEMI	KGS	SYD	F	IGL	NY	TA	YAR
Macuminatamalaccensis_F26G	IDFML	GWYMD	PLVY	GDYPT	IMRAL	VDR	ERLP	YFTNE	EAEMI	KGS	SYD	F	IGL	NY	TA	YAR
Pdactylifera_F26G	IEFML	GWYMD	PLVY	GDYPT	FNMR	ALV	QERLP	YFTA	ESEMI	KGS	SYD	F	IGL	NY	TA	YAR
Pdactylifera_F26G_IsX2	IEFML	GWYMD	PLVY	GDYPT	FNMR	ALV	GERLP	FFTS	EQSEMI	KE	SYD	F	IGL	NY	TA	YAR
Pdactylifera_F26G_IsX1	IEFML	GWYMD	PLVY	GDYPT	FNMR	ALV	GERLP	FFTS	EQSEMI	KE	SYD	F	IGL	NY	TA	YAR

	370	380	390	400	410	420										
Ppersica_BGlul2_IsX2	PKDYS	VTP	PPSYLT	DVH	VNT	ADLN	GVP	IGP	PRAAS	DWLY	VYV	KGLY	DLV	LYT	KEKY	NDP
Pmiliaceum_BGlul24	N..YS	NSG	NKSYNT	D	SLN	Q	T	VER	HGT	AIG	PKAGS	PWLY	IYV	KGIE	ELLLY	TKKY
Gsoja_BGlul24	P..HLS	NAR	PSYLT	D	SLV	TPA	VER	H	DG	KPI	G	IKIAS	DWLY	VYV	KGIR	DL
Vradiata_BGlul2	P..ELR	NVR	SSYMT	D	PLV	NYS	VLR	DG	KLI	G	ENVGS	DWLY	VYV	KGFR	EVLLY	TKKY
Vradiata_BGlul2_IsX1	P..ELR	NAR	SSFS	T	DAL	AN	F	YTR	Q	GKAI	GLN	IGT	DWLY	VYV	KGFR	DR
Csativus_BGlul2	P..IN	VI	AKDLYST	D	SCAN	R	Q	V	R	NG	GIP	IG	PRAAS	NWLY	VYV	KGIL
Psomniferum_BGlul2	MN..AN	NIN	INPSYIT	D	AQ	A	R	Q	T	D	R	NG	V	IG	LK	S
Cquinoa_BGlul2	P..DL	KQ	AKPSYIT	D	PIV	R	Q	T	V	K	R	NG	I	L	G	P
Humbratica_BGlul2	P..TL	SAG	KPSYLT	D	ARAN	N	L	S	TER	H	G	I	P	I	G	Q
Ppersica_BGlul2	P..QH	NS	VNASYLT	D	ARAN	N	Q	S	F	ER	N	G	V	P	I	G
Hbrasiliensis_BGlul2_IsX2	P..YS	NA	I	P	AS	YLT	D	ARAN	N	L	S	T	Q	R	N	G
Jcurcas_BGlul2	P..FS	NA	I	N	A	S	YLT	D	VRA	K	L	S	ERR	G	I	P
Atequilana_aC2147_3
Atequilana_aC2256_4	PY..S	E	G	F	V	P	L	A	I	L	D	S	F	T	E	Q
Atequilana_F26G	TY....	Q	P	P	A	I	L	D	S	F	T	E	Q	R	E	K
Adeserti_F26G	TC....	Q	P	P	A	I	L	D	S	F	T	E	Q	R	E	K
Atequilana_aC2778_14	TY....	Q	P	P	A	I	L	D	S	F	T	E	Q	R	E	K
Atequilana_aC2988_12	TY....	Q	P	P	A	I	L	D	S	F	T	E	Q	R	E	K
Atequilana_aC3048_5
Aofficinalis_BGlul2	PI..S	AN	S	A	D	S	Y	L	D	S	Y	V	L	K	A	E
Aofficinalisb_F26G	PS..S	Q	N	F	I	P	E	V	N	L	Q	E	A	Y	A	S
Atequilana_aC2842_2
Aofficinalis_F26G	PT..P	N	T	F	K	P	S	N	T	I	E	S	Y	A	T	Q
Pdactylifera_F26G_IsX3	SI..S	P	N	T	S	P	I	L	H	I	Q	E	A	Y	A	E
Pdactyliferab_F26G_IsX2	SI..S	P	D	D	S	P	I	L	H	I	Q	E	A	Y	A	E
Cspeciosus_F26G	PV..T	E	D	H	T	P	D	N	S	Y	F	D	S	Y	V	N
Macuminatamalaccensisb_F26G	PI..V	Q	D	H	S	P	G	S	S	Y	E	D	Q	Y	V	R
Macuminatamalaccensis_F26G	PM..S	P	N	Y	T	P	I	L	S	I	T	D	S	Y	A	E
Pdactylifera_F26G	PI..S	Q	E	S	S	P	S	L	I	Q	D	S	Y	A	E	Q
Pdactylifera_F26G_IsX2	SI..S	Q	N	Y	S	P	I	I	S	I	N	D	S	Y	A	E
Pdactylifera_F26G_IsX1	SI..S	Q	N	Y	S	P	I	I	S	I	N	D	S	Y	A	E

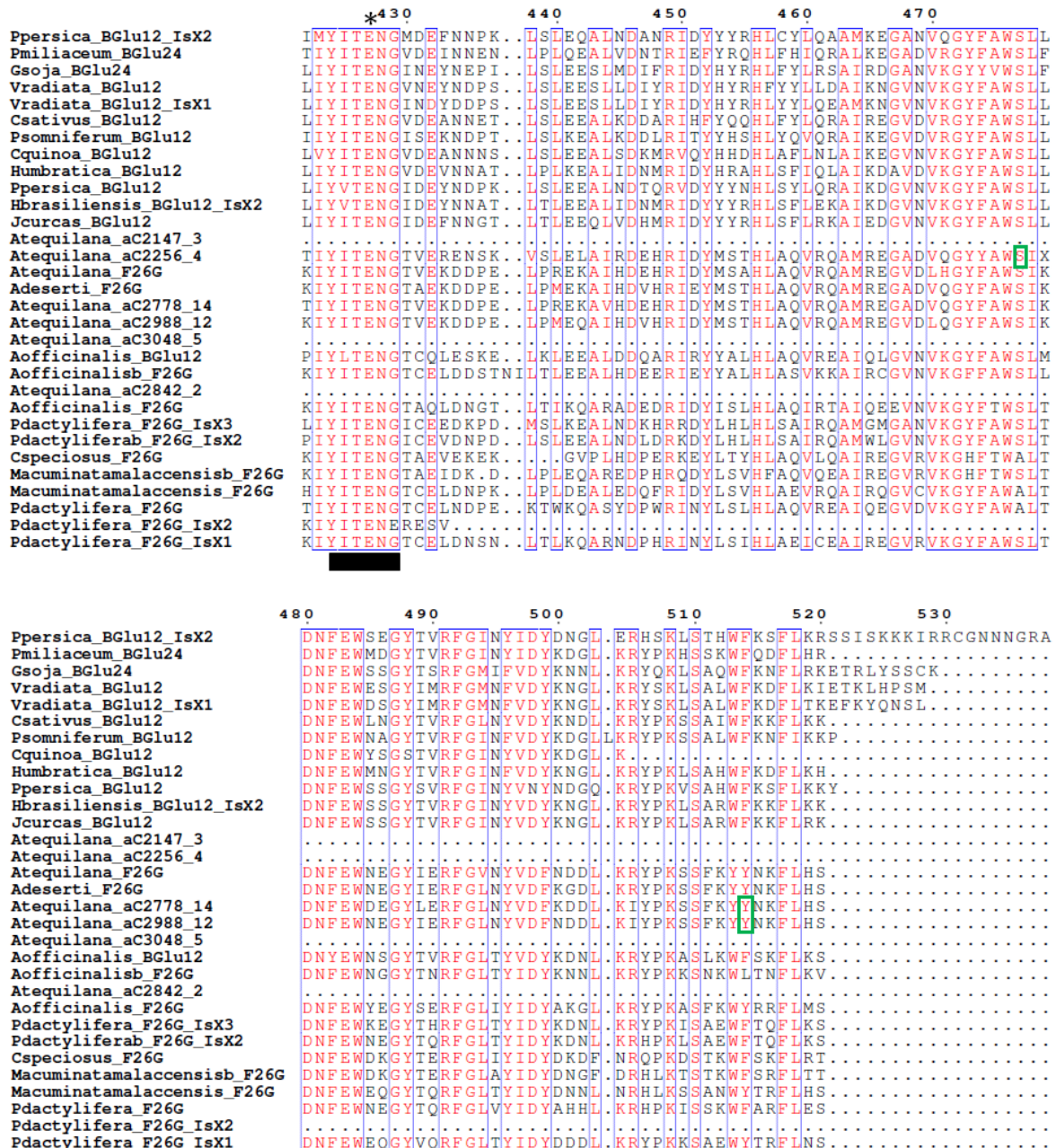


Figura 4. Alineamiento de secuencias de proteínas de los *contigs* de *A. tequilana* con la F26G de *C. speciosus* y secuencias de F26G de plantas cotiledóneas y β -glucosidasas de otras especies. En los recuadros verdes se muestra el sitio de inicio y termino del dominio de la familia I glucósido hidrolasa de cada *contig*. Recuadro en rojo muestra el péptido señal de los 6 *contigs* *A. tequilana*. Recuadro negro, indican las secuencias conservadas de los motivos entre .la familia I glucosido hidrolasa. El asterisco (negro) los dos acidos glutámicos clave para los sitios catalíticos. (ácido / base y nucleófilo).

El alineamiento permite verificar que los sitios de inicio de traducción (ATG) propuestos para cada *cluster* son reales debido a que las secuencias de los *contigs* del grupo II y III coinciden en la posición de ATG con *C. speciosus* a excepción del contig del grupo I, Además se infiere que las secuencias previas a dichos ATG's corresponden a UTR's notoriamente cortos en todos los *clusteres* (Figura 2).

Las secuencias previamente reportadas de *A. tequilana* y *A. deserti*, deducidas a partir de seqRNA, corresponden al contig aC2988_12 del Grupo III se observan algunas diferencias puntuales entre la secuencia de *A. tequilana* propuesta por Lledías *et al.*, (2017) y el cDNA aquí reportado.

Del análisis de BLASTP se observa que los seis *contigs* analizados son homólogos a proteínas identificadas como F26G de plantas monocotiledóneas y la F26G de *C. speciosus*, con un porcentaje de identidad alrededor de 60 %, bajo valor de expectancia y cobertura de casi la totalidad de la proteína (Tabla 5).

Los resultados de BLASTP muestran que los *contigs* presentan mayor similitud con secuencias provenientes de *Musa acuminata* Colla subsp *malaccensis* y *Phoenix dactylifera* L. que con F26G de *Asparagus officinalis* L. planta filogenéticamente más cercana a *Agave*, ya que ambos generes pertenecen a las Asparagaceas. Sin embargo, ninguna de esas proteínas ha sido funcionalmente estudiada, por lo que no se cuenta con demostración de su actividad como F26G.

Tabla 5. Identidad de *contigs* de *A. tequilana* identificados por homología mediante BLASTP

Grupo	Contig	Accession	Description	No. Hit	Query cover	E-value	% Ident	
I	aC2842_2	XP_020250593.1	furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase-like [<i>Asparagus officinalis</i>]	1	95%	1.00E-136	68%	
		Q42707.1	Furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase [<i>Cheilocostus speciosus</i>]	22	80%	9.00E-106	65%	
PREDICTED: furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase like [<i>Musa</i>								
II	aC2256_4	XP_009416645.1	<i>acuminata</i> subsp <i>malaccensis</i>]	1	98%	0	60%	
		Q42707.1	Furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase [<i>Cheilocostus speciosus</i>]	6	90%	0	60%	
	aC2147_3	XP_008807567.2	furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase-like [<i>Phoenix dactylifera</i>]	1	89%	1.00E-104	65%	
		Q42707.1	Furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase [<i>Cheilocostus speciosus</i>]	4	79%	1.00E-100	65%	
PREDICTED: furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase like [<i>Musa</i>								
III	aC2988_12	XP_009416645.1	<i>acuminata</i> subsp <i>malaccensis</i>]	1	91%	0	63%	
		Q42707.1	Furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase [<i>Cheilocostus speciosus</i>]	8	91%	0	59%	
	PREDICTED: furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase like [<i>Musa</i>							
	aC2778_14	XP_009416645.1	<i>acuminata</i> subsp <i>malaccensis</i>]	1	92%	0	62%	
Q42707.1		Furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase [<i>Cheilocostus speciosus</i>]	7	97%	0	57%		
aC3048_5		XP_008807567.2	furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase-like [<i>Phoenix dactylifera</i>]	1	93%	3.00E-104	63%	
		Q42707.1	Furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase [<i>Cheilocostus speciosus</i>]	5	81%	4.00E-97	65%	

Se muestra el hit 1 y el número de hit correspondiente a *C speciosus*, por BLASTP, así como su porcentaje de cobertura (Query cover), el valor de expectancia (E value) y porcentaje de identidad (% Ident) de cada contig pertenecientes a los tres grupos de F26G de *A. tequilana*.

