



## IDENTIFICACIÓN DE cDNAs DE *Agave tequilana* Weber Var. *azul* SIMILARES A FUROSTANOL GLICOSIDO 26-O- $\beta$ -GLUCOSIDASAS

### IDENTIFICATION OF cDNAs FROM *Agave tequilana* Weber Var. *azul* SIMILAR TO FUROSTANOL GLYCOSIDE 26-O- $\beta$ -GLUCOSIDASES

Zurisadaí Monroy-González y Aída Martínez-Hernández\*

Colegio de Postgraduados, Campus Campeche. Sihochac-Champotón, Campeche, México.

\*Autor de correspondencia (aida.martinez@colpos.mx)

#### RESUMEN

La furostanol glicosido 26-O- $\beta$ -glucosidasa (F26G) participa en el último paso de la biosíntesis de saponinas esteroidales, lo que escinde la glucosa unida al hidroxilo del C26 del furostanol glucósido para permitir la formación del espirostanol. A pesar de la existencia de numerosos estudios que muestran la diversidad estructural y actividad biológica de las saponinas de plantas, así como su reconocido potencial biotecnológico y farmacológico, pocas enzimas participantes en la ruta de biosíntesis de las saponinas esteroidales han sido estudiadas y sólo una enzima nativa tipo F26G ha sido purificada y caracterizada funcionalmente. En este estudio, mediante búsqueda por BLASTX en una base de datos de *Agave tequilana* Weber var. *azul* (Agave DB), se identificaron 46 ESTs (Expressed Sequence Tags) de DNA complementario (cDNAs) similares a la F26G de *Asparagus officinalis*, la mayoría provienen de cDNAs clonados a partir de tejidos florales (anteras y ovarios) o raíz; ambos órganos son productores de saponinas. Entre ellos, se identificaron seis ESTs cuyo alineamiento indica que representan a tres cDNAs diferentes entre sí. Estos ESTs se registraron en la base de datos dbEST de NCBI (National Center for Biotechnology Information), el cual fue el primer registro de secuencias nativas de cDNAs potencialmente codificantes similares a F26G en *Agave*. El tamaño de los cDNAs clonados y su alineamiento hacia el lado 5' de las F26G conocidas sugieren que son cDNAs completos. Se diseñaron iniciadores diferenciales específicos para cada tipo de cDNA y se analizó por RT-PCR su expresión en tejidos vegetativos de *A. tequilana*. Se establecieron protocolos de PCR cuantitativo (qPCR) para estudios posteriores de regulación de su expresión génica. La información aquí reportada servirá como base para estudiar la función, regulación y actividad enzimática de las enzimas clonadas de *Agave* similares a F26G.

**Palabras clave:** *Agave tequilana*, cDNA, EST, furostanol glicosido 26-O- $\beta$ -glucosidasa, saponinas.

#### SUMMARY

Furostanol glycoside 26-O- $\beta$ -glucosidase (F26G) participates in the last step of steroidal saponin biosynthesis, cleaving the glucose bound to the C26 of the hydroxylin furostanol glycoside to allow the formation of spirostane. Despite the existence of numerous studies showing the structural diversity and biological activity of plant saponins, as well as their recognized biotechnological and pharmacological potential, few enzymes involved in the biosynthetic pathway of steroidal saponins have been studied and only one native F26G enzyme has been isolated and functionally characterized. In this study, by searching a database of *Agave tequilana* Weber var. *azul* (Agave DB), 46 ESTs (Expressed Sequence Tags) of complementary DNA (cDNAs) similar

to the known F26G were identified through BLASTX, most come from cDNA from floral tissues (anthers and ovaries) or roots; both organs are saponins producers. Among them, six ESTs were identified whose alignment indicates that they represent three cDNAs different from each other. These ESTs were submitted to the dbEST database of NCBI (National Center for Biotechnology Information), being this the first record of native cDNA sequences putatively encoding F26G-like in *Agave*. The size of the cloned cDNAs and their alignment to the 5' end of the known F26G suggest they are full-length cDNAs. Specific differential primers were designed for each type of cDNA and their expression in vegetative tissues of *A. tequilana* was analyzed by RT-PCR. Quantitative PCR protocols (qPCR) were established for future studies on gene expression regulation. The information reported here will serve as a basis for studying the function, regulation and enzymatic activity of F26G-like cloned from *Agave*.

**Index words:** *Agave tequilana*, cDNA, EST, furostanol glycoside 26-O- $\beta$ -glucosidase, saponins.

#### INTRODUCCIÓN

*Agave tequilana* Weber var. *azul* es un cultivo de gran relevancia económica y cultural en México, ya que es la única variedad permitida como materia prima para la producción del tequila, producto de exportación con denominación de origen (Cedeño, 1995; Dalton, 2005; Secretaría de Economía, 2012). Por su manejo agronómico, esta variedad de características morfológicas bien diferenciadas, muestra alta homogeneidad genética en campo (Díaz-Martínez *et al.*, 2012; Trejo *et al.*, 2018). Los agaves o magueyes pertenecen a la familia Asparagaceae, subfamilia Agavoideae (APG III, 2009) y conforman un género amplio constituido por 210 especies; 159 de ellas se encuentran en México y 119 son endémicas, por lo que el país se considera su centro de origen y diversidad (García-Mendoza *et al.*, 2017; García-Mendoza y Galván, 1995). Además de su utilidad para la producción de bebidas alcohólicas, los agaves se han aprovechado desde épocas prehispánicas de múltiples formas (Colunga-GarcíaMarín y May-Pat, 1993; Davidson y Ortiz De Montellano, 1983; Gentry, 1982). Actualmente, a nivel internacional existe interés en los agaves por su potencial para la producción

de bioenergía en zonas áridas (Davis *et al.*, 2011; Stewart, 2015). Entre las alternativas para el aprovechamiento integral de los agaves se considera la extracción de metabolitos secundarios bioactivos (López-Romero *et al.*, 2018).

