

CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS DE ADNc Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR EN AGAVES

AÍDA MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ^{*a}, MA. ESTHER MENA-ESPINO^a, ALFREDO H. HERRERA-ESTRELLA^b, PEDRO MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ^b.

(Received November 2009; Accepted March 2010)

ABSTRACT

Mexico is the center of origin and diversification of agave, a highly valued crop in the agroindustry, as well as in Mexican culture. Agaves present unique biological characteristics, such as their high tolerance to abiotic stress that allows them to grow under extreme environmental conditions, and their secondary metabolism that leads to the production of molecules of biotechnological interest. However, the necessary tools to carry out molecular physiology studies in *Agave*, and disclose the subjacent molecular basis of their particular metabolic capacity, have not been developed. Here we evaluate the performance of a series of commercially available methods for RNA extraction and mRNA purification that may be suitable for the construction of cDNA libraries derived from different *A. tequilana* tissues, a process described in detail. In addition, we report sequences and methods for the analysis of gene expression using RT-PCR for physiologically relevant agave genes. Expression of *rbcS*, encoding the small subunit of the RuBisCO; a gene encoding an NADP⁺ dependent malic enzyme; a gene encoding 1-SST fructosyltransferase; and a gene coding for a LEA-like abiotic stress related protein of *A. tequilana*, was analyzed using this methods. The methods set forth herein, and the libraries generated will subsequently be applied to molecular physiology, functional genomics, and transcriptome analysis of agaves.

Key words: *Agave tequilana*, RNA extraction, cDNA libraries, gene expression, RT-PCR.

RESUMEN

Méjico es el centro de origen y diversificación de los agaves, un cultivo agroindustrial con enorme valor cultural en este país. Los agaves poseen relevantes características biológicas como su gran tolerancia a estrés abiótico, que les permite desarrollarse bajo condiciones ambientales extremas; o su metabolismo secundario, mediante el cual producen moléculas de interés biotecnológico. Sin embargo, las herramientas

^aLaboratorio de biología molecular y análisis genómico. Campus Campeche, Colegio de Postgraduados. Carretera federal Haltunchén-Edzná Km 17.5 C.P. 24450 Sihochac, Champotón, Campeche. México.

^bLaboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Campus Guanajuato. Km 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León C.P. 36821 Irapuato, Guanajuato, México.

*corresponding author: Tel. +52 (55) 58 04 68 00 ext. 64700, fax +52 (981) 8112112, aidamh@colpos.mx

necesarias para realizar estudios de fisiología molecular, o para determinar las bases moleculares sobre las que subyacen las particulares capacidades metabólicas de los agaves, no han sido desarrolladas.

En este trabajo evaluamos la efectividad de métodos comerciales de extracción de ARN total y purificación de ARNm para la construcción de bibliotecas de ADNc a partir de diferentes tejidos de *A. tequilana*, proceso que describimos en detalle. También reportamos secuencias y métodos para análisis de expresión por RT-PCR de genes de agave importantes para su fisiología como *rbcS*, codificador de la sub-unidad pequeña de la RuBisCO; el de la enzima málica dependiente de NADP⁺; de la *1-SST* fructosiltransferasa; y un gen de proteínas de estrés abiótico tipo LEA. Los métodos aquí reportados, y las bibliotecas generadas, podrán ser utilizados en estudios de fisiología molecular, genómica funcional, y análisis transcriptómico en agaves.

Palabras clave: *Agave tequilana*, extracción de ARN, bibliotecas de ADNc, expresión génica, RT-PCR.

ABREVIATURAS

ADN (ácido desoxirribonucleico), ADNg (ADN genómico), ADNc (ADN complementario), ARN (ácido ribonucleico), ARNr (ARN ribosomal), ARNm (ARN mensajero), ARNasas (Ribonucleasas), pb (pares de bases), kb (kilobases), EtBr (Bromuro de etidio), PCR (siglas en inglés de Reacción en Cadena de la Polimerasa), EST (siglas en inglés de “Etiquetas de secuencias expresadas”), LEA (siglas en inglés de “Abundantes en la Embriogénesis Tardía”), CAM (siglas en inglés de “Metabolismo Ácido de las Crasuláceas”), DEPC (DiEtilPiroCarbonato), BLAST (siglas en inglés de “Herramienta Básica de Búsqueda por Alineamiento Local”), NCBI (siglas en inglés de “Centro Nacional para Información Biotecnológica”), UTR (siglas en inglés de “Regiones no Traducibles”), GI (siglas en inglés de “Índice de Genes”), ORF (siglas en inglés de “Marco de Lectura Abierto”).