De dicho análisis se obtuvo que todos los *cústers* contienen un dominio conservado homólogo a la familia I glucósido hidrolasa (Glycoside hydrolase family 1: GH1) (Figura 5), sin embargo, para los *contigs* aC2147_3, aC2842_2 y aC3048_5 el dominio está incompleto del lado 3´.

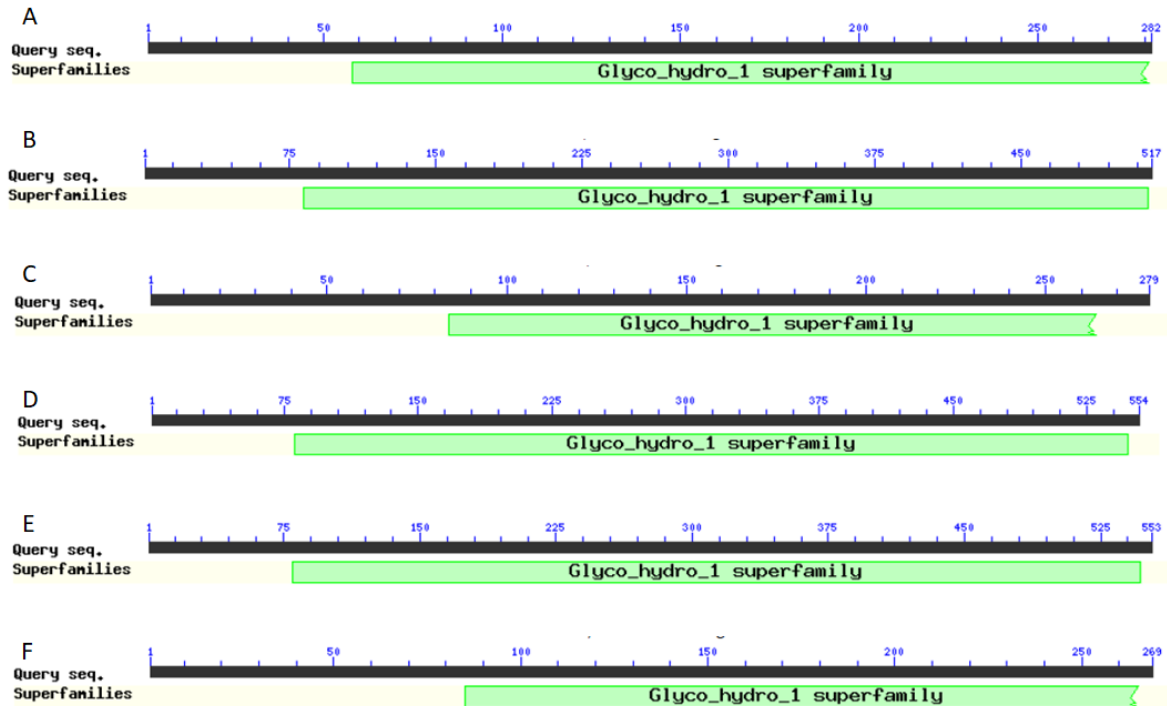


Figura 5. Dominios conservados de los *contigs* de *A. tequilana* similares familia I glucósido hidrolasa. A: aC2842_2 Grupo I; B y C: aC2147_3 y aC2256_4 Grupo II; D, E y F: aC2988_12, aC2778_14 y aC3048_5 Grupo III.

Adicionalmente se realizó un análisis con Phobius, la cual es una herramienta de predicción de la topología transmembrana y péptidos señal a partir de la secuencia de proteínas de los *clústers*. Con base a los resultados del análisis de Phobius, todos *contigs* contienen un péptido señal (Figura 6.) que cubre los primeros 25 aa del extremo amino terminal, el cual es similar al de *C. speciosus*, lo que sugiere que todos los *contigs* pueden ubicarse en el cloroplasto como la F26G de *Costus speciosus*.

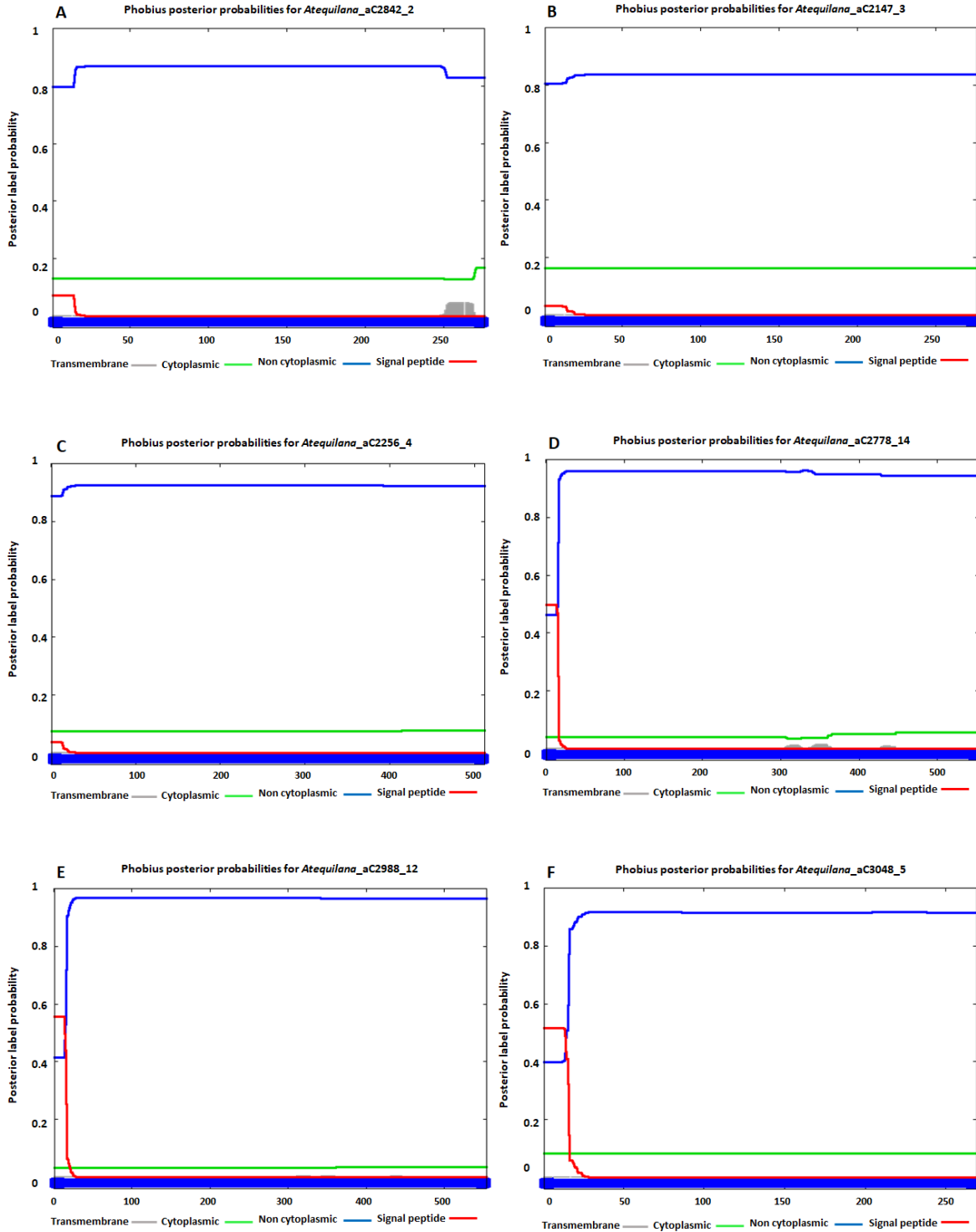


Figura 6. Análisis de las secuencias de proteínas con la herramienta Phobius, mostrando el péptido de señal de cada uno de los *contigs*. de *A. tequilana*

Se realizó una reconstrucción filogenética usando las secuencias homólogas de Beta-glucosidasas obtenidas de la base de datos no redundante de NCBI. Esta selección se realizó obteniendo aquellas secuencias anotadas como F26G o similares y aquellas anotadas como beta-glucosidasas que fueran similares con los *clusters* que se analizaron así como las secuencias reconstruidas bioinformáticamente de *A. tequilna* y *A. deserti*. Las secuencias se alinearon usando el programa Clustal Omega y a partir de este alineamiento se realizó el filograma en el programa MEGA 7.0 usando el método de Neighbor-Joining (Figura 7).

En el filograma se observa que las β -glucosidasas se agrupan entre ellas separándose de las secuencias identificadas como F26G. Las proteínas traducidas a partir de los seis *contigs*(cDNAs) de *Agave* se agrupan en el clado de proteínas que han sido propuestas como F26G en otras especies, difiriendo de otras β -glucosidasas. En ese mismo clado se encuentra la F26G de *C. speciosus*. Esta similitud y agrupamiento identifica a estas proteínas de *Agave* como posibles F26G.

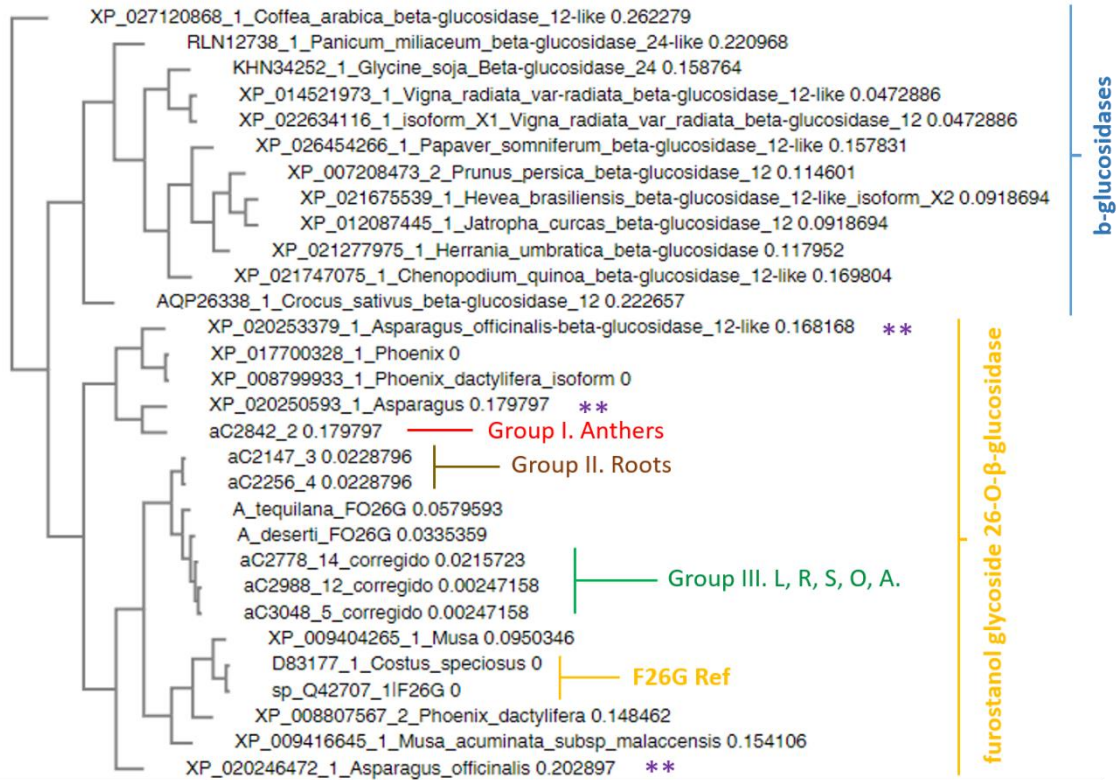


Figura 7 Filograma de F26G y β -glucosidasas. Se muestra el agrupamiento de los *contigs* de *A. tequilana* pertenecientes al Grupo I clonado solo en anteras (rojo), Grupo II clonado a partir de raíces (café) y Grupo III (verde) conformado por cDNAs clonados a partir de diversos tejidos; L: hojas, R: raíces, S: piñas, O: ovarios, A: anteras, respecto a la proteína de referencia F26G Ref proveniente de *C. speciosus* y comparando con el grupo de β -glucosidasas que no son identificadas como F26G. Los asteriscos ** señalan la posición de las secuencias de *Asparagus*, también perteneciente a la familia Asparagaceae. Se incluyeron secuencias de *A. tequilana* y *A. deserti* reportadas por Lledías *et al.*, 2017 como similares a un péptido de F26G aislado y secuenciado a partir de *A. attenuata*.

El filograma muestra que el contig del grupo I se agrupa en un clado separado de los otros grupos de *A. tequilana*. Los *contigs* del grupo II y III conforman un solo clado más cercano a la F26G de *C speciosus*, pero separado, en el cual no se incluyen secuencias de otras plantas

Este filograma confirma que las proteínas analizadas son filogenéticamente relacionadas con las F26G y se agrupan en tres distintos clados, dos de ellos más cercanos entre si y posiblemente específicos de *A tequilana* ya que no hay

secuencias de *Asparagus officinalis* agrupadas con este clado, la cual pertenece a la familia Asparagaceae igual que el *A. tequilana*.

En conjunto, todos los resultados anteriores sugieren que los tres Grupos de genes encontrados en *A. tequilana* codifican a la enzima F26G, por lo tanto, las secuencias completas de los tres tipos de genes aquí identificados serán depositadas en el Genbank como Atq-F26G_I, Atq-F26G_II y Atq-F26G_III.