Estudios farmacológicos con extractos de *Agave* muestran su potencial como anticancerígenos, antiinflamatorios, antihipertensivos, antiulcerogénicos, inmunomoduladores, antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos y antiparasíticos (López-Romero *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2017; Santos-Zea *et al.*, 2012; Sidana *et al.*, 2016); también han mostrado potencial de uso en la industria agrícola por sus efectos como molusquicida, larvicida, insecticida y fitotóxico (Abdel-Gawad *et al.*, 2015; Herbert-Doctor *et al.*, 2016). Las actividades biológicas y farmacológicas de los extractos de agaves derivan de compuestos bioactivos como flavonoides, terpenos, esteroides, fenoles y otros (López-Romero *et al.*, 2018; Santos-Zea *et al.*, 2012); sin embargo, la mayor parte de la bioactividad de los extractos de *Agave* ha sido atribuida a las saponinas. Sidana *et al.* (2016) compilaron las estructuras de 141 saponinas aisladas a partir de plantas, hojas, savia, rizomas, flores o callos *in vitro* de diferentes especies de *Agave*; enumerando sus actividades biológicas.

Las saponinas (del latín *sapo* o jabón) son metabolitos secundarios con propiedades surfactantes producidos por las plantas para defenderse contra patógenos y plagas (Sahu *et al.*, 2008; Wink, 1999). Las saponinas poseen gran diversidad estructural y están conformadas por una parte polar glucosídica y una apolar (aglicona). Su parte glucosídica está constituida por oligosacáridos lineales o ramificados. Se clasifican según la estructura de su aglicona en triterpénicas o esteroidales (Vincken *et al.*, 2007). Las saponinas se producen a través de la ruta de biosíntesis del escualeno-cicloartenol-sitosterol mediante reacciones de hidroxilación, oxidación, glicosilación y ciclación. Aunque algunas de las enzimas involucradas en la biosíntesis de las saponinas esteroidales han sido caracterizadas, la mayoría no se han estudiado, por lo que la ruta biosintética no está claramente establecida (Upadhyay *et al.*, 2018). Identificar cada una de las enzimas involucradas y estudiar la regulación de la ruta biosintética es un área de interés actual.

Los agaves producen saponinas esteroidales tipo furostanol o espirostanol, clasificadas según la estructura unida al C26 de la aglicona. Las saponinas tipo furostanol son precursoras de las del tipo espirostanol. Se ha propuesto que, en el último paso de la biosíntesis, la unidad de glucosa unida al hidroxilo del C26 del furostanol glucósido es escindida mediante hidrólisis por la furostanol

glucósido 26-O- $\beta$ -glucosidasa (F26G) para formar el glucósido tipo espirostanol (Upadhyay *et al.*, 2018). La única F26G nativa que ha sido purificada a homogeneidad y cuya actividad específica se ha demostrado es la furostanol glucósido 26-O- $\beta$ -glucosidasa aislada a partir de rizomas de *Costus speciosus* (Inoue y Ebizuka, 1996). Dos F26G recombinantes producidas en *E.coli* a partir de DNAs complementarios (cDNAs) de *C. speciosus* y *Dioscorea esculenta* han sido caracterizadas (Inoue *et al.*, 1996; Nakayasu *et al.*, 2015). En este trabajo se reportan ESTs (Expressed Sequence Tags) obtenidos a partir de cDNAs nativos de diferentes tejidos de *A. tequilana* Weber var. *azul*, potencialmente codificantes de tres diferentes secuencias similares a F26G; se determinó su expresión diferencial en tejidos vegetativos detectada con iniciadores específicos, así como protocolos de qPCR para su detección cuantitativa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Identificación de ESTs

La base de datos de secuencias ESTs AgaveDB del Colegio de Postgraduados-Campeche (Martínez-Hernández *et al.*, 2007) fue consultada para identificar ESTs cuyo análisis de BLASTX contra la base de datos no redundante (nr) de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) indicara homología con enzimas tipo F26G (Cuadro 1). AgaveDB contiene información de 35,000 ESTs secuenciados por Sanger (Simpson *et al.*, 2011) a partir de bibliotecas de cDNAs expresados en hojas, piña, raíz, meristemo vegetativo, meristemo floral, anteras, ovarios y sitios de emergencia de bulbilos en el tallo floral (Figura 1) (Martínez-Hernández *et al.*, 2010).

### Identificación de clones con cDNAs completos

Para identificar cDNAs completos, los ESTs se alinearon con ClustalOmega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) contra la región 5' de las secuencias codificantes (CDS) de la F26G de *C. speciosus* y *Asparagus officinalis*, para visualizar los alineamientos con BioEdit. Los posibles ATGs se identificaron traduciendo los ESTs con ExPASy. Para verificar el tamaño de los cDNAs clonados, los plásmidos extraídos según el método de lisis alcalina (Zhou *et al.*, 1990) se digirieron con la enzima *BsrGI* (Cat. No. R0575S, BioLabs) para escindir los cDNAs del vector pDONR222 donde se encuentran clonados (Martínez-Hernández *et al.*, 2010). Los productos de la digestión se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los tamaños de los fragmentos se determinaron usando como referencia un marcador de 1kb (Invitrogen Cat. 15615-016).

### Detección de la expresión por RT-PCR

Los oligonucleótidos usados como iniciadores específicos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se diseñaron para cada tipo de cDNA mediante el programa Primer design de NCBI dirigiéndolos a las zonas diferenciales ubicadas en el extremo 5' de los ESTs (Figura 2) y se sintetizaron por Invitrogen. La secuencia de los iniciadores diseñados y para el gen de actina se muestran en el Cuadro 2. Los plásmidos de las clonas que se utilizaron para los ensayos de especificidad y para las curvas estándar del PCR cuantitativo (qPCR) se purificaron con el QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen Cat. 27104) y se cuantificaron en un espectrofotómetro (Nanodrop 1000 Thermo Scientific; Waltham, Massachusetts, EUA). Para las curvas estándar se prepararon diluciones seriales 1:10 de cada plásmido por triplicado, incluyendo concentraciones de 1 ng a 0.1 pg. La síntesis de cDNA para el RT-PCR punto final se llevó a cabo conforme Martínez-Hernández *et al.* (2010) mediante la transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen Cat. 18080085) y 160 ng de mRNA.