INTRODUCCIÓN

Los agaves son plantas cuyo centro de origen es México. Alrededor del 75% de las más de 150 especies de *Agave* se encuen-

tran en este país, y alrededor del 50% son endémicas (García-Mendoza, 1995; García-Mendoza y Galván-Villanueva, 1995). Los agaves y sus productos fueron de tal importancia para las culturas mesoamericanas, que incluso los asociaban a la deidad Mayahuel. Los numerosos usos de los agaves en épocas prehispánicas incluyen el uso de sus fibras en la fabricación de ropa, calzado y múltiples utensilios; el uso de sus espinas como agujas y en rituales religiosos; la extracción de bebidas nutraceuticas como el agua miel y la producción de fermentados como el pulque; el uso de sus pencas cocidas como alimento; en construcción, ornato y como forraje; y usos medicinales (Parson y Parsons, 1990; Granados-Sánchez, 1993; Lozoya, 1995; Ramírez, 1995). 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).

El género *Agave* posee características biológicas tan relevantes que su nombre, asignado por Carlos Linneo, significa “admirable”. Entre dichas características se incluyen sus adaptaciones morfo-fisiológicas y su metabolismo “CAM”, o metabolismo ácido de las crasuláceas; que les confieren la capacidad de ser altamente tolerantes a condiciones ambientales extremas (Nobel, 1988; Nobel, 1994); y su complejo metabolismo secundario. Las diferentes especies de agaves se distribuyen en una gran diversidad de ambientes (García-Mendoza, 2002); desde zonas áridas y semiáridas, laderas, suelos rocosos poco profundos y pobres en nutrientes, hasta zonas costeras, e incluso como epífitas en selvas tropicales. La capacidad del género *Agave* para colonizar ambientes áridos podría estar relacionada con su alta tasa de especiación, reportada por Good-Ávila y cols. (2006). La adaptabilidad de los agaves a condiciones con poca disponibilidad de agua los hace un cultivo viable para las extensas zonas áridas y semiáridas, que en México ocupan alrededor del 75% del territorio; así como para terrenos no aptos para otros cultivos, como las laderas rocosas, en las cuales además coadyuvan evitando la erosión del suelo.

Actualmente varias especies de agave son aprovechadas como materia prima en procesos tradicionales y agroindustriales (recientemente revisado por Narváez-Zapata y Sánchez-Teyer, 2009). *Agave tequilana* Weber var. azul, es la 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 (Cedeño, 1995; Dalton, 2005). Otras especies son utilizadas para producir fermentos y destilados como el pulque, el mezcal, o el sotol; actividades con relativa importancia económica para distintas regiones del país. El henequén (*A. fourcroydes*), denominado el “oro verde”, tuvo una gran relevancia económica en la Península de Yucatán por la producción de fibra natu-

ral. La relativamente baja diversidad genética intraespecífica de las plantaciones de *A. tequilana* y *A. fourcroydes* establecidas por propagación vegetativa, ha sido determinada mediante marcadores moleculares (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1999; Gil-Vega *et al.*, 2006; Bousios *et al.*, 2007; Vargas-Ponce *et al.*, 2009). La fibra del *A. sisalana* sigue siendo aprovechada actualmente en países como Brasil, Kenia y Tanzania (<http://www.fao.org/es/ESC/common/ecg/323/en/STAT BULL 2009.pdf>; <http://www.fao.org/DOCREP/>). Productos industriales alternativos derivables de los agaves; como excipientes farmacológicos para liberación en colón, biomateriales de construcción, o bioenergía; comienzan a ser explorados (Annunciado *et al.* 2005; Bhimte y Tayade, 2007; Muthangya *et al.*, 2009).

A través de su metabolismo secundario, los agaves biosintetizan productos naturales bioactivos de alto valor agregado como sapogeninas esteroidales con propiedades antiinflamatorias, antiparasitarias, o hemolíticas, aplicables en medicina tropical o como molusquicidas y larvicidas (Peana *et al.*, 1997; Pizarro *et al.*, 1999; Abdel-Kader *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2006; Guerra *et al.*, 2008); sapogeninas con actividad citotóxica y potencial anticancerígeno (Bianchi y Cole, 1969; Ohtsuki *et al.*, 2004; Yokosuka *et al.*, 2009); antibióticos (Davidson y Ortiz de Montellano, 1983); flavonas y flavonoides con actividad inmunosupresora (Chen *et al.*, 2009); y sustancias dermorrítantes (Salinas *et al.*, 2001; Genillier-Foin y Avenel-Audran, 2007). Los agaves también producen biopolímeros de interés industrial, como los oligofructanos, carbohidratos de alto peso molecular utilizados como materia prima para la fermentación durante la producción del mezcal y tequila, a los cuales además se les adjudica un alto valor nutraceútico, utilidad como prebióticos, y sustituyentes de fibra; con efectos en la nutrición infantil, salud gastrointestinal, prevención del

cáncer de colon, el metabolismo de lípidos y azúcares, la mineralización de los huesos, y la respuesta inmune; entre otros (revisado por Roberfroid, 2007; Kelly, 2008; y Kelly, 2009). Los oligofructanos producidos por los agaves, tipo neo-inulina (Mancilla-Margalli y López, 2006; Ravenscroft *et al.*, 2009), han adquirido un gran interés, y sus potenciales efectos en la salud humana han comenzado a ser evaluados (Urías-Silvas *et al.*, 2008; Gomez *et al.*; 2009).