5.4 Análisis de clonas conteniendo cDNAs de *A. tequilana* similares a furostanol glicósido 26-O- β glucosidasa

5.4.1 Verificación del tamaño de los cDNAs clonados

Para definir si las clonas del banco de cDNAs seleccionadas contienen el gen completo de furostanol 26 O- β glucosidasa se analizó el tamaño del cDNA insertado en dichas clonas y se comparó con el tamaño del CDS de la enzima F26G de *C. speciosus* cuyo tamaño esperado es de 1,900 pb, por lo que en los cDNAs de *A. tequilana* se espera un tamaño entre 1,900 a 2,200 pb considerando la presencia de los UTRs.

En la figura 9 se muestra el resultado de la digestión de cada clona con la enzima *BsrG* / la cual libera los fragmentos clonados del vector pDONR™221 conforme su mapa de digestión (Figura 8).

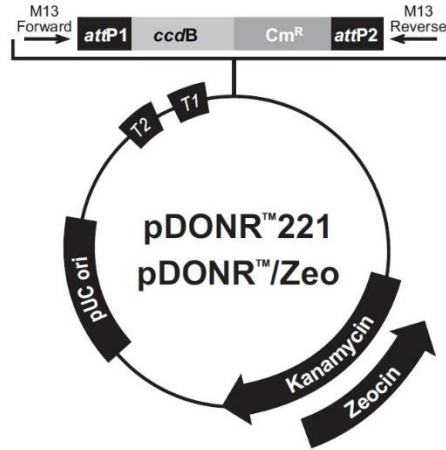


Figura 8. Mapa del vector de entrada pDONR™221, donde fueron clonados los cDNAs de *A. tequilana*.

En la Figura 9, se observa el fragmento liberado del vector de clonación el cual corresponde a 2,500 pb. Se observan tres patrones de corte entre las seis clonas de los tres grupos, sin embargo, dos de los fragmentos liberados son similares entre ellas, el primero de 1,100 pb es similar entre las clonas del *cluster* aC2256_4, aC2147, aC2778_14 y aC3048_5, el segundo fragmento de 800 pb similar entre las clonas del *cluster* a excepción de la clona del *cluster* aC2842. (Tabla 6).

Las cinco clonas del grupo II y III comparten un fragmento con tamaño similar de aproximadamente 800 pb. Las clonas flant015_e11 y flant019_e10 generan dos fragmentos de 450 y 650 pb aproximadamente que, sumados, coinciden con el fragmento de 1,100 pb de las clonas raraz002_g10 y raraz005_d09. En total, los cDNAs de las clonas del grupo II y III que en suma indican que el tamaño del inserto es de aproximadamente 1,900 pb coinciden con el tamaño esperado similar al de *C. speciosus*. También se observan los fragmentos liberados correspondientes a la clona flant008_b07, del Grupo I el cual tiene un patrón de corte distinto al resto de las clonas y contiene un cDNA de aproximadamente 1,500 pb. En la tabla 6 se resume el tamaño de los cDNAs insertados.

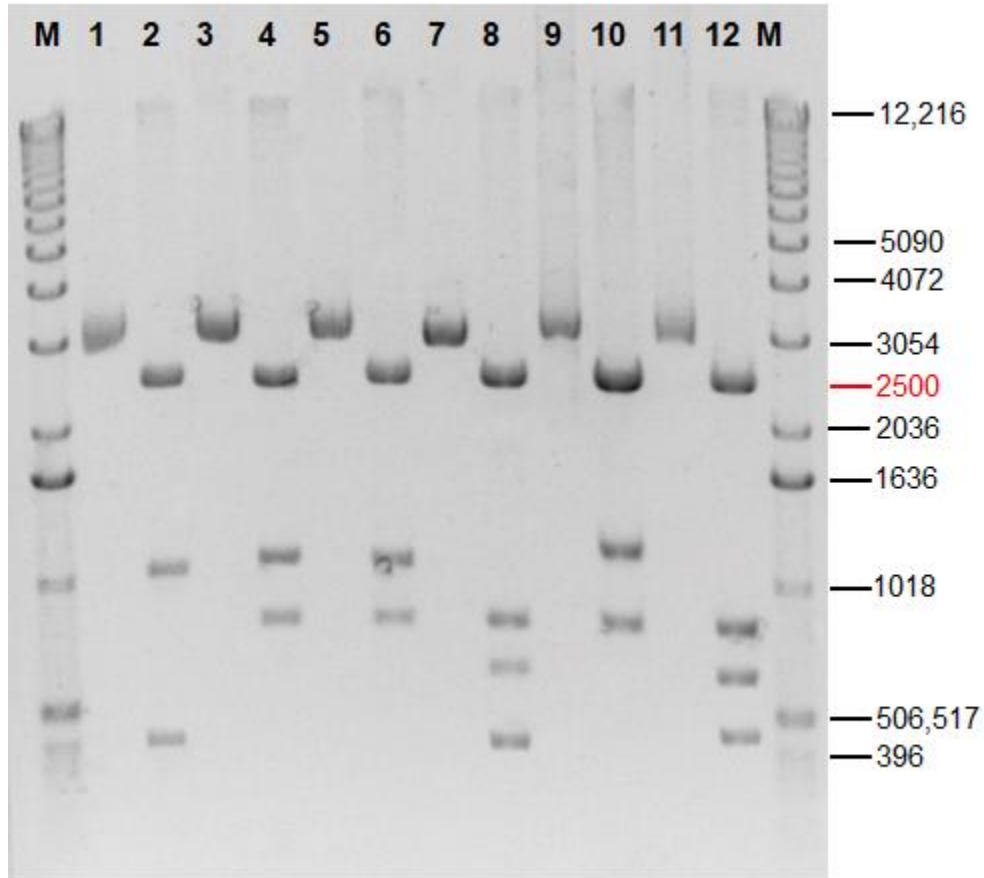


Figura 9. Verificación del tamaño del inserto mediante digestión con BsrG I de las clonas control que contienen el gen de F26G. Muestras 1 y 2: ajswflant008_b07*; 3 y 4: aamhraraz002_g10⁺; 5 y 6: aamhraraz005⁺_d09; 7 y 8: ajswflant015_e11*; 9 y 10: ajswflant013_a03*; 11 y 12: ajswflant019_e10*. 1,3,5,7,9,11 corresponden al ADN plasmídico sin digerir y digerido con la enzima BsrG I, respectivamente. * Clona Grupo I; ⁺Clonas Grupo II; ^{*}Clonas del Grupo III. M: marcador 1 Kb (Invitrogen)

Tabla 6. Tamaños de productos generados de la digestión con la enzima *BsrG I* del ADN plasmídico del vector pDONR™221conteniendo los cDNAs de *A. tequilana* similares a F26G.

Contig	Clona	Tamaño de corte (pb)	Producto generado
aC2842_2	flant008_b07	450, 1050	1,500
aC2256_4	raraz002_g10	800, 1,100	1,900
aC2147_3	raraz005_d09	800, 1,100	1,900
aC2988_12	flant015_e11	450, 650,820	1,900
aC2778_14	flant013_a03	800, 1,100	1,900
aC3048_5	flant019_e10	450, 650 800	1,900

5.5 Confirmación de identidad de las clonas mediante PCR y análisis de especificidad de oligos

Para confirmar la identidad de las clonas, determinar la especificidad de los oligos diseñados para amplificar su clona correspondiente y establecer las condiciones de PCR óptimas; se probaron varias temperaturas de alineamiento para probar los oligos diseñados para cada contig utilizando los DNA de plásmidos purificados a partir de las clonas seleccionadas. En todos los casos hubo amplificación (resultados no mostrados)). De las diversas temperaturas probadas se seleccionaron las más altas, para favorecer la especificidad de las reacciones, conforme lo indicado en la tabla 3.

En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos en la amplificación con PCR conforme las temperaturas de alineamiento indicadas en la tabla 3. Las clonas seleccionadas amplifican con los oligos diseñados para cada una de ellas, generando fragmentos del tamaño esperado en los tres casos, con lo cual se confirma que las clonas utilizadas contienen los cDNAs de interés.

Adicionalmente, se confirmó que los oligos son específicos al amplificar únicamente su correspondiente cDNA bajo las condiciones establecidas, por lo que son útiles para identificar de forma específica la presencia de cada uno de estos tres tipos de genes de *A. tequilana* (Tabla 3 y Figura 10).

Cabe mencionar que estos oligos generan un producto cuya curva de desnaturalización (curva melting) genera un solo pico en cada caso, con valores de 83.4 °C, 84 °C, y 63 °C, respectivamente, por lo que pueden ser utilizados para ensayos cuantitativos con RT-PCR tiempo real.

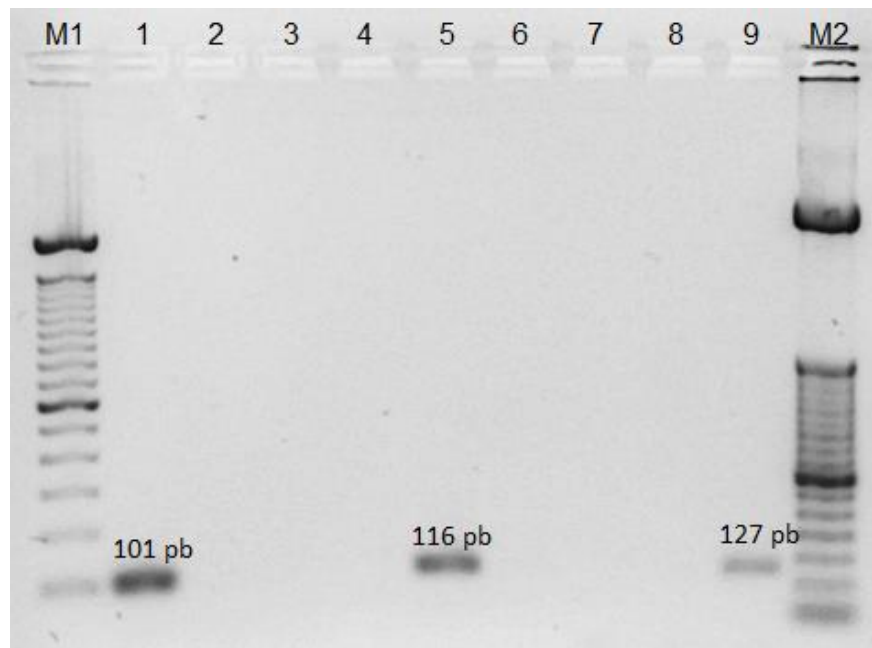


Figura 10. Amplificación de las clonas conteniendo los cDNAs de *A. tequilana* similares a F26G. Carriles: 1, 4 y 7: flant008_b07 del contig aC2842_2 Grupo I; 2, 5 y 8: raraz002_g10 del contig aC2256_4 Grupo II; 3, 6 Y 9: flant015_e11 del contig aC2988_12 Grupo III. 1, 4 y 7: amplificados con oligos dirigidos contra el contig aC2842_2, aC2256_4 y aC2988_12 respectivamente, M1: Marcador 100 pb, M2: Marcador 50 pb.

Los resultados hasta aquí obtenidos sugieren que los cDNAs analizados provienen de tres distintos genes o alelos codificantes de furostanol glicósido_{26-O-β}

glucosidasas de *A. tequilana*, uno de los cuáles codifica una proteína con mayor similitud a las F26G reportadas en otras plantas pero que solo se clonó a partir de anteras y otros dos tipos de genes o alelos que pudieran ser las F26G de *Agave* responsables de producir saponinas en otros tejidos como raíz y hojas. por lo que se decidió verificar el patrón de expresión de estos tres tipos de posibles f26g en diferentes tejidos de *agave*, y determinar si su expresión está correlacionada con la acumulación de saponinas.

5.6 Análisis de expresión de los genes de furostanol glicósido 26-O-β-glucosidasa en *A. tequilana*

Para confirmar el patrón de expresión de los genes de *A. tequilana* analizados, homólogos a F26G de *C speciosus*, se procedió a evaluar mediante RT-PCR su expresión en distintos tejidos, usando cDNA sintetizado a partir de ARNm de provenientes de hojas, piña y raíz de *A. tequilana* y anteras de *A. angustifolia*, y comparando contra *ACTINA*) como gen control de expresión constitutiva. Los resultados muestran que existe una expresión diferencial de los genes de *F26G* entre los tejidos analizados.