### Cuantificación por qPCR

Las reacciones de PCR, tanto en punto final como para el protocolo de qPCR, se realizaron en un termociclador iQ5 BioRad con la enzima IQ SYBRGreen Supermix (BioRad Cat. 170-8880) y 20 pmoles de iniciadores por reacción. Los programas de PCR consistieron de un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguido de ciclos de amplificación de 30 s a 95 °C, 30 s a la temperatura de

alineamiento (Ta) de cada iniciador conforme el Cuadro 2, 30 s a 72 °C y un ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min. Se realizaron 25 ciclos para la prueba de especificidad o 35 ciclos para el RT-PCR punto final y la curva estándar. Los ciclos umbral (Ct) y las temperaturas de disociación (Tm) de los productos se determinaron con el iQ5 Optical System Software 2.0. Controles negativos sin DNA molde se realizaron en paralelo. El tamaño de los productos se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % usando marcadores de peso molecular de 100 y 50 pb (Invitrogen Cat. 15628-050 y 10416014).

Las curvas estándar para el qPCR se construyeron conforme a lo recomendado para realizar cuantificación absoluta (Heid *et al.*, 1996), los Ct se graficaron con respecto al logaritmo en base 10 de las distintas concentraciones de plásmido utilizadas. Cada valor de Ct representó la media aritmética de los triplicados de cada concentración. Se graficó la desviación estándar de cada punto. Se generó la recta de regresión por el método de los mínimos cuadrados y se calculó el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación de ESTs similares a F26G

Mediante la búsqueda de ESTs en la base de datos AgaveDB por BLASTX se identificó a 46 ESTs de *A. tequilana* Weber var. *azul* similares a la furostanol glicósido 26-O-β-glucosidasa (F26G) de *C. speciosus*, codificante de la

**Cuadro 1. Hits del BLASTX de ESTs de *A. tequilana* contra base de datos nr.**

EST	Secuencia similar (Hit)	Cobertura	Expectancia (E-value)	Identidad	# Acceso GenBank
flant008_b07	F26G-like [ <i>A. officinalis</i> ]**	95%	4.00E-130	68%	MN174800
	F26G [ <i>C. speciosus</i> ]*	79%	3.00E-101	67%	
raz002_g10	F26G-like [ <i>A. officinalis</i> ]**	73%	8.00E-90	69%	MN174801
	F26G [ <i>C. speciosus</i> ]*	79%	5.00E-84	65%	
raz005_d09	F26G-like [ <i>A. officinalis</i> ]**	74%	8.00E-97	71%	MN174802
	F26G [ <i>C. speciosus</i> ]*	79%	6.00E-90	65%	
flant015_e11	F26G-like [ <i>A. officinalis</i> ]**	66%	2.00E-77	72%	MN174803
	F26G [ <i>C. speciosus</i> ]*	73%	3.00E-71	66%	
flant013_a03	F26G-like [ <i>A. officinalis</i> ]**	68%	5.00E-95	73%	MN174804
	F26G [ <i>C. speciosus</i> ]*	91%	2.00E-87	58%	
flant019_e10	F26G-like [ <i>A. officinalis</i> ]**	88%	1.00E-69	61%	MN174805
	F26G [ <i>C. speciosus</i> ]*	71%	4.00E-64	68%	

Código de acceso del hit en NCBI: \* Q42707.1, \*\* XP\_020250593.1, \*\*\* XP\_020246472.1, \*\*\*\* XP\_008807567.2

única enzima nativa para la que ha sido demostrada su actividad. En la Figura 1 se muestra la distribución de los 46 EST conforme a los tejidos a partir de los cuales fueron clonados y secuenciados. El 50 % de los ESTs similares a F26G provienen de anteras. Otra cantidad importante de ESTs provienen de ovarios y raíces. Considerando que de cada biblioteca se secuenció una cantidad similar de ESTs (Simpson *et al.*, 2011), la proporción diferente de ESTs similares a F26G encontrados entre bibliotecas es un referente indirecto del nivel de su expresión en el tejido a partir del cual se construyó cada biblioteca. Estos resultados concuerdan en que tanto la flor como la raíz son órganos productores de saponinas en agaves (Pérez *et al.*, 2013; Sidana *et al.*, 2016); sin embargo, se encontraron relativamente pocos ESTs en hojas, órgano a partir del cual se han extraído la mayoría de las saponinas de *Agave* (Sidana *et al.*, 2016). Análisis de expresión de las enzimas involucradas en la biosíntesis de saponinas, como la F26G, en diversos tejidos de *Agave* permitirán verificar cuáles órganos producen saponinas y cuáles las acumulan, así como las condiciones medioambientales que regulan su producción.

**cDNAs codificantes de distintas enzimas similares a F26G**

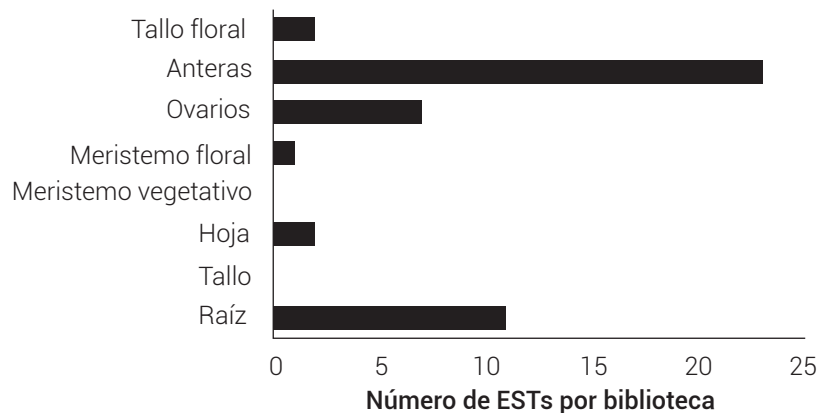
Los 46 ESTs se alinearon y compararon contra CDS de *C. speciosus*, identificándose seis distintos ESTs que alinearon hacia el extremo 5' de los CDS de referencia (Figura 2), lo que sugiere que provienen de cDNAs que se clonaron completos, lo que indica que la transcriptasa inversa alcanzó la región 5' del transcrito. Cuatro ESTs provienen de anteras (flant008\_b07, flant015\_e11, flant013\_a03 y flant019\_e10) y dos de raíz (raz002\_g10 y raz005\_d09). Estos seis ESTs fueron comparados mediante BLASTX contra nr (Cuadro 1). Todos mostraron mayor similitud a la enzima similar a F26G deducida a partir de secuencias genómicas de *A. officinalis* que a la F26G de *C. speciosus*, lo cual es congruente con que *A. tequilana* pertenece a la familia de las Asparagaceae. La expectancia (*E-value*) de los ESTs contra las secuencias similares identificadas (*hits*) es altamente significativa, pero el porcentaje de identidad es relativamente bajo, por lo que se consideran similares a F26G. La cobertura fue en promedio del 70 %, ya que los ESTs divergen de sus hits en el extremo 5'.