A pesar de la relevancia biológica y de las particulares capacidades fisiológicas y metabólicas de los agaves; actualmente se desconocen las bases moleculares y adaptaciones bioquímicas sobre las que subyacen capacidades como su alta tolerancia a estrés abiótico, la biosíntesis de metabolitos secundarios de interés biotecnológico, o la regulación de su desarrollo por factores ambientales. La información molecular actualmente disponible, requerida para desarrollar dichos estudios, es limitada en este género. Las bases de datos públicas ofrecen poca información respecto a secuencias codificantes de agaves, y los tipos de genes secuenciados a la fecha son escasos, comparativamente contra otros géneros y familias (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Entre los escasos estudios fisiológicos realizados a nivel molecular en agaves, se documentó recientemente la acumulación de proteínas pequeñas de choque térmico en correlación con la alta tolerancia de las hojas centrales de los agaves a tratamientos con altas temperaturas (Luján *et al.*, 2009). Con respecto a su metabolismo, se ha reportado la clonación y caracterización de tres ADNc codificantes de enzimas con potencial biotecnológico: el ADNc codificador de la enzima 1-SST, participante en la biosíntesis de oligofructanos (Ávila-Fernández *et al.*, 2007); el del gen AgaSGNH homólogo a lipasas (Reina *et al.*, 2007), y un homólogo a la proteína membranal ACBP, que une acil-Coenzima A (Guerrero *et al.*, 2006); estos últimos presumiblemente involucrados en la biosíntesis de la cutícula,

capa cerosa extremadamente resistente en los agaves que posee una constitución química particular (Matic, 1956; Villena *et al.* 1999).