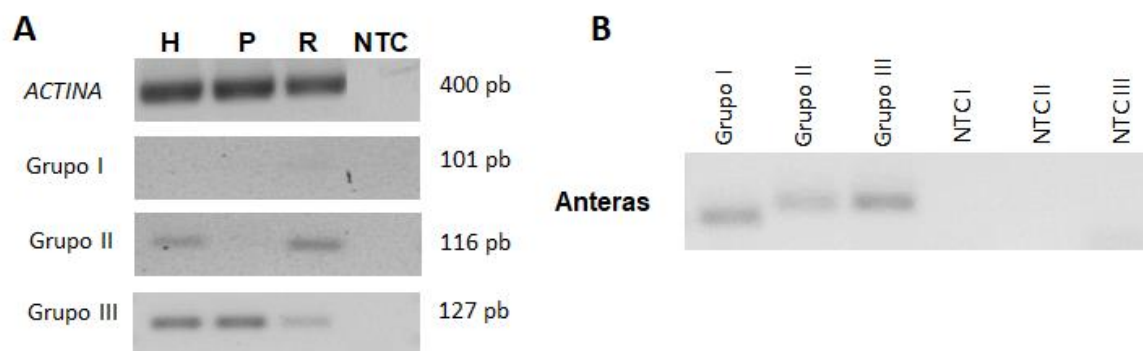


Figura 11. Expresión de genes homólogos a la enzima furostanol glicósido 26-O-β glucosidasa. en tejidos de *A. tequilana* y anteras de *A. angustifolia*. H: hoja, P: Piña, R: raíz aC2842_2: Grupo I; contig aC2256_4: Grupo II; contig aC2988_12: Grupo III. *ACTINA*: gen control

Para el gen aC2842_2 que representa al grupo I no se observó expresión en ninguno de los tejidos vegetativos evaluados de *A. tequilana*, posiblemente porque se expresa únicamente en anteras, tejido a partir del cual fue clonado. Para verificarlo, se evaluó su expresión en cDNA sintetizado a partir de ARNm de anteras de *A. angustifolia*. El resultado obtenido, muestra que este gen efectivamente se expresa en tejidos de anteras (Figura 11A)

Respecto al gen del contig ac2256_4, del Grupo II constituido con ESTs clonados exclusivamente de raíz, se confirma que se encuentra expresado en raíz, aunque también se expresa en hoja y en anteras. El gen representado por el contig aC2988_12, que corresponde al Grupo III, se expresa en todos los tejidos evaluados. Esto concuerda con el hecho de que los *contigs* de ese grupo están compuestos por cDNAs clonados a partir de distintos tejidos (Figura 12).

Los resultados anteriores demuestran que los genes analizados se expresan en general conforme lo esperado en *A. tequilana*, aunque algunos genes se detectan en también en otros tejidos, como el aC2256_4 clonado solo en raíz que también fue detectado en hoja y anteras.

5.7 Expresión de los genes de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa de *A. angustifolia* y su correlación con la producción de sapogeninas

Para determinar si la expresión de alguno(s) de los genes de furostanol glucósido 26-O- β -glucosidasa de *Agave* correlaciona con la producción de sapogeninas, y siendo no hay trabajos trabajos respecto al tipo y estructura de saponinas producidas en *A. tequilana*; se decidió evaluar la posible correlación entre la expresión de los genes y la acumulación de sapogeninas en diversos tejidos de *A. angustifolia* var. *costero*, colectados tanto en condiciones de sequía como en condiciones de lluvia.

5.7.1 Extracción de saponinas y cuantificación de sapogeninas a partir de tejidos vegetativos de *A. angustifolia*

Primeramente, se realizó una comparación de los pesos frescos de las muestras colectadas en función de la temporada del año colectadas. En la tabla 7 se indican los pesos frescos y secos obtenidos de cada tejido colectado para la extracción de saponinas y sapogeninas. La variación en peso de las muestras colectadas indica que las plantas acumulan mayor biomasa en la época de lluvia, observándose que tanto el peso fresco como el peso seco fue mayor en lluvia respecto a los tejidos colectados en sequía.

Tabla 7. Peso fresco y seco de tejidos de plantas de *A. angustifolia* colectadas en época de sequía o de lluvia.

Tejido	Colecta	No. planta	Peso fresco (kg)	Peso seco (kg)
Hoja	Sequía	1	1.132	0.082
		2	1.162	0.134
	Lluvia	3	3.380	0.796
		4	2.192	0.654
		5	3.144	0.692
Piña	Sequía	1	1.670	0.212
		2	2.524	0.406
	Lluvia	3	3.080	0.594
		4	3.592	0.556
		5	3.270	0.396
Raíz	Sequía	1	0.768	0.400
		2	0.568	0.288
	Lluvia	3	3.144	0.692
		4	3.270	0.396
		5	1.130	0.544

Para analizar la presencia de saponinas en los diversos tejidos de *A. angustifolia*, las saponinas y sapogeninas fueron extraídas a partir de los tejidos deshidratados con el método de extracción con Soxhlet.

Las sapogeninas constituyen la parte esteroidal (aglicona) de las saponinas hidrolizadas por el tratamiento hidrólisis ácida durante la extracción, y su cuantificación constituye una medida indirecta de la cantidad de saponinas presente.

5.7.2 Separación y cuantificación de sapogeninas de *A. angustifolia* con cromatografía en capa fina y cromatografía de gases

Para determinar cualitativamente la presencia de sapogeninas en los extractos hidrolizados de *A. angustifolia* se realizó una cromatografía en capa fina.

En la figura 13 se observa la presencia de tigogenina en los extractos de *A. angustifolia*, lo cual concuerda con lo reportado por López, *et al.*, (2007); así como la presencia un esteroles, el β -sitosterol compuesto que pertenece al grupo de los fitosteroles

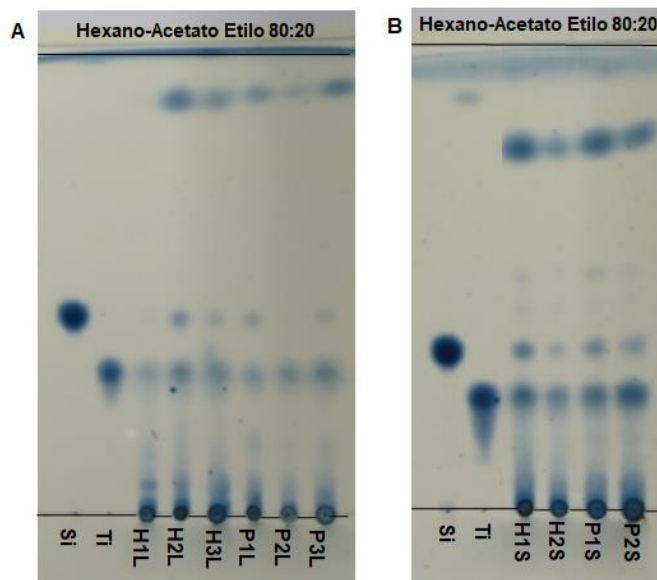


Figura 12. Cromatografía en capa fina de los extractos metanólicos de hojas y piñas de *A. angustifolia*. **A** de tejidos colectados en época de lluvia (L); **B**: tejidos de extractos colectados en sequía (S). H: Hoja, P: Piña, en las diferentes plantas. Si: β -sitosterol, Ti: tigogenina.

La cantidad de saponinas tipo espirostanol previamente reportadas en *A. angustifolia* fue cuantificada en los diversos tejidos mediante cromatografía de gases usando como estándar interno hecogenina.

En la figura 13, se observa el perfil cromatográfico de los extractos de *A. angustifolia*, mostrando los picos y tiempo de retención correspondientes a tigogenina y β -sitosterol, también se observa la señal del estándar interno.

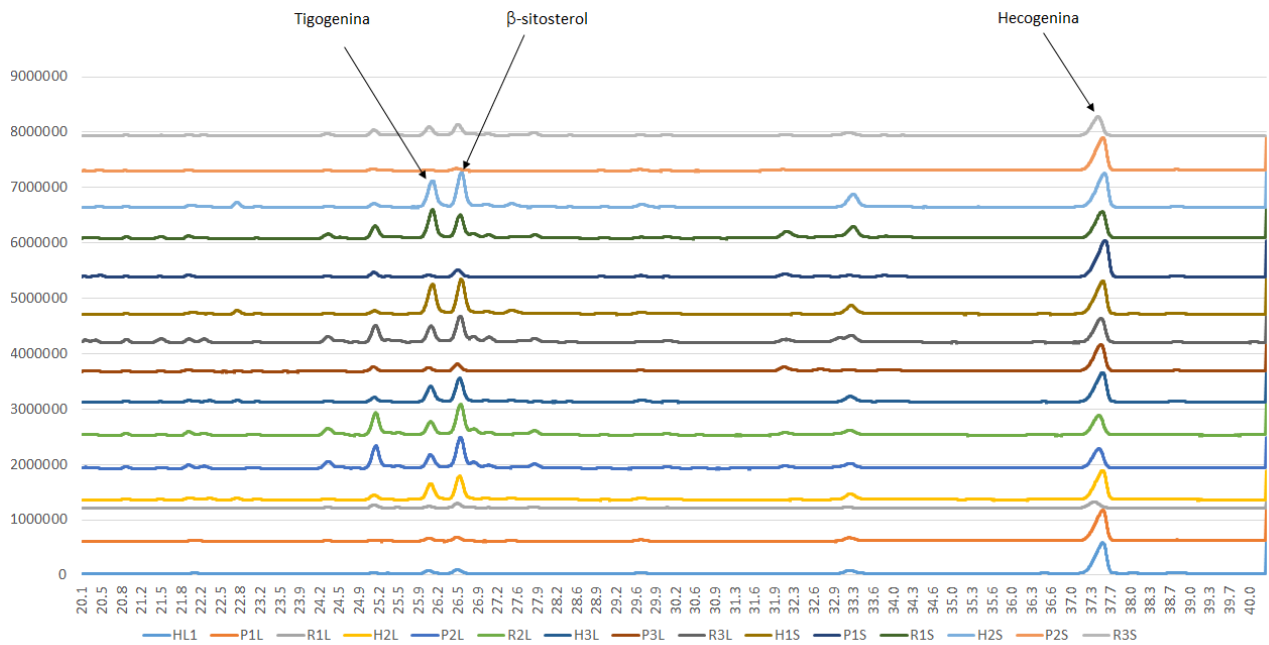


Figura 13. Perfil cromatográfico de los extractos sapogeninas de *A. angustifolia* con cromatografía de gases.

La figura 14 muestra los resultados obtenidos de la cuantificación de las sapogeninas en los tres tejidos colectados en lluvia o en sequía. Las hojas colectadas en la época de sequía tienen mayor cantidad tigogenina por gramo de tejido que el resto de los tejidos, incluyendo las hojas de dos plantas colectadas en época de lluvia. En segundo orden de abundancia, encontramos tigogenina en las raíces, donde muestra una cantidad similar entre las cinco plantas, independientemente de si fueron colectadas en lluvia o en sequía. En el caso de las piñas se observa que tiene la menor cantidad de tigogenina en las dos colectas, tanto lluvia como sequía

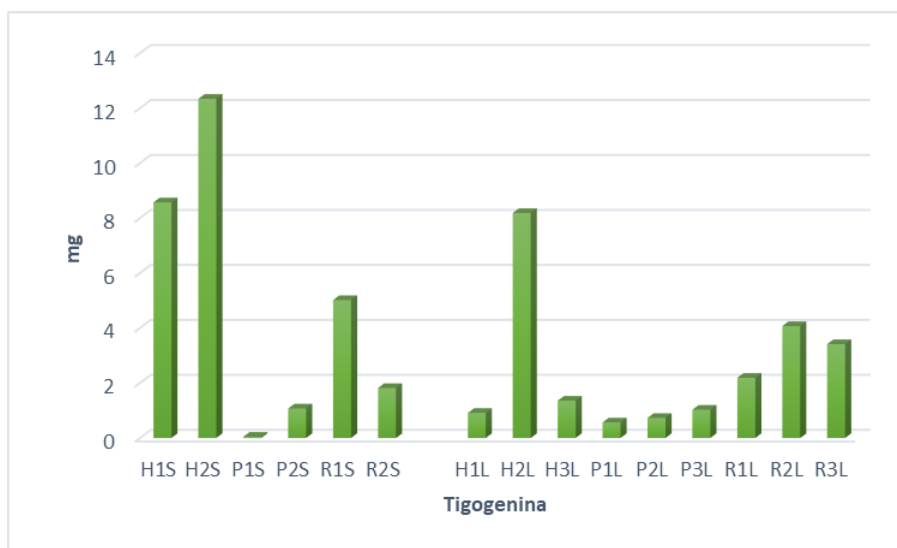


Figura 14. Cuantificación de tigogenina en tejidos de *A. angustifolia* de plantas colectadas en lluvia (L) y sequía (S). H: hoja, P: piña, R: raíz. Números: ejemplares por colecta.

Este análisis sugiere que las saponinas con aglicona tipo tigogenina se acumulan en las hojas de *A. angustifolia* durante la época de sequía, probablemente como una respuesta al estrés. La cuantificación de las saponinas nos permite determinar de forma indirecta de la cantidad de saponinas presentes en diversos tejidos de la planta, ya que experimentalmente lo que se cuantifica es la parte esteroidal sin la presencia del grupo glicosilado, debido a la hidrólisis que ocurre durante el proceso de extracción.

5.7.3 Evaluación de la actividad hemolítica de saponinas en *A. angustifolia*

Para verificar si la cantidad de saponinas observada en los diversos tejidos correlaciona con la actividad hemolítica directamente dependiente de la presencia de saponinas, se realizó un bioensayo de hemólisis con los extractos metanólicos conteniendo las saponinas sin hidrolizar.

En la figura 15, se observan los halos de hemólisis generados con los extractos de piña y hoja. Para los extractos de raíz, no se llevó a cabo el ensayo de actividad hemolítica ya que, en pruebas previas, se observó que los extractos de raíz

contienen un pigmento de color rojo, muy probablemente lignina, la cual se precipita dentro del pozo y evita la difusión del extracto hacia el medio.