En el alineamiento de la Figura 2 se muestra que los primeros 250 nucleótidos (nt) de la región 5' es una zona

**Cuadro 2. Iniciadores utilizados para amplificar cDNAs similares a F26G.**

cDNA	Iniciador	Forward 5' - 3'	Reverse 5' - 3'	Ta (°C)	pb
flant008_b07	2842_2_8	TTTCAGCTAGGCCTC CCCTTG	CGCACTTCGTCCATCTTCCCT	64.5	100
raz002_g10	2256_4_12	GGCACAACCTCCTTAGCTTCCCA	TGGTGGCAGTCACCTTCACG	67.5	116
flant015_e11	2988_12_14	TGACCACAGCCATCCCTGCT	TCTGGCTCTTTCACAACGGTAGGC	67.5	100
Actina		GTGACAATGGAACCTGGAATGG	GCTCACACCATCACCAGAATC	63	400

Ta: temperatura de alineamiento, pb: tamaño esperado del producto. El gen de actina se usó como control de expresión constitutiva.



**Figura 1. Número de ESTs secuenciados a partir de diferentes bibliotecas de cDNAs de *A. tequilana*. Cada biblioteca se generó a partir de mRNA expresado en los órganos indicados.**

variable entre los seis ESTs de *A. tequilana* y los CDS de referencia; sin embargo, a partir de ese punto presentan clara similitud, la cual se mantiene a todo lo largo de la secuencia de los ESTs (750-870 nt). Se requiere secuenciar el lado 3' de los cDNAs clonados para completar el alineamiento. En la figura se muestran los posibles ATGs, lo que sugiere que la región variable incluye los UTRs 5' y el extremo N-terminal de las proteínas codificadas.

En el alineamiento también se puede observar que las secuencias de *A. tequilana* son similares entre sí, pero hay mayor similitud entre las dos secuencias de raíz o entre tres secuencias de anteras, mientras que la secuencia flant008\_b07 muestra mayor similitud con *A. officinalis*. Lo anterior sugiere que hay al menos tres distintos tipos de F26G en *A. tequilana*. En *A. officinalis* y *Musa acuminata* hay dos genes de F26G y en *Phoenix dactylifera* se identificaron