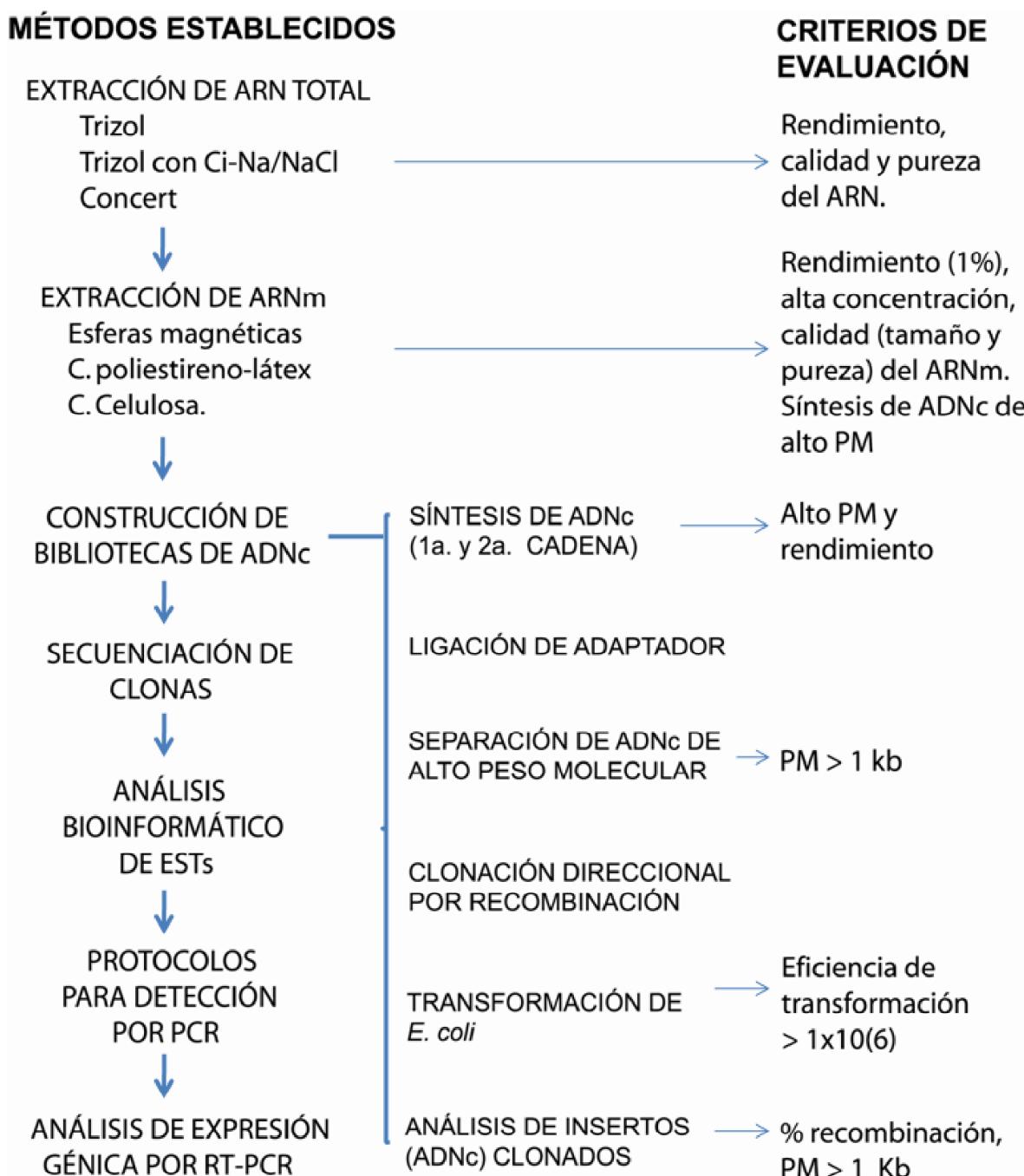
Por la relevancia biológica de los agaves, así como por su valor actual y potencial como cultivo agroindustrial, es requerido establecer metodologías accesibles y generar herramientas que permitan estudiar distintos aspectos de la fisiología y el metabolismo de estas plantas a nivel molecular. En este trabajo evaluamos diversos métodos comerciales de extracción de ARN y ARNm aplicables a la síntesis de ADNc de agaves; generamos cuatro bibliotecas de ADNc *A. tequilana* a partir de tejidos con distintas funciones y propiedades metabólicas; reportamos secuencias de genes relevantes para la fisiología de los agaves; y desarrollamos protocolos de RT-PCR útiles para realizar estudios de expresión de genes de fotosíntesis (*rbcS*), metabolismo de carbono (enzima málica NADP-ME), biosíntesis de oligofructanos (fructosiltransferasa 1-SST), y genes de estrés abiótico (proteínas tipo LEA); aplicables a diferentes especies de *Agave*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los métodos aquí reportados se realizaron utilizando materiales, reactivos, y condiciones libres de ribonucleasas (ARNasas), conforme a lo comúnmente recomendado para la extracción y manejo de ARN (Sambrook *et al.*, 1989). Las etapas metodológicas y los métodos evaluados en este trabajo se muestran esquemáticamente en la figura 1.

Extracción de ARN total y purificación de ARNm de *Agave tequilana*.

Con el fin de comparar la cantidad y la calidad del ARN extraído, se probaron diferentes métodos comerciales de extracción de ARN total a partir de 100 mg de tejidos de hoja y piña de plantas maduras de *Agave*

**Figura 1.** Métodos establecidos y criterios de evaluación.

Izquierda: Diagrama de flujo de etapas metodológicas abordadas en este trabajo, y métodos utilizados. Centro: etapas requeridas para la construcción de bibliotecas de ADNc a partir de ARNm. Derecha: Criterios de evaluación y selección considerados en cada etapa o método evaluado.

tequilana: a) extracción con el reactivo “Trizol” (Invitrogen Cat. No. 15596026), b) extracción con Trizol precipitando con citrato de sodio/NaCl (250 µl de citrato de sodio 0.8M / NaCl 1.2M por ml de Trizol); c) extracción con el reactivo comercial para ARN de plantas “Concert” (Invitrogen Cat. No. 12322012). En todos los casos se siguieron los procedimientos indicados por la casa comercial (www.invitrogen.com); con excepción del lavado de la pastilla de ARN, el cual se realizó dos veces con etanol al 70% en agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.05%. La solubilización del ARN extraído, se realizó en 30 µl de agua desionizada-DEPC cuando se extrajo con Trizol; o 50 µl cuando se extrajo con Concert. El análisis electroforético de una aliquota de 3 µl de cada ARN se realizó en geles de agarosa al 1.2% adicionada con 0.5 µg/ml de Bromuro de etidio (EtBr), y utilizando como solución de corrida “TAE” 1X preparado con agua-DEPC, conforme procedimientos de rutina (Sambrook *et al.*, 1989). Los ARNs extraídos fueron cuantificados por espectrofotometría por métodos estándar.

Para la purificación de ARNs mensajeros (ARNm) de *A. tequilana