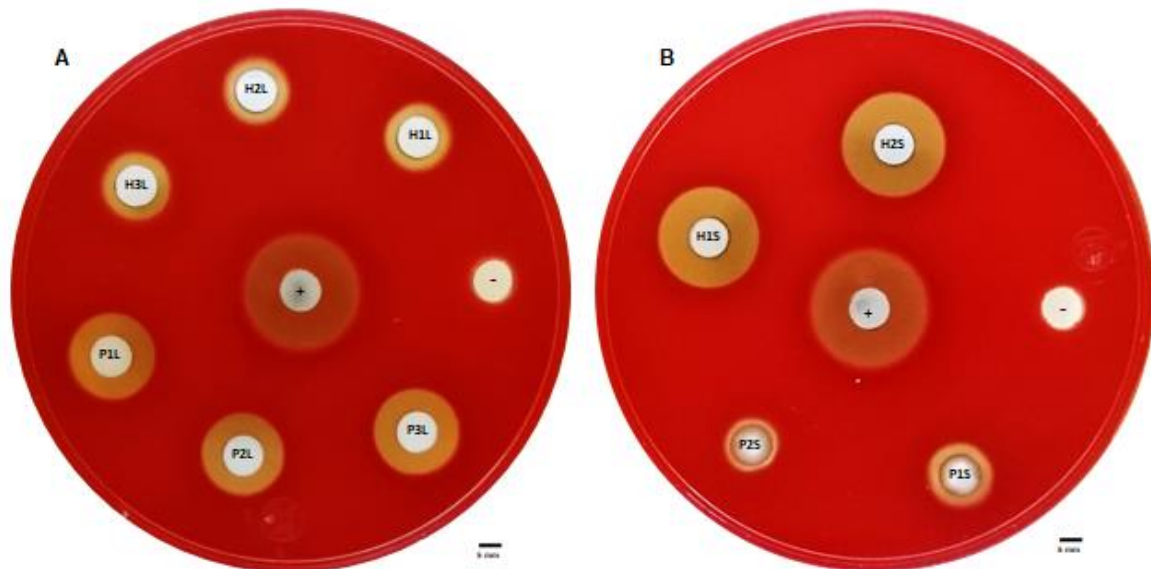


Figura 15. Ensayo de actividad hemolítica de los extractos de *A. angustifolia* de hojas y piñas colectadas en lluvia y sequía. Control positivo (+) Sakurososaponina al 0.25 %. Control negativo (-) metanol. H: hoja, P: piña, R: raíz, L: lluvia, S: sequía.

El ensayo revela la presencia de saponinas hemolíticas en los extractos de hoja y piña de *A. angustifolia*, en diferentes cantidades o con diferente efecto biológico, variando entre tejidos (hoja y piña) y entre condiciones de colecta (lluvia o sequía), mostrando mayor halo en hojas de sequía y piñas de lluvia.

Como ensayo semicuantitativo, se midió el halo de inhibición. En la figura 16 se observa que las hojas de plantas colectadas en la época de sequía poseen la mayor actividad hemolítica, mientras en plantas colectadas en lluvia la mayor actividad hemolítica se observa en piñas (Figura 15 y 16).

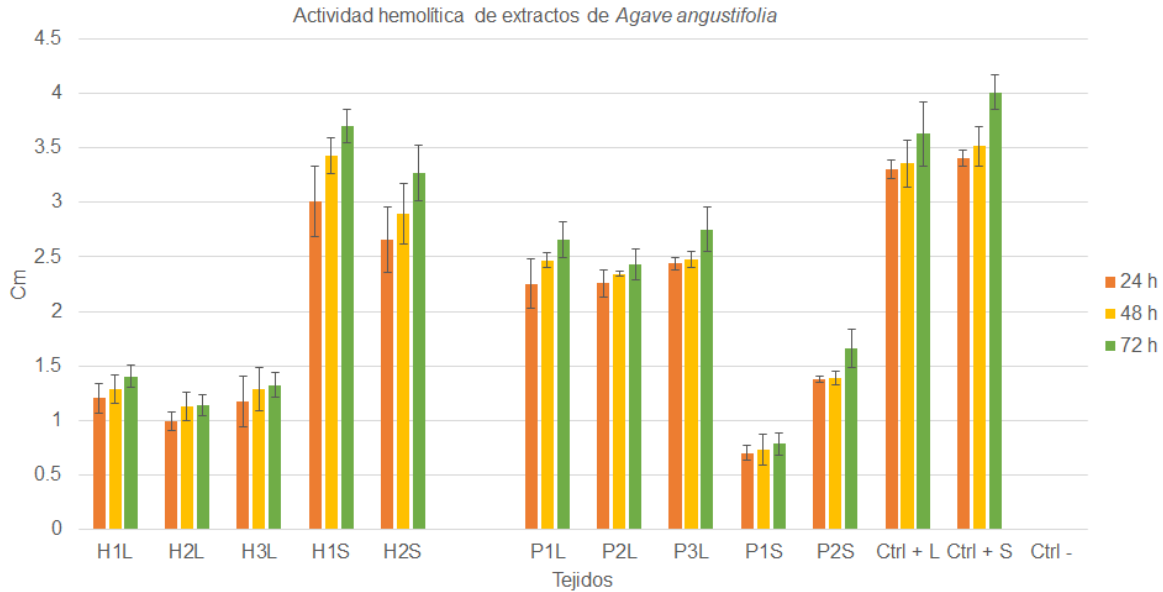


Figura 16. Halo de inhibición generado a las 24-72 hrs de extractos de hojas y piñas de *A. angustifolia* colectadas en lluvia y sequía. H: hoja; P: piña; L: lluvia, S: Sequía. Control positivo (+) Sakurososaponina al 0.25%. Control negativo (-) metanol.

Los resultados muestran que para el caso de las hojas colectadas en la época de sequía existe una correlación en el incremento de la actividad hemolítica y la cantidad de saponinas con respecto a las hojas colectadas en lluvia.

5.8 Análisis de expresión de genes homólogos a furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa en hojas de *A. angustifolia*

Para analizar si la expresión de alguno de los genes identificados en *A. tequilana* como potencialmente codificantes de la enzima furostanol 26-O- β glucosidasa está correlacionado con la cantidad de saponinas y la actividad hemolítica de las saponinas de *A. angustifolia*; el ARN total extraído de hojas colectadas en el periodo de lluvia y el de hojas colectadas en sequía, fue usado para la síntesis de cDNA y reacciones de RT-PCR con los oligos diseñados para cada grupo de genes; usando *ACTINA* como control de expresión constitutiva y un gen *CAB 2*

como gen de expresión afectada por el estrés. Los productos de PCR amplificados corresponden a los tamaños esperados tanto para los tres posibles genes F26G como para *ACTINA* y *CAB 2* (Figura 17).

Los resultados muestran que el nivel de expresión de *ACTINA* no varía entre las hojas colectadas en lluvia o sequía, como se esperaba. Sin embargo, la expresión del gen *CAB 2* de *Agave* sí se modifica por efecto de la sequía, expresándose en mayor cantidad en las hojas colectadas en esa época.

En el caso de los genes de interés, potencialmente codificantes de la F26G, los tres fueron detectados en las hojas de *A. angustifolia*, aún el gen del Grupo I del contig aC2842_2 que no mostró expresión en tejidos de hoja, piña y raíz en *A. tequilana*, aunque se expresa en menor proporción que los genes de Grupo II y Grupo III, sin embargo, no se detectó diferencia en los niveles de expresión entre los tejidos de hoja colectados en las dos épocas contrastantes.

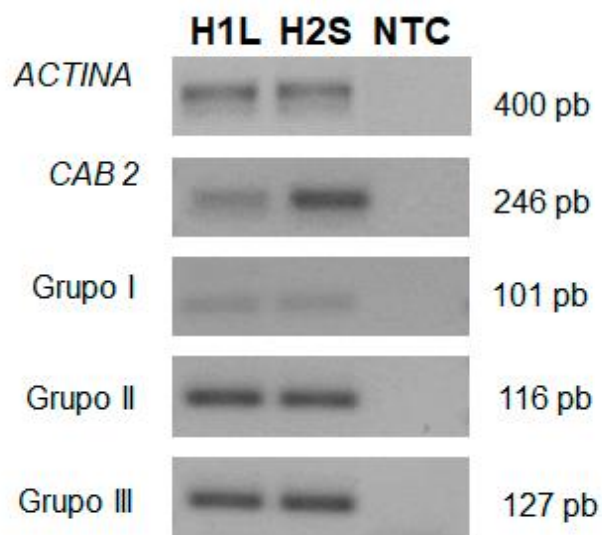


Figura 17. Análisis de expresión de genes putativamente codificantes de la enzima furostanol glucósido 26-O- β glucosidasa en *A. angustifolia*. Genes control: *ACTINA* y *CAB 2*. Se muestran los tamaños esperados de los fragmentos. H1L: hoja colecta lluvia, H2L: hoja colecta sequía.

Los resultados anteriores sugieren que los tres grupos de genes similares u homólogos a F26G, se encuentran presentes tanto en *A. tequilana* como en *A. angustifolia*. Aunque, al no haber diferencia en sus niveles de expresión hojas bajo condiciones de lluvia y sequía, sus niveles de expresión no correlacionan con el contenido de saponinas, ni la actividad hemolítica de saponinas,

Actualmente se están realizando los ensayos cuantitativos de los niveles de expresión de estos genes en los diversos tejidos tanto de plantas de *A. tequilana* como de *A. angustifolia* colectadas en lluvia y en sequía.

6. DISCUSIÓN

6.1 Caracterización estructural de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa de *A. tequilana*

Siendo que en la base de datos AgaveEST-DB se identificaron seis *clusters* agrupando 40 de los 46 *Expressed Sequence Tags* (EST's) con similitud al gen codificante de la enzima furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa (F26G) de *C. speciosus*, y las secuencias consenso o *contigs* de dichos *clusters* son diferenciables entre sí al alinearlos; esto nos sugiere que en *A. tequilana* hay al menos seis distintos genes o alelos potencialmente codificantes de la enzima furostanol glicósido 26-O- β glucosidasa.

El análisis del alineamiento de las secuencias de EST's que componen cada uno de los seis *clusters* permitió determinar que las secuencias de los *contigs* son correctas. También se logró identificar la clona más completa hacia el lado 5' dentro de cada *cluster*, la cual potencialmente contiene un cDNA completo (full-length cDNA). Los cDNAs completos deben contener la región codificante y los UTRs 5' y 3'. El análisis de tamaño de insertos de cDNAs clonados sugiere que tenemos clonados cDNAs del tamaño esperado conforme el CDS de *C. speciosus*, excepto en el caso del contig aC2842_2 que tiene un tamaño menor.

La búsqueda de ORFs (marcos de lectura abierto) dentro de las secuencias de los *contigs* identifica ATGs localizados dentro de los primeros 30 nucleótidos en todos los *contigs*. Asumiendo que los ATGs identificados corresponden al sitio de inicio de la traducción, se concluye que las clonas contiene los CDS completos o zona codificante de la F26G de *A. tequilana*, así como ambos UTRs. Los 5'UTR de los cDNAs de F26G clonados son muy cortos.

Considerando que el número de ESTs por contig es un referente indirecto de su nivel de expresión ya que el número de veces que se secuencian un EST depende del número de ESTs secuenciados en cada biblioteca de cDNA y se relaciona con el nivel de expresión del gen en cada tejido a partir del cual se construyeron las

bibliotecas; es factible predecir un “patrón expresión” de cada gen con base en el número de ESTs presentes en cada *cluster* y analizando los tejidos a partir de los que fueron secuenciados.

Por ejemplo, en *Trillium govianum* Wall. Ex Royle se encontró alta expresión de genes beta-glucosidasa en frutos (Singh *et al.*, 2017), sugiriendo que la abundancia de transcritos de tejidos específicos en una librería de cDNA, generalmente corresponden al nivel de expresión de la muestra biológica, es decir, que reflejan los procesos biológicos presentes *in vivo* en la planta. (Abdelrahman *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2011).

Así, analizando los ESTs en general, se observa que la mayoría provienen de la biblioteca de anteras, seguido de raíz y de óvulos. Ésta distribución sugiere que en estos tejidos hay una alta expresión de F26G y por lo tanto biosíntesis de saponinas esteroidales tipo espirostanol.

Cabe mencionar que, aunque la mayoría de las saponinas descritas en *Agave* han sido extraídas principalmente a partir de hojas (Sidana *et al.*, 2016) tanto las flores como la raíz son tejidos productores de saponinas en este género (Pérez *et al.*, 2013; Lledías *et al.*, 2007; Gentry 1982). Por ello las raíces son tradicionalmente utilizadas como fuente de sustituto de jabón.

La producción de saponinas en órganos reproductivos de la planta puede relacionarse con el papel que desempeñan durante el desarrollo y protección del fruto contra factores ambientales y patógenos (Li *et al.* 2009). En *A. offayana* se reportaron cinco saponinas diferentes aisladas de tejidos de flores (Pérez *et al.*, 2013).

Por otra parte, el número de ESTs similares a F26G hallados por tejidos (biblioteca) en la base de datos AgaveEST-DB sugiere que los genes o alelos similares a F26G tienen expresión diferencial en *A. tequilana*: dos *clusters* parecen ser específicos de anteras, dos son específicos de raíz, y dos se conforman de ESTs secuenciados a partir de diversos tejidos (hoja, raíz, piña, ovario y anteras), sugiriendo que estos son genes o alelos son de expresión constitutiva.