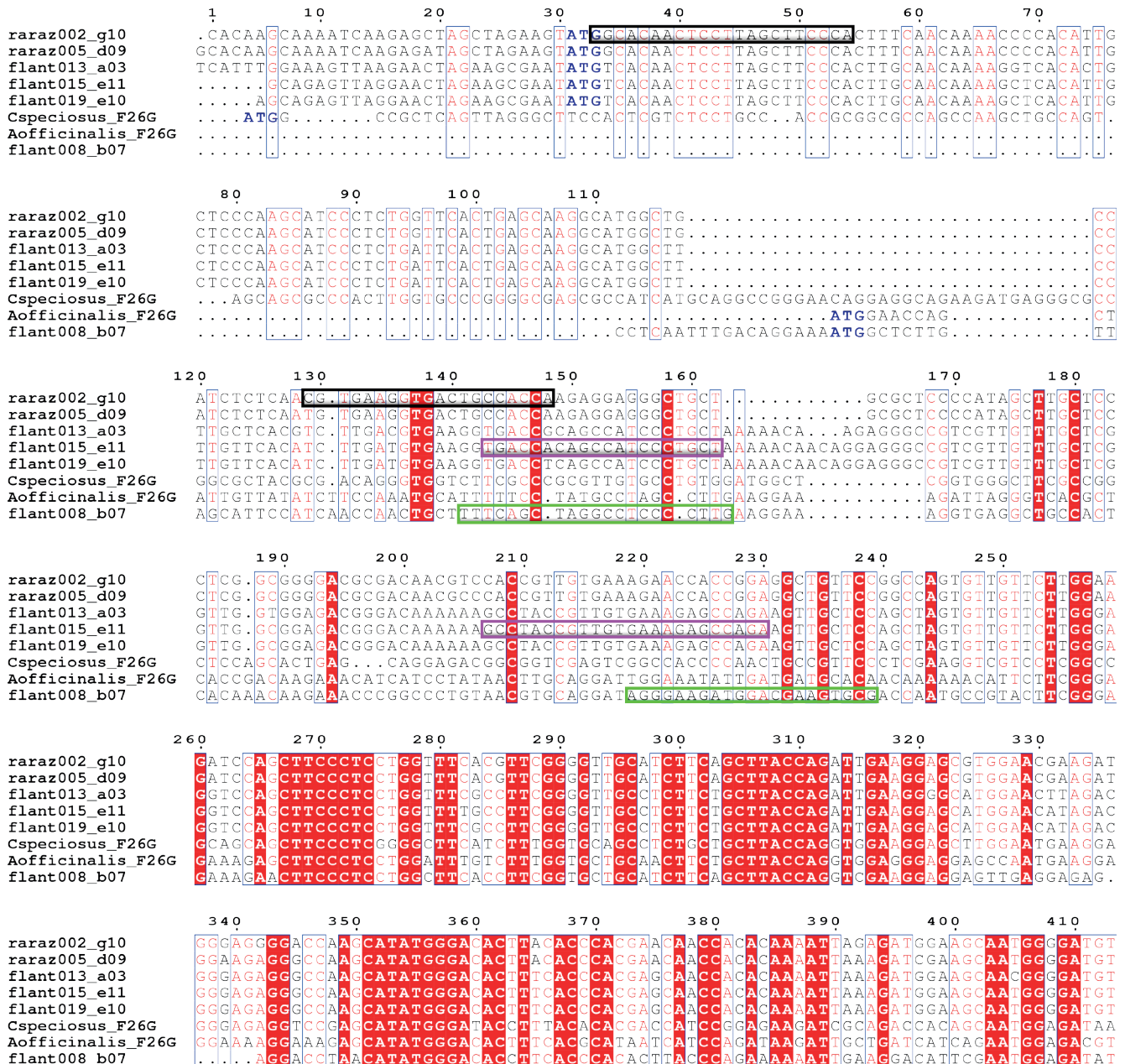


Figura 2. Alineamiento de ESTs de *A. tequilana* ubicados hacia el extremo 5' del CDS de la F26G de *Costus speciosus* y *Asparagus officinalis*. Los recuadros a color señalan el sitio blanco de los iniciadores específicos para las clonas flant008\_b07 (verde), raraz002\_g10 (negro) y flant015\_e11 (rosa). Los codones de inicio de los CDS de referencia, así como los posibles ATGs de las enzimas similares a F26G de *A. tequilana* se resaltan en color azul.

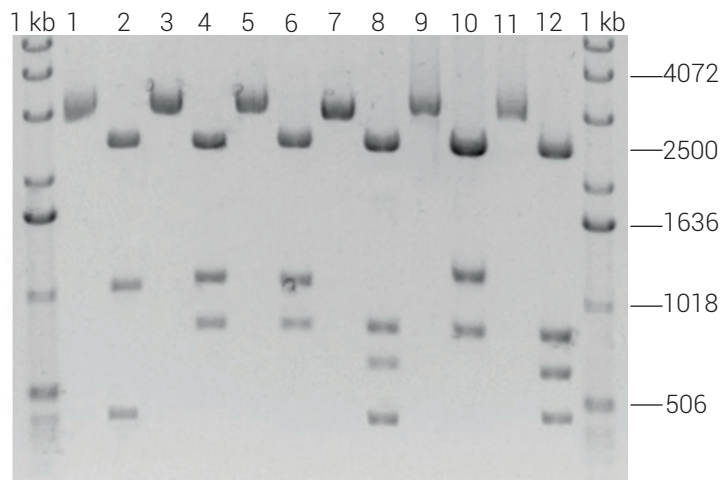


Figura 3. Digestión de clonas de *A. tequilana* liberando cDNAs similares a F26G. Los plásmidos fueron digeridos con *Bsr*GI. Carriles 1 y 2: flant008\_b07, 3 y 4: raz002\_g10, 5 y 6: raz005\_d09, 7 y 8: flant015\_e11, 9 y 10: flant013\_a03, 11 y 12: flant019\_e10. Carriles 1, 3, 5, 7, 9, 11: DNA plasmídico sin digerir. Carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12: plásmidos digeridos. 1 kb: marcador de peso molecular.

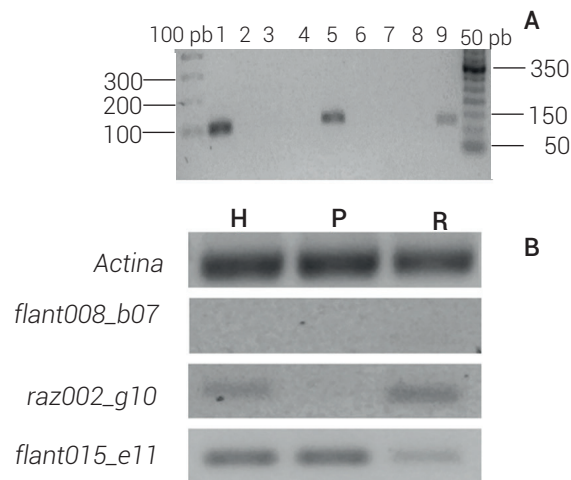


Figura 4. A) Productos de PCR de la amplificación específica de clonas que contienen cDNAs de enzimas similares a F26G de *A. tequilana*. Carriles 1, 4 y 7: flant008\_b07; 2, 5 y 8: raz002\_g10; 3, 6 y 9: flant015\_e11. Amplificados con los iniciadores 2842\_2\_8 en carriles 1-3, 2256\_4\_12 en carriles 4-6 y 2988\_12\_14 en carriles 7-9; 100 pb y 50 pb son marcadores de peso molecular. B) Expresión diferencial de transcritos de las tres F26G similares en hoja (H), piña (P) o raíz (R) de *A. tequilana* detectados por RT-PCR utilizando los iniciadores específicos de (A). Actina: control de expresión constitutiva en hoja, piña y raíz.

nueve loci de F26G por lo que, aunque en *C. speciosus* solo se caracterizó una F26G, es factible la existencia de una familia de F26G en *Agave*.

Para determinar si el tamaño de los cDNAs insertados en las clonas a partir de las cuales se secuenciaron estos seis ESTs coinciden con la longitud del CDS de la F26G de *C. speciosus*, fueron escindidos con la enzima *Bsr*GI del vector donde se encuentran clonados. En la Figura 3 se muestran los fragmentos de 2.5 Kb que corresponden

al vector sin inserto y el resto de los fragmentos que conforman el cDNA liberado, seccionado por cortes internos con la enzima. Cinco de las seis clonas liberaron fragmentos que en total suman aproximadamente 1900 pb, tamaño coincidente con la longitud del CDS de la F26G de *C. speciosus* más los UTRs, lo que indica que son cDNAs que se clonaron completos. En el caso de la clona flant008\_b07, la más divergente en el alineamiento de la Figura 2, el cDNA es más pequeño (1500 pb), por lo que podría estar incompleto o tener una N-terminal más corta.