El análisis de BLASTP de las secuencias de proteínas traducidas a partir de los seis *contigs* de *A. tequilana* muestra que todos codifican proteínas similares a la F26G de *C. speciosus* con identidades alrededor del 60 %, aunque en todos los casos presentan mayor similitud con F26G de otras plantas monocotiledóneas.

La similitud observada en el alineamiento de las proteínas de *A. tequilana* con la F26G de *C. speciosus*, así como su agrupamiento en el filograma muestran que los seis *contigs* analizados codifican proteínas de *A. tequilana* homólogas a la F26G de *C. speciosus* y a las identificadas en otras plantas. También se confirma que los *contigs* codifican tres posibles tipos de proteínas o isoformas ya que se observa la existencia de tres distintos genes (Grupo I, II y III) con uno, dos y tres alelos, respectivamente.

El Grupo I se separa del Grupo II y III. El gen del Grupo I es ortólogo a cDNAs identificados en otras plantas como posibles F26G. Los genes del Grupo II y III son ortólogos al gen F26G de *C. speciosus*, pero se separan en una rama probablemente específica de *Agave*, ya que no se han reportado a la fecha secuencias de otras plantas que se agrupen en el mismo clado. Estos dos tipos de genes II y III son muy cercanos entre ellos por lo que pueden ser parálogos. Los genes del Grupo I y del Grupo II de *A. tequilana* son ortólogos a genes identificados como F26G en *A. officinalis*, otra planta de la familia Asparagaceae, sugiriendo que son producto de un evento de duplicación génica en la subfamilia Agavoideae (McKain *et al.*, 2012).

Siendo que los dos EST que conforman el *cluster* del Grupo I se clonaron solo de anteras y que los del Grupo II se clonaron solo en raíz, se sugiere que estos dos genes son de expresión tejido específica y codifican distintas isoformas de la enzima responsable de la formación de espirostanos en anteras y raíz, dos órganos importantes en la producción de saponinas en *Agave*.

En contraste, los genes del Grupo III se clonaron con más alta frecuencia y se expresan en diversos tejidos, por lo que son probablemente los que codifican a la F26G de expresión más generalizada y con mayor participación en la producción de saponinas tipo espirostanos en *A. tequilana*. Más aún, un fragmento de proteína

reportada como con baja similitud a F26G, fue secuenciada por Lledías *et al.* (2017), a partir de hojas de *A. attenuata* Salm-Dyck y es similar a secuencias reconstruidas a partir de datos de seqRNA de *A. tequilana* y *A. desertii* reportados por Gross *et al.*, (2013), tales secuencias de seqRNA se agrupan en el mismo clado que los tres cDNAs nativos del Grupo III aquí reportados. El fragmento de la proteína aislada y secuenciada de *A. attenuata*, presenta baja similitud al contig aC2988_12 de *A. tequilana*, el cual pertenece al Grupo III. Esto confirma que los genes del Grupo III de F26G se encuentran conservados, se expresan y se traducen también en otras especies de *Agave*, por lo que deben significar un tipo de genes importante en cuanto a su funcionalidad.

El patrón de expresión diferencial entre los tres tipos de genes apoya la hipótesis de que los tres genes descritos son genes distintos, los cuales podrían sintetizar una o más saponinas diferentes.

La presencia del dominio de la familia I de las glicósido-hidrolasas en los seis *contigs* analizados, la presencia de los dos ácidos glutámicos clave para los sitios catalíticos, la firma de la familia de Glicosil-hidrolasas en el extremo N terminal de estas proteínas, y la presencia del péptido de tránsito, confirman que los genes encontrados en *A. tequilana* aquí reportados codifican enzimas tipo F26G.

Los seis *contigs* analizados poseen motivos altamente conservados, los cuales son similares a los de F26G reportados en *C. speciosus* y en *D. esculenta* los cuales contienen un centro nucleófilo activo y un catalizador ácido base, esto, además del alto porcentaje de identidad con las secuencias de las proteínas comparadas, que muestran su homología con las proteínas de la familia I Glicosil-hidrolasas.

Con base a los resultados anteriores hay elementos suficientes para considerar que los seis cDNAs de *Agave* clonados corresponden a tres tipos de genes de *Agave* con diversos alelos, que por su homología y características estructurales se deduce codifican tres diferentes isoformas de la enzima furostanol glucósido 26-O- β glucosidasa. La corroboración experimental deberá ser posteriormente realizada expresando los cDNAs clonados como proteínas recombinantes en sistemas

heterólogos y verificando su actividad enzimática, así como aislando y caracterizando las enzimas nativas a partir de diferentes tejidos de *A. tequilana*.

6.2 Expresión de furostanol glucósido 26-O- β glucosidasa en tejidos de *A. tequilana*

Bajo las condiciones de reacción aquí reportadas, los protocolos establecidos para la detección por PCR de los genes analizados permiten analizar específicamente la expresión de cada uno de los tres tipos de genes de F26G identificados en *A. tequilana*. Los resultados de su análisis de expresión tisular corroboran experimentalmente el patrón de expresión predicho a partir de la información de la base de datos AgaveEST-DB.

El gen del Grupo I se expresa exclusivamente en anteras, aunque se encontró que el gen del Grupo II se expresa no solo en raíz sino también en hoja, pero no se expresó en piña ni en raíz. En cambio, los genes del Grupo III se expresaron en todos los tejidos analizados, confirmando que es un gen de amplia expresión. En anteras, un tejido claramente productor de saponinas, se expresaron los tres tipos de genes de F26G identificados. En raíz y en hojas se expresan los genes del tipo II y III. En piña solo se expresa el gen de expresión constitutiva (III). El patrón de expresión diferencial observado sugiere que la concentración y el tipo estructural y bioactividad de saponinas sintetizadas en diversos tejidos de *A. tequilana*, también puede ser diferencial.

El análisis de expresión de genes involucrados en la ruta de biosíntesis de saponinas en *T. govianum* reveló que la mayoría de los genes se expresaban en gran medida en los tejidos de las hojas y los frutos, lo que indica una biosíntesis activa de la saponina esteroideas en estos tejidos (Singh *et al.*, 2017). Esto es congruente con lo encontrado en *A. tequilana* ya los tres genes F26G se expresaron en anteras.

6.3 Análisis de la correlación entre la cantidad de saponinas y la expresión de furostanol glicósido 26-O-β-glucosidasa en *A. angustifolia* bajo condiciones de sequía

Nuestros datos muestran que la biomasa en hojas de la planta aumenta considerablemente en condiciones de lluvia. Ramírez-Tobías *et al.*, (2014), reportan que el estrés por sequía a potencial hídrico (Ψ) de -0.7 a 3.5 MPa afecta algunas características cuantitativas como biomasa, grosor foliar y contenido de prolina en seis especies de *Agave* (*A. americana* var. *marginata* Trel., *A. angustifolia* subsp. *tequilana*, *A. asperrima* Jacobi, *A. cupreata* Trel. & A. Berger, *A. durangensis* Gentry y *A. salmiana*). A menor disponibilidad de humedad (-3.5 MPa), se presentó la inhibición de biomasa en dichas especies. Sin embargo, el número de hojas y la cobertura de la planta se mantuvo en las especies de *A. angustifolia* subsp. *tequilana*, *A. duranguensis*, *A. lechuguilla* Torr. y *A. salmiana*, que son especies exitosas en regiones geográficas con escasez de agua. Este comportamiento coincide con lo observado en la variedad costero de *A. angustifolia* utilizada en este trabajo.

6.3.1 Cuantificación de saponinas en tejidos de *A. Angustifolia*

La detección de saponinas en TLC mostró cualitativamente que los tejidos colectados en época de sequía contienen una mayor cantidad de saponinas que en los tejidos colectados en época de lluvia

Al separar mediante cromatografía de gases los compuestos presentes en los extractos hidrolizados obtenidos a partir de los tejidos de *A. angustifolia*, se identificó la presencia de la aglicona hidrolizada tigogenina. También se identificó la presencia de beta-sitosterol, un esteroide. Este resultado confirma lo reportado por Abdel-Gawad y cols. (2015), quién encontró en *A. angustifolia* la presencia de tigogenina y rhodeasapogenina, además de estigmasterol. La presencia de rhodeasapogenina no pudo ser determinada en nuestras muestras por falta de

estándar. Así, observamos que la variedad de esta especie adaptada a la costa, produce compuestos con estructura similar a otras variedades de *A. angustifolia*.

Los resultados de cuantificación de sapogeninas por cromatografía de gases indican que *A. angustifolia* produce o acumula diferentes cantidades de tigogenina en diferentes tejidos. La piña en contraste acumula cantidades bajas de sapogeninas en ambas condiciones. Otros estudios comparativos de acumulación de saponinas en distintos tejidos de otras especies de *Agave*, muestran resultados similares. En *A. nigrum* L. el contenido de saponinas es mayor en raíz que en bulbilos y con menor contenido en hojas (Akhov *et al.*, 1999 de Sobolewska *et al.*, 2016).

Nuestros resultados indican que en raíces en ambos periodos de colecta mantiene el mismo contenido de saponinas, relativamente alto. En *A. fistulosum* L. también se encontró mayor contenido de saponinas en bulbos basales y raíces (*et al.*, 2017). Se considera que en algunas plantas las saponinas almacenadas en raíces actúan como fitoprotectores contra patógenos del suelo que atacan los tejidos de la planta (Faizal & Geelen, 2013).

Si bien el contenido de saponinas en raíz no es constante, no se observa gran variación respecto de una temporada a otra por lo que su acumulación en este tejido, a diferencia de lo que observamos en hoja, no parece ser regulada por las condiciones ambientales. En *A. bidentata* se observó la mayor producción de saponinas durante la etapa de crecimiento, disminuyendo el contenido de saponinas en las raíces durante la inflorescencia y el desarrollo del fruto. Simultáneamente, el nivel de saponinas en los tallos también disminuyó dramáticamente mientras que aumentó en la etapa de maduración de la fruta (Li & Hu, 2009). Resultados similares fueron reportados en *Panax. Notoginseng* (Birkil) F.H. Chen ex C.H. Chow (Dong *et al.*, 2003). Lo cual indica que la disminución en el contenido de saponina de las raíces y los tallos está relacionada con la fase reproductiva de la planta. Los análisis del contenido tisular en distintas etapas en desarrollo de raíces de *A. angustifolia* están en progreso.

En nuestro estudio, la cantidad de tigogenina en hojas bajo condiciones de lluvia es baja en dos de tres muestras, pero se incrementa considerablemente en respuesta a sequía. Cabe considerar que, como aumenta la biomasa en hoja bajo condiciones de lluvia, más que incrementarse la cantidad de saponinas en sequía, es posible que en lluvia el contenido interno de saponinas en hoja se diluya, si la biosíntesis de esos compuestos no se incrementa en época de lluvia.

Los resultados sugieren que la biosíntesis, transporte o acumulación de saponinas en hojas de *A. angustifolia* se ve afectada por las condiciones medioambientales adversas. Esto está plenamente congruente con lo reportado por Puente-Garza *et al.*, (2017a y 2017b), donde se evaluó el estrés por sequía inducido con polietilenglicol bajo condiciones *in vitro* en *A. salminana*. Los resultados obtenidos mostraron que el estrés por sequía modificó las características morfológicas de la planta, en este caso el largo y coloración de la hoja y elevó el contenido total de saponinas y así como la actividad antioxidante. Las saponinas identificadas fueron glucósidos de clorogenina, tigogenina y hecogenina; tigogenina fue la saponina más abundante y únicamente se encontró en plantas sometidas a estrés *in vitro*, lo anterior concuerda con los resultados aquí mostrados donde se encontró mayor contenido de saponinas en condiciones de sequía.

Estos resultados son también congruentes con lo reportado en Martínez *et al.* (2009), donde se evaluó la influencia de la sequía en el contenido de saponinas y se encontró que el nivel de saponina en plantas con alto contenido inicial de saponina disminuyó en un 9 % con un mayor riego y aumentó en un 25 % con bajo riego, mientras que en plantas con bajo contenido inicial de saponina disminuyó en 26 % y 57 % en condiciones de alto y bajo riego, respectivamente (Martínez *et al.*, 2009).

6.3.2 Actividad hemolítica de saponinas de *A. angustifolia*

Entre las diversas actividades biológicas que poseen las saponinas, se encuentra la actividad hemolítica, la cual es atribuida a la alta afinidad que tienen los esteroides por el colesterol en la membrana de los eritrocitos, lo que provoca la

lisis de la membrana ocasionando un aumento en la permeabilidad de la membrana y por lo tanto pérdida de hemoglobina (Pereira da Silva *et al.*, 2006)

Los ensayos de actividad hemolítica de saponinas confirman que la biosíntesis, la acumulación o la bioactividad de las saponinas se induce en hojas cuando las plantas se encuentran bajo condiciones de sequía, de forma congruente con lo observado en la acumulación de la aglicona tigogenina. Sin embargo, en piña, a pesar de que se cuantificó baja cantidad de tigogenina en ambas condiciones, hay mayor actividad hemolítica en plantas colectadas en época de lluvia, sugiriendo que la misma concentración de saponinas, pero posiblemente con modificaciones químicas diferentes, son la causa de las diferencias en la actividad hemolítica.

La actividad hemolítica de las saponinas está estrechamente relacionada con el tipo de aglicona y la presencia de cadenas laterales de azúcar. Por ejemplo, un estudio realizado con mesasaponinas de *Maesa. Lanceolata* G. Don, para establecer la relación existente entre la estructura de la saponina y la actividad hemolítica, demostró que, en el caso de las mesasaponinas, la sustitución en la posición del C-22 de un grupo diacil es una característica estructural determinante de su actividad hemolítica (Apers *et al.*, 2001; Sparg *et al.*, 2004).

Así mismo, se cree que la ausencia o disminución de la actividad hemolítica de las saponinas, se debe a la presencia de unidades de azúcar distribuidas en el lado opuesto del resto de la aglicona, lo que ocasiona la disminución de su hidrofobicidad y en una pérdida de sus propiedades anfipáticas (Pereira da Silva *et al.*, 2006).

Diversos estudios señalan que los factores ambientales en los que se desarrolla la planta influyen de manera directa con la cantidad de metabolito (Szakiel *et al.*, 2011). Se ha encontrado que existe variación en el contenido de saponinas entre los diferentes tejidos de la planta; por ejemplo, el contenido de saponinas en variedades de alfalfa varían significativamente entre cultivares y órganos de la planta (Goławska *et al.*, 2012), y se ha reportado que esto se debe a diversos factores tanto intrínsecos, como el estatus fisiológico de las plantas, y factores externos, ya sea bióticos o abióticos. (Vincken *et al.*, 2007; Szakiel *et al.*, 2011).

Muchas hipótesis asumen que la síntesis de metabolitos secundarios, incluidas las saponinas, es una respuesta de la planta a los factores ambientales y parte de una estrategia adaptativa que conduce a la tolerancia al estrés abiótico. Por lo tanto, se pueden esperar fluctuaciones en el contenido de saponinas que resultan de cambios temporales en circunstancias ambientales (Szakiel *et al.*, 2011; Faizal & Geelen, 2013).

6.4 Análisis de expresión de furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasa en hojas de *A. angustifolia*

Con base a los resultados obtenidos en la cuantificación de sapogeninas y saponinas, donde se encontró la mayor cantidad del metabolito y mayor actividad hemolítica en hojas, se esperaría que la expresión de uno o más genes identificados como codificantes de F26G en *Agave* se indujera en hojas de *A. angustifolia* bajo condiciones de sequía.

Sin embargo, el análisis de expresión de los tres grupos de genes similares a F26G en hojas de *A. angustifolia* bajo condiciones de sequía y lluvia indica que el nivel de expresión de los tres genes no se ve alterado en hojas colectadas bajo ambas condiciones. Esto podría deberse a que la regulación de la expresión de la F26G no ocurre a nivel transcripcional sino a nivel post-transcripcional o post-traduccional. Esta posibilidad deberá ser posteriormente evaluada. Alternativamente, como se indicó antes, la menor cantidad de sapogeninas y actividad hemolítica de saponinas observada en hojas colectadas en época de lluvia, puede deberse a un efecto de dilución del metabolito al incrementarse la biomasa de la hoja, y no obedecer a un efecto de inducción de la síntesis de saponinas bajo condiciones de sequía.

Los niveles de acumulación de saponinas podrían estar influenciados por otras vías metabólicas, fuente de precursores e intermediarios que afectan la biosíntesis de la saponina, lo cual implica un proceso de regulación complejo que ocurre en varios niveles moleculares.

Se ha sugerido que las síntesis y la cantidad de metabolitos acumulados en diferentes tejidos está regulada por diversos factores como la tasa de transcripción y traducción, modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales, por lo tanto, es difícil establecer una relación “directa” entre la biosíntesis y la acumulación de saponinas en diversos órganos de la planta (Singh *et al.*, 2017).

Por su diversidad biológica, múltiples usos y complejidad metabólica, el género *Agave* representa un importante recurso genético. Contar con los genes codificantes de enzimas involucradas en la biosíntesis de saponinas, posibilitará su manipulación y expresión en sistemas heterólogos, con una amplia variedad de aplicaciones biotecnológicas, como lo son en la industria alimenticia y farmacéutica.

7. CONCLUSIONES

En *Agave* existen al menos tres genes codificantes de proteínas similares a furostanol glicósido 26-O- β -glucosidasas (F26G). Dos de ellos son reportados por primera vez en *Agave*.

En *A. tequilana* se biosintetizan saponinas tipo espirostano en raíz, piña y hoja ya que en dichos tejidos se expresan al menos uno de los genes de F26G identificados.

Los tres distintos genes de F26G identificados en *A. tequilana* poseen patrón de expresión diferencial. El tipo I que muestra mayor divergencia respecto a otras F26G se expresa en anteras; el gen del Grupo II, expresado preferentemente en raíz, posee dos posibles alelos; el gen del Grupo III expresado en casi todos los tejidos (hoja, piña, raíz, bulbilos, anteras y ovarios) cuenta con tres posibles alelos.

Por su patrón de expresión tejido específico en anteras el contig aC3048_5 podría representar un cuarto gen parálogo a los otros dos *contigs* del grupo III.

Los genes del Grupo II y III no han sido descritos en otras plantas, ni en otras Asparagales, por lo que podrían haber evolucionado solo en los *Agaves*. El Grupo III, también expresado en otros *Agaves* como *A. deserti*, *A. angustifolia* y *A. attenuata* y expresado en todos los tejidos de *A. tequilana*, parece tener un papel relevante en la biosíntesis de saponinas en el género *Agave*.

Las condiciones de sequía inducen la acumulación o bioactividad de saponinas en hojas de *A. angustifolia*.

Los niveles de expresión de los genes de F26G no correlacionan con la cantidad de tigogenina y mayor actividad hemolítica de saponinas en hojas de *A. angustifolia* en respuesta a sequía.

Los genes codificantes de F26G no son transcripcionalmente regulados por efecto de la sequía en hojas de *A. angustifolia*.

La mayor acumulación de tigogenina y la mayor bioactividad hemolítica de saponinas en hojas de *A. angustifolia* podría depender de una regulación de la F26G a nivel post-transcripcional que incremente su actividad enzimática sin que dependa de una inducción a nivel transcripcional.

Se cuenta con clonas conteniendo cDNAs nativos completos codificando los tres tipos de F26G de *A. tequilana*, incluyendo UTRs, útiles para la comprobación de la actividad enzimática de las proteínas recombinantes y para posteriores abordajes biotecnológicos.

8. PERSPECTIVAS

Determinar si la regulación de la expresión de la F26G está regulada a nivel post-traducciona l o post-transcripcional.

Expresar los cDNAs clonados como proteínas recombinantes en sistemas heterólogos y verificar su actividad enzimática.

Aislar y caracterizar las enzimas nativas a partir de diferentes tejidos de *A. tequilana*.

Elucidar la estructura de las saponinas presentes en *A. angustifolia* var. *costero*.

Extraer y elucidar la estructura de las saponinas de *A. tequilana*

9. LITERATURA CITADA

- Abdel-Gawad MM, El-Nahas HA, Osman NS. (2015). Molluscicidal Activity of Steroidal Saponins Isolated from *Agave angustifolia*. Global Journal of Pharmacology 9 (2), 138-143
- Abdel K.S., Melek F., Miyase T., Gaber N., Mina S. (2010). New steroidal saponin from *Agave angustifolia*. Planta Med. 76:446. DOI: 10.1055/s-0030-1264744
- Abdel-Kader A, Hamdi S. A., Rawi S M. (2005). Biological and biochemical studies on *Biomphalaria alexandrina* snails, treated with low concentrations of certain molluscicides (synthetic and of plant origin). Journal of Egyptian Society of Parasitology 35: 841-858.
- Abdelrahman, M., El-Sayed, M., Sato, S., Hirakawa, H., Ito, S., Tanaka, K., Shigyo, M. (2017). RNA-sequencing-based transcriptome and biochemical analyses of steroidal saponin pathway in a complete set of *Allium fistulosum*—*A. cepa* monosomic addition lines. PLOS ONE, 12(8), e0181784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181784>
- Apers, S.B, Sindambiwe S.B., Witvrouw J., De Clercq M., Vanden B. E., Van Marck, E. Vlietinck, A. & Pieters, L. (2001). Antiviral, Haemolytic and Molluscicidal Activities of Triterpenoid Saponins from *Maesa lanceolata*: Establishment of Structure-Activity Relationships. Planta medica. 67. 528-32. 10.1055/s-2001-16489
- Augustin, J. M., Kuzina, V., Andersen, S. B., & Bak, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. Phytochemistry, 72(6), 435-457. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.015>
- Baumann, E., Stoya, G., Völkner, A., Richter, W., Lemke, C., & Linss, W. (2000). Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. Acta Histochemica, 102(1), 21-35. <https://doi.org/10.1078/0065-1281-00534>

- Balandrin MF (1996) Commercial utilization of plant-derived saponins: an overview of medicinal, pharmaceutical and industrial applications. *Adv Exp Med Biol* 404:1–14
- Bianchi, E., Cole, J.R. (1969) Antitumor agents from *Agave schottii* (Amaryllidaceae). *Journal of Pharmaceutical Sciences* 58: 589-591.
- Callen, E.O. (1965). Food habitats of some pre-Columbian Mexican Indians. *Economic Botany* 19: 335-343.
- Cervera Herrera, J. C, Leirana-Alcocer J. L, Navarro Alberto J. A. (2018) Factores ambientales relacionados con la cobertura de *Agave angustifolia* (Asparagaceae) en el matorral costero de Yucatán, México. *Acta Botanica Mexicana* 124: 75-84
- Colunga-García M. P., May, P. F. (1993). Agave studies in Yucatán, México. I. Past and present germplasm diversity and uses. *Econ. Bot.* 47, 312–327
- Colunga García-Marín P, Coello-Coello J, Eguiarte L. E, Piñero D. (1999) Isozymatic variation and phylogenetic relationships between henequen (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *A. angustifolia* (Agavaceae). *Am J Bot.* 86(1):115-23.
- Cedeño, M. (1995) Tequila production. *Critical Reviews in Biotechnology* 15: 1-11.
- Cushman, J. C., Davis, S.C., Yang X., Borland, A. M. (2015). Development and use of bioenergy feedstocks for semi-arid and arid lands. *J Exp Bot.* Jul;66(14):4177-93. doi: 10.1093/jxb/erv087.
- Chen, P.Y., Kuo, Y.C., Chen, C.H., Kuo, Y.H., Lee, C.K. (2009) Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. *Molecules* 14: 1789-1795.
- Dalton, R. (2005) Alcohol and science: saving the agave. *Nature* 438: 1070-1071.
- Davidson J. R, Ortiz de Montellano B. R. (1983). The antibacterial properties of an Aztec wound remedy. *J Ethnopharmacol.* 8(2):149-161.

- Davis, S. C., Dohleman, F. G., and Long, S. P. (2011). The global potential for *Agave* as a biofuel feedstock. *GCB Bioenergy* 3, 68–78. doi: 10.1111/j.1757-1707.2010.01077
- Dong, T. T. X., Cui, X. M., Song, Z. H., Zhao, K. J., Ji, Z. N., Lo, C. K., & Tsim, K. W. K. (2003). Chemical Assessment of Roots of *Panax notoginseng* in China: Regional and Seasonal Variations in Its Active Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4617-4623. <https://doi.org/10.1021/jf034229k.x>
- Escamilla-Treviño, L.L. *Bioenerg. Res.* (2012). Potential of Plants from the Genus *Agave* as Bioenergy Crops 5: 1 (1-9). doi.org/10.1007/s12155-011-9159-x
- Estrada, C. E., Garza-L. M., Villarreal, Q. J. Á., Salinas, R. M. M., Soto, M. B. E., González, R. H., González, U. D. U., Cantú, S. I., Carrillo, P. A., Cantú, A. C. (2014). Ethnobotany in Rayones, Nuevo León, México. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 10, 62. doi:10.1186/1746-4269-10-62
- Faizal, A., & Geelen, D. (2013). Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochemistry Reviews*, 12(4), 877-893. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9322-4>.
- García-Mendoza, A. (2002). Distribution of the genus *Agave* (Agavaceae) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal* (74), 177-187.
- García-Mendoza, A. (2010). Geografía del mezcal. *Artes de México: Mezcal. Arte tradicional* (98): 8-15.
- García-Mendoza, A. (2011). Agavaceae. En R. Medina Lemos (Ed.), *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán* (Fascículo 88). México: Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto de Biología, 95 pp.
- García-Mendoza *et al.*, (2017). Capítulo 1: *Agave*. En: *Panorama del Aprovechamiento de los Agaves en México*. Agared. pp 15-68.