### Las enzimas similares a F26G de *A. tequilana*

Para estudiar la expresión de los tres tipos de F26G identificados en *A. tequilana* se diseñaron iniciadores específicos para reacciones de PCR dirigidos a la región 5' variable de cada tipo de EST (Figura 2). En el Cuadro 2 se muestran las secuencias de los iniciadores, las temperaturas de alineamiento (Ta) utilizadas en el PCR y el tamaño esperado de cada producto. Para verificar su especificidad, los iniciadores se probaron contra las clonas de los tres tipos de cDNAs. En la Figura 4A se muestra que, bajo las condiciones establecidas, los iniciadores amplifican específicamente la clona para la cual fueron diseñados, generando productos del tamaño esperado. Mediante los iniciadores específicos se detectó la expresión de los tres tipos de transcrito de F26G-like en tejidos vegetativos de *A. tequilana* (hoja, piña y raíz) mediante RT-PCR. En la Figura 4B se observa que, a diferencia del transcrito de actina expresado en los tres tejidos analizados, cada transcrito de F26G-like de *Agave* tiene un patrón de expresión distinto; así, flant008\_b07, clonado de anteras, no se detecta en ninguno de los tejidos vegetativos analizados, mientras que raz002\_g10 se detectó en hoja y en raíz, y flant015\_e11 se detectó en los tres tejidos. Los patrones de expresión distintos concuerdan con la hipótesis de que estos ESTs representan a tres diferentes F26G de *A. tequilana*.

Para evaluar la utilidad de los iniciadores específicos para realizar PCR cuantitativo se generó una curva de disociación de los productos. En la Figura 5A se muestra que los iniciadores propuestos generan un único pico de disociación a la temperatura de fusión (Tm) del producto y que los controles sin DNA no producen picos adicionales por dímeros u horquillas, por lo que cumplen con las características para ser usados en qPCR. En la Figura 5B se observa que los protocolos de qPCR utilizados permiten detectar de forma lineal de 1 ng a 0.1 pg de plásmido que contiene cada cDNA de F26G-like de *A. tequilana*, por lo que pueden ser aplicados con alta sensibilidad en la cuantificación absoluta de estos genes (Heid *et al.*, 1996) y aplicarlos en la cuantificación de cDNAs sintetizados a partir de transcritos con bajos niveles de expresión durante estudios de regulación de su expresión génica.

A pesar de los numerosos estudios que reportan estructuras químicas y actividades biológicas de saponinas esteroidales del género *Agave*, las enzimas que participan en su ruta de biosíntesis se desconocen y sólo algunas han sido incipientemente estudiadas en otras plantas (Upadhyay *et al.*, 2018). En el caso de la F26G, que participa en el último paso transformando las saponinas tipo furostanol a tipo espirostanol, sólo han sido caracterizadas bioquímicamente mostrando actividad específica la enzima nativa aislada a homogeneidad

de *C. speciosus* (Inoue y Ebizuka, 1996) y dos proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* (Inoue *et al.*, 1996; Nakayasu *et al.*, 2015).

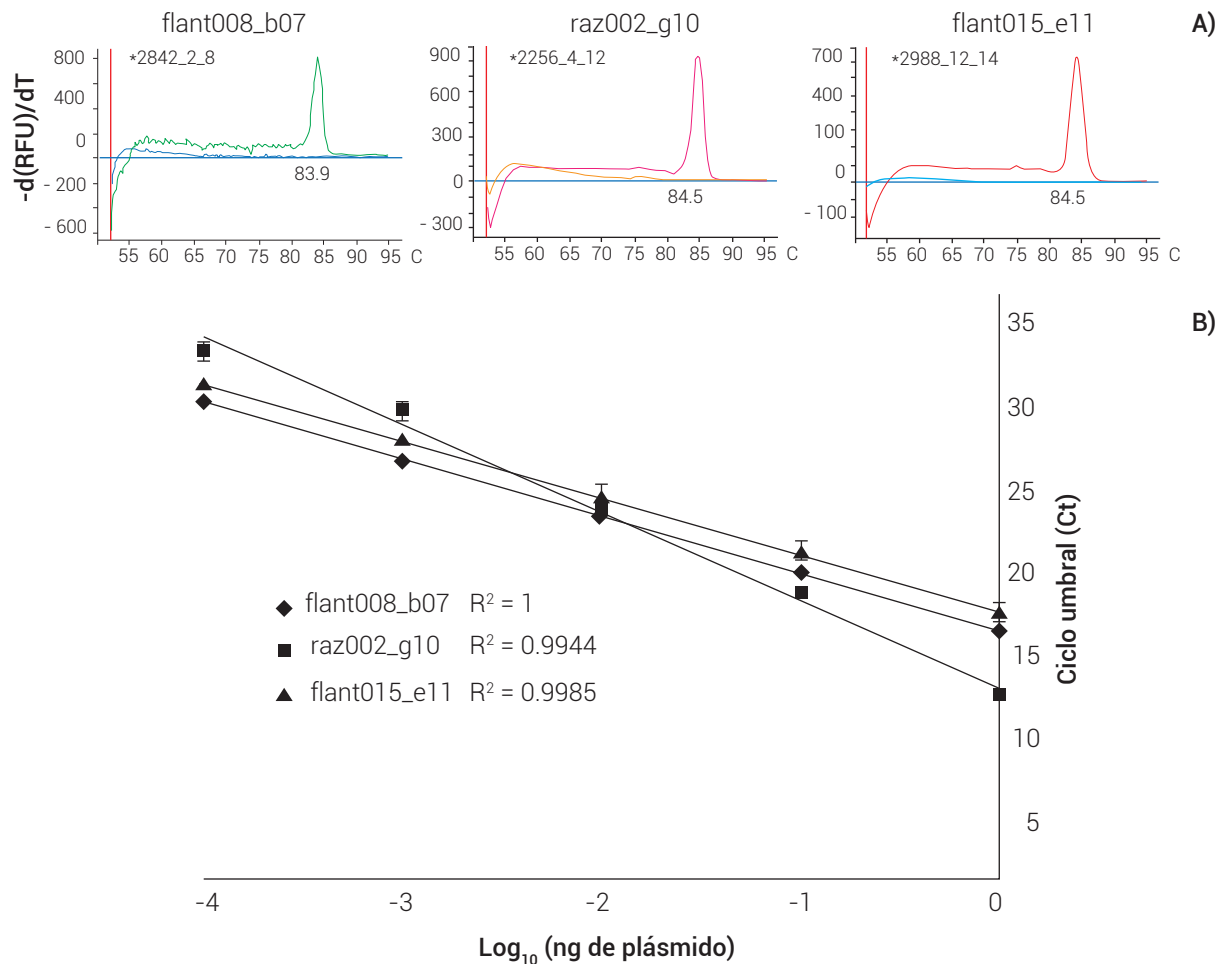
Transcritos de *Asparagus*, *Allium*, *Dracaena*, *Chlorophytum*, *Trillium* y *Dioscorea* potencialmente involucrados en la ruta de biosíntesis de saponinas esteroidales han sido identificados a través de análisis transcriptómicos de seqRNA bajo el criterio de que un incremento en la producción de saponinas correlaciona con el aumento de esos transcritos (Upadhyay *et al.*, 2018); así mismo, CDS de F26G-like de *Asparagus*, *Phoenix* y *Musa*, deducidos a partir de sus genomas, fueron identificados por su similitud con la F26G de *C. speciosus*; sin embargo, en todos esos casos sus cDNAs nativos no han sido clonados, no se ha demostrado la actividad de las enzimas codificadas y los estudios de regulación génica son incipientes, por lo que queda mucho por hacer para comprender el papel de esta enzima en la producción de saponinas en plantas monocotiledóneas, su papel fisiológico y su potencial biotecnológico. Los cDNAs clonados identificados en este trabajo podrán ser expresados en sistemas recombinantes para la caracterización bioquímica de las F26G de *A. tequilana* y los protocolos de qPCR establecidos podrán ser aplicados en la cuantificación de su expresión génica durante estudios de regulación de la biosíntesis de saponinas esteroidales por factores intrínsecos o medioambientales.