- García, M, A. & Galván, R. (1995). Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. Boletín de la Sociedad Botánica de México (56), 7-24.
- Genillier-Foin, N., Avenel-Audran, M. (2007). Purpuric contact dermatitis from *Agave americana*. Annales de Dermatologie et de Venereologie 134: 477-478
- Gentry, H. S. (2004). Agaves of Continental North America. Tucson, AZ, EE.UU.: University of Arizona Press, 670 pp
- Goncalves, O. L. 1956. El Maguey y el Pulque en los Codices Mexicanos. Fondo de Cultura Economica. Mexico
- Guerra, J.O., Meneses, A., Simonet, A.M., Macías, F.A., Nogueiras, C., Gómez, A., Escario, J.A. (2008). Steroidal saponins from the plant *Agave brittoniana* with activity against the parasite *Trichomona vaginalis*. Revista de Biología Tropical 56: 1645-1652.
- Gross, S.M., Martin J.A., Simpson J, Abraham-Juarez M. J., Wang Z., Visel, A. (2013). De novo transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. BMC Genomics. 2013 14:563. doi: 10.1186/1471-2164-14-563.
- Gutiérrez, C. M. L, Acedo, F. E, Valenzuela, Q. A. I. (2007). Bacanora industry and its process of production. Journal of Food, 5(5): 394-404, DOI: 10.1080/11358120709487718
- Herbert-Doctor L. A., Saavedra-Aguilar, M., Villarreal, M. L., Cardoso-Taketa A., Vite-Vallejo, O. (2016). Insecticidal and Nematicidal Effects of *Agave tequilana* Juice against *Bemisia tabaci* and *Panagrellus redivivus*. Southwestern Entomologist, 41(1):27-41
- Hwang, H. S., Lee, H., & Choi, Y. (2015). Transcriptomic analysis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) to discover genes involved in saponin

- biosynthesis. BMC Genomics, 16(1), 180. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1357-z>
- Inoue K, Ebizuka Y. (1996a). Purification and characterization of furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase from *Costus speciosus* rhizomes. FEBS Lett. 378(2):157-160.
- Inoue K, Ebizuka Y. (1996b). Purification and characterization of a beta-glucosidase which converts furostanol glycosides to spirostanol glycosides from *Costus speciosus*. In: Waller G.R., Yamasaki K. (eds) Saponins Used in Traditional and Modern Medicine. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 404. Springer, Boston, MA.
- Inoue. K., Shibuya, M., Yamamoto, K., Ebizuka, Y. (1996). Molecular cloning and bacterial expression of a cDNA encoding furostanol glycoside 26-O-beta-glucosidase of *Costus speciosus*. FEBS Lett. 1996 Jul 8;389(3):273-7.
- Jin, J.M., Yang, C.R., (2003). Two new spirostanol steroidal saponins from fermented leaves of *Agave americana*. Chin. Chem. Lett. 14. 491-494.
- Li, J., & Hu, Z. (2009). Accumulation and Dynamic Trends of Triterpenoid Saponin in Vegetative Organs of *Achyranthus bidentata*. Journal of Integrative Plant Biology, 51(2), 122-129. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00764.x>
- López-Romero J. C., Ayala-Zavala, J. F., González-Aguilar, G. A., Peña-Ramos, E. A., González-Ríos, H. (2018). Biological activities of *Agave* by-products and their possible applications in food and pharmaceuticals. J Sci Food Agric. 98(7):2461-2474. doi: 10.1002/jsfa.8738
- Lledías, F., Hernández, F., Rivas, V., García-Mendoza, A., Cassab, G. I., Nieto-Sotelo, J. (2017). A Rapid and Reliable Method for Total Protein Extraction from Succulent Plants for Proteomic Analysis. Protein J. 36(4):308-321. doi: 10.1007/s10930-017-9720-3.
- Luo, H., Sun, C., Sun, Y., Wu, Q., Li, Y., Song, J., Chen, S. (2011). Analysis of the transcriptome of *Panax notoginseng* root uncovers putative triterpene

- saponin-biosynthetic genes and genetic markers. *BMC Genomics*, 12(Suppl 5), S5. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-S5-S5>
- Jones, H. D., Furbeck, G. N., Colorado, R. (1932). Isolation and study of the saponin content of the juice and leaf of the agave plant, Maguey, Manso fino. *J. Am. Pharm. Assoc.* 21, 787e793.
- Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Huang, L., Liu, C. (2010). Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia*. 81. 703-714.
- Matiz, A., Mito, P. T., Mayorga, A. Y., Freschi, L. & Mercier, H. (2013). CAM photosynthesis in bromelias and Agaves: What can we learn from these plants? En Z. Dubinsky (Ed.), *Photosynthesis*. Croacia: Intech. <http://www.intechopen.com> DOI: 10.5772/56219.
- Martínez-Hernández, A., Espino, M. M. E., Herrera E. H. A., Hernández M. P. (2010). Construcción de bibliotecas de ADNc y análisis de expresión génica por RT-PCR en *Agaves*. *Revista Latinoamericana Química*. 38:1. 24 p.
- Martínez-Hernández, A., Pastrana-Chávez, J., Sánchez-Villarreal, A., Lara-Reyna, J., Herrera-Estrella, L., Herrera-Estrella. A., Martínez de la Vega O, Simpson-Williamson, J. (2007). Genómica de *Agave tequilana*: Identificación de genes útiles para la industria tequilera y el desarrollo de uso alternativos del Agave”. Resumen in extenso en memorias on line de la 2ª. Reunión de innovación Tecnológica Agrícola y Forestal (RNIAF). <http://www.rniaf.org.mx/2007/memoria/ponencias/index.htm>
- Mina, S. A, Farouk, R. M., Soad, M., Abdel K., Nagwan, M. (2013). Two steroidal saponins from *Agave franzosinii* and *Agave angustifolia* leaves and biological activities of *Agave franzosinii*. *Journal of Natural Products* 6:188-197.
- Morales-Serna, J.A., Jimenez, A., Estrada-Reyes, R., Marquez, C., Cardenas, J. M. (2010). Homoiso-flavanones from *Agave tequilana* Weber. *Molecules* 15, 3295e3301.

- McKain, M. R., Wickett, N., Zhang, Y., Ayyampalayam, S., McCombie, W. R., Chase, M. W., Pires, J. C., dePamphilis, C. W., Leebens-Mack, J. (2012). Phylogenomic analysis of transcriptome data elucidates co-occurrence of a paleopolyploid event and the origin of bimodal karyotypes in Agavoideae (Asparagaceae). *Am J Bot.* A99(2):397-406. doi: 10.3732/ajb.1100537.
- Narváez, Z. J. A., Sánchez, T. F. (2009) Agaves as a Raw Material, Recent Technologies and Applications. *Recent Patents on Biotechnology* 3: 185-191
- Nakayasu, M., Kawasaki, T., Lee, H. J., Sugimoto, Y., Onjo, M., Muranaka, T., & Mizutani, M. (2015). Identification of furostanol glycoside 26-O- β -glucosidase involved in steroidal saponin biosynthesis from *Dioscorea esculenta*. *Plant Biotechnology*, 32(4), 299-308. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.15.1023b>
- Nobel, P. S. (1976). Water Relations and Photosynthesis of a Desert CAM plant, *Agave deserti*. *Plant Physiology* 58(4): 447-602.
- Nobel, P. S. (1985). Water Relations and Carbon Dioxide Uptake of *Agave deserti*: Special Adaptations to Desert Climates. *Desert Plants* 7(1): 51-56.
- Nobel, P.S. (1988). Environmental biology of agaves and cacti. Cambridge University Press. USA.
- Nobel, P.S. (1994). Remarkable Agaves and Cacti. Oxford University Press; New York.
- Nobel, P. S. (2003). Environmental biology of Agaves and cacti. Nueva York, EE.UU.: Cambridge University Press.
- Nobel, P. S. & Sanderson, J. (1984). Rectifier-like activities of roots of two desert succulents. *Journal Experimental of Botany*, 35 (5), 727-737.
- Ohtsuki, T., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Sakai, S., Kawahara, N., Goda, Y., Yamaguchi, N., Ishibashi, M. (2004) New chlorogenin hexasaccharide

- isolated from *Agave fourcroydes* with cytotoxic and cell cycle inhibitory activities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 12: 3841-3845.
- Peana, A. T., Moretti, M. D., Manconi, V., Desole, G., Pippia, P. (1997) Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroidal saponins of *Agave americana*. *Planta Medica* 63: 199-202.
- Pereira da Silva, B., Oliveira Campos, P., & Paz Parente, J. (2006). Chemical structure and biological activity of steroidal saponins from *Furcraea gigantea*. *Chemistry of Natural Compounds*, 42(3), 316-321. <https://doi.org/10.1007/s10600-006-0109-3>
- Pereira-Da Silva, B., Valente, A.P., Parente, J.P. (2006) A new steroidal saponin from *Agave shrevei*. *Natural Product Research* 20: 385-390.
- Pereira, G. M., Ribeiro, M. G., da Silva, B. P., Parente, J. P. (2017). Structural characterization of a new steroidal saponin from *Agave angustifolia* var. *marginata* and a preliminary investigation of its in vivo antiulcerogenic activity and in vitro membrane permeability property. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017 Sep 15;27(18):4345-4349. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.08.026.
- Pérez, A. J., Calle, J. M., Simonet, A. M., Guerra, J. O., Stochmal, A., & Macías, F. A. (2013). Bioactive steroidal saponins from *Agave offoyana* flowers. *Phytochemistry*, 95, 298-307. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.06.020>
- Puente-Garza, C. A., García-Lara, S., Gutiérrez-Urbe, J. A. (2017a). Enhancement of saponins and flavonols by micropropagation of *Agave salmiana*. *Industrial Crops and Products* 105: 225-230
- Puente-Garza, C. A., Meza-Miranda, C., Ochoa-Martínez, D., García-Lara, S. (2017b) Effect of in vitro drought stress on phenolic acids, flavonols, saponins, and antioxidant activity in *Agave salmiana*. *Plant Physiol Biochem* 115:400–407

- Rao, A. V., Gurfinkel, D. M. (2000). The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides. *Drug Metabol Drug Interact.*;17(1-4):211-35
- Ramirez-Tobias, H. M.; Pena-Valdivia, C. B. y Aguirre, J. R. (2014). Respuestas bioquímico-fisiológicas de especies de *Agave* a la restricción de humedad. *Bot. Sci [online]* vol.92, n.1, pp.131-139. ISSN 2007-4476.
- Sahu, N. P., Banerjee, S., Mondal, N. B., Mandal, D. (2008). Steroidal saponins. *Fortschr Chem Org Naturst.* 89:45-141
- Salinas, M. L., Ogura, T., Soffchi, L. (2001) Irritant contact dermatitis caused by needle-like calcium oxalate crystals, raphides, in *Agave tequilana* among workers in tequila distilleries and agave plantations. *Contact Dermatitis* 44: 94-96
- Santos-Zea, L., Fajardo-Ramírez, O. R., Romo-López, I., Gutiérrez-Uribe, J. A. (2016). Fast centrifugal partition chromatography fractionation of concentrated agave (*Agave salmiana*) sap to obtain saponins with apoptotic effect on colon cancer cells. *Plant foods for human nutrition* 71(1): 57-63.
- Sidana J., Singh, B., Sharma, O. P. (2016). Saponins of *Agave*: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry.* 130:22-46. doi: 10.1016/j.phytochem.2016.06.010.
- Singh, P., Singh, G., Bhandawat, A., Singh, G., Parmar, R., Seth, R., & Sharma, R. K. (2017). Spatial transcriptome analysis provides insights of key gene(s) involved in steroidal saponin biosynthesis in medicinally important herb *Trillium govaniatum*. *Scientific Reports,* 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep45295>
- Simmons-Boyce, J. L.; Tinto, W. F. (2007). Steroidal saponins and sapogenins from the Agavaceae family. *Natural Product Communications* 2(1): 99-114
- Simpson, J., Martínez-Hernández, A., Jazmín-Abraham J. M., Delgado-Sandoval, S., Sánchez-Villarreal, A. and Cortés-Romero, C. (2011), Genomic

- resources and transcriptome mining in *Agave tequilana*. *GCB Bioenergy*, 3: 25-36. doi:10.1111/j.1757-1707.2010.01079.x
- Sobolewska, D., Michalska, K., Podolak, I., & Grabowska, K. (2016). Steroidal saponins from the genus *Allium*. *Phytochemistry reviews: proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 15, 1-35.
- Sparg, S. G., Light, M. E., & van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2-3), 219-243. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.016>
- Stewart J. R. (2015). Agave as a model CAM crop system for a warming and drying world. *Front Plant Sci*. 6:684. doi: 10.3389/fpls.2015.00684
- Szakiel, A., Pączkowski, C., & Henry, M. (2011). Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews*, 10(4), 471-491. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9177-x>
- Tapondjou, L. A., Ponou, K. B., Teponno, R. B., Mbiantcha, M., Djoukeng, J. D., Nguелеfack, T. B., ... Park, H. J. (2008). *In vivo* anti-inflammatory effect of a new steroidal saponin, mannioside A, and its derivatives isolated from *Dracaena mannii*. *Archives of Pharmacal Research*, 31(5), 653-658. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1208-3>
- Trejo et al. (2018). Genetic variation and relationships among agaves related to the production of Tequila and Mezcal in Jalisco. *Industrial Crops and Products* 125:140-149
- Vincken, J.-P., Heng, L., de Groot, A., & Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68(3), 275-297. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.10.008>
- Wink, M. (1999) *Functions of Plant Secondary Metabolites and Their Exploitation in Biotechnology*. Sheffield Academic Press, Sheffield.

Yokosuka, A., Jitsuno, M., Yui, S., Yamazaki, M., Mimaki, Y. (2009) Steroidal glycosides from *Agave utahensis* and their cytotoxic activity. *Journal of Natural Products* 72: 1399-1404

Zhou C., Yang Y. and Yong, A. Y. (1990). 'Mini-prep' in ten minutes *Biotechniques*. 8:172-173.