### CONCLUSIONES

Se reportan por primera vez secuencias parciales de al menos tres distintos tipos de cDNAs nativos, clonados a partir de *Agave tequilana* Weber var. *azul*, con patrón de expresión tisular diferencial, similares a la furostanol glicosido 26-O- $\beta$ -glucosidasa, enzima responsable de la conversión de saponinas tipo furostanol al tipo espirostanol durante la biosíntesis de saponinas esteroidales. Se establecieron protocolos útiles para la cuantificación de los tres tipos de enzimas similares a F26G de *A. tequilana*, aplicables a estudios de regulación de su expresión durante la biosíntesis de saponinas en *Agave*.

### AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por los proyectos SEP-Ciencia Básica 44404 y FOMIX CONACYT 23821 otorgados a AMH y por la beca PNPC 453332a ZMG. Del CINVESTAV Irapuato: a R. Escobar por la colecta de las anteras a partir de las cuales construimos la biblioteca, a J. Simpson por permitirnos analizar los ESTs de sus bibliotecas y a O. Martínez por la base de datos A J. Chávez P. por la instalación de la AgaveDB.



**Figura 5.** Amplificación cuantitativa de clones que contienen cDNAs de enzimas similares a F26G de *A. tequilana*. **A)** Curvas y Temperaturas de disociación (T<sub>m</sub>) de los productos de PCR de clones de cDNAs de F26G de *A. tequilana* (flant008\_b07, raz002\_g10 y flant015\_e11) amplificadas con los iniciadores específicos. Las líneas inferiores en cada gráfica corresponden a los controles negativos sin DNA molde. Los números debajo de los picos indican la T<sub>m</sub> en °C. **B)** Curva estándar de amplificación por qPCR de concentraciones seriales (de 1 ng a 0.1 pg por reacción) de cada clona, utilizando los iniciadores específicos de (A). Las barras en cada punto representan la desviación estándar de la media de los triplicados del Ciclo umbral (Ct) por concentración. Las líneas representan la recta de regresión y R<sup>2</sup> es el coeficiente de determinación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Gawad M. M., H. A. El-Nahas and N. S. Osman (2015) Molluscicidal activity of steroidal saponins isolated from *Agave angustifolia*. *Global Journal of Pharmacology* 9:138-143, <https://doi.org/10.5829/idosi.gjp.2015.9.2.9496>
- APG III, The Angiosperm Phylogeny Group (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161:105-121, <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x>
- Cedeño M. C. (1995) Tequila production. *Critical Reviews in Biotechnology* 15:1-11, <https://doi.org/10.3109/07388559509150529>
- Colunga-GarcíaMarín P. and F. May-Pat (1993) Agave studies in Yucatán, México. I. Past and present germplasm diversity and uses. *Economic Botany* 47:312-327, <https://doi.org/10.1007/BF02862301>
- Dalton R. (2005) Alcohol and science: saving the agave. *Nature* 438:1070-1071, <https://doi.org/10.1038/4381070a>
- Davidson J. R. and B. R. Ortiz De Montellano (1983) The antibacterial properties of an aztec wound remedy. *Journal of Ethnopharmacology* 8:149-161, [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(83\)90051-X](https://doi.org/10.1016/0378-8741(83)90051-X)
- Davis S. C., F. G. Dohleman and S. P. Long (2011) The global potential for *Agave* as a biofuel feedstock. *Global Change Biology Bioenergy* 3:68-78, <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2010.01077.x>
- Díaz-Martínez M., A. Nava-Cedillo, J. A. Guzmán-López, R. Escobar-Guzmán and J. Simpson (2012) Polymorphism and methylation patterns in *Agave tequilana* Weber var. 'Azul' plants propagated asexually by three different methods. *Plant Science* 185-186:321-330, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.01.004>
- García-Mendoza A. J., M. J. Cházaro-Basañez, J. Nieto-Sotelo, L. F. Sánchez-Teyer, E. Tapia-Campos, J. F. Gómez-Leyva, ... A. Gutiérrez-Mora (2017) *Agave*. In: Panorama del Aprovechamiento de los Agaves en México. AGARED, Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves (ed.). Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. CONACYT-CIATEJ-AGARED. Guadalajara, Jalisco. pp:15-68.



- García-Mendoza A. y R. Galván V. (1995) Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56:7-24, <https://doi.org/10.17129/botsoci.1461>
- Gentry H. S. (1982) *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. Tucson, Arizona, USA. 670 p.
- Heid C. A., J. Stevens, K. J. Livak and P. M. Williams (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6:986-994, <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Herbert-Doctor L. A., M. Saavedra-Aguilar, M. L. Villarreal, A. Cardoso-Taketa and O. Vite-Vallejo (2016) Insecticidal and nematocidal effects of *Agave tequilana* juice against *Bemisia tabaci* and *Panagrellus redivivus*. *Southwestern Entomologist* 41:27-40, <https://doi.org/10.3958/059.041.0105>
- Inoue K. and Y. Ebizuka (1996) Purification and characterization of furostanol glycoside 26-O- $\beta$ -glucosidase from *Costus speciosus* rhizomes. *Federation of European Biochemical Societies* 378:157-160, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01447-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01447-0)
- Inoue K., M. Shibuya, K. Yamamoto and Y. Ebizuka (1996) Molecular cloning and bacterial expression of a cDNA encoding furostanol glycoside 26-O- $\beta$ -glucosidase of *Costus speciosus*. *Federation of European Biochemical Societies* 389:273-277, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00601-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00601-1)
- López-Romero J. C., J. F. Ayala-Zavala, G. A. González-Aguilar, E. A. Peña-Ramos y H. González-Ríos (2018) Biological activities of *Agave* by-products and their possible applications in food and pharmaceuticals. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98:2461-2474, <https://doi.org/10.1002/jsfa.8738>
- Martínez-Hernández A., M. A. Mena-Espino, A. H. Herrera-Estrella y P. Martínez-Hernández (2010) Construcción de bibliotecas de ADNc y análisis de expresión génica por RT-PCR en agaves. *Revista Latinoamericana de Química* 38:21-44.
- Martínez-Hernández A., J. Pastrana-Chávez, A. Sánchez-Villarreal, J. Lara-Reyna, L. Herrera-Estrella, A. Herrera-Estrella, O. Martínez V. y J. Simpson-Williamson (2007) Genómica de *Agave tequilana*: identificación de genes útiles para la industria tequilera y el desarrollo de usos alternativos del agave. *In: Memorias in extenso de la 2ª Reunión de Innovación Tecnológica Agrícola y Forestal (RNIAF)*. Guadalajara, Jal. México. 20 p.
- Nakayasu M., T. Kawasaki, H. J. Lee, Y. Sugimoto, M. Onjo, T. Muranaka and M. Mizutani (2015) Identification of furostanol glycoside 26-O- $\beta$ -glucosidase involved in steroidal saponin biosynthesis from *Dioscorea esculenta*. *Plant Biotechnology* 32:299-308, <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.15.1023b>
- Pereira G. M., M. G. Ribeiro, B. P. da Silva and J. P. Parente (2017) Structural characterization of a new steroidal saponin from *Agave angustifolia* var. *marginata* and a preliminary investigation of its *in vivo* antitumorogenic activity and *in vitro* membrane permeability property. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 27:4345-4349, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.026>
- Pérez A. J., J. M. Calle, A. M. Simonet, J. O. Guerra, A. Stochmal and F. A. Macías (2013) Bioactive steroidal saponins from *Agave offoyana* flowers. *Phytochemistry* 95:298-307, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.06.020>
- Sahu N. P., S. Banerjee, N. B. Mondal and D. Mandal (2008) Steroidal saponins. *In: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Vol. 89. A. D. Kinghorn, H. Falk and J. Kobayashi (eds.). Springer-Verlag, Vienna, Austria. pp:45-141, [https://doi.org/10.1007/978-3-211-74019-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-211-74019-4_2)
- Santos-Zea L., A. M. Leal-Díaz, E. Cortés-Ceballos and J. A. Gutiérrez-Urbe (2012) *Agave* (*Agave* spp.) and its traditional products as a source of bioactive compounds. *Current Bioactive Compounds* 8:218-231, <https://doi.org/10.2174/157340712802762410>
- Secretaría de Economía (2012) Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012, Bebidas alcohólicas-tequila-especificaciones. Diario Oficial de la Federación, Primera Sección, 13 de diciembre de 2012. México, D.F. pp:4-24.
- Sidana J., B. Singh and O. P. Sharma (2016) Saponins of *Agave*: chemistry and bioactivity. *Phytochemistry* 130:22-46, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.06.010>
- Simpson J., A. Martínez H., M. J. Abraham J., S. Delgado S., A. Sánchez V. and C. Cortés R. (2011) Genomic resources and transcriptome mining in *Agave tequilana*. *Global Change Biology Bioenergy* 3:25-36, <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2010.01079.x>
- Stewart J. R. (2015) *Agave* as a model CAM crop system for a warming and drying world. *Frontiers in Plant Science* 6:684, <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00684>
- Trejo L., V. Limones, G. Peña, E. Scheinvar, O. Vargas-Ponce, D. Zizumbo-Villarrea and P. Colunga-GarcíaMarín (2018) Genetic variation and relationships among agaves related to the production of tequila and mezcal in Jalisco. *Industrial Crops and Products* 125:140-149, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.072>
- Upadhyay S., G. S. Jeena, Shikha and R. K. Shukla (2018) Recent advances in steroidal saponins biosynthesis and *in vitro* production. *Planta* 248:519-544, <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2911-0>
- Vincken J. P., L. Heng, A. de Groot and H. Gruppen (2007) Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68:275-297, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.10.008>
- Wink M. (1999) Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology. *Annual Plant Reviews*. Vol. 3. Sheffield Academic Press. London, UK. 370 p.
- Zhou C., Y. Yang and A. Y. Jong (1990) 'Mini-prep' in ten minutes. *Biotechniques* 8:172-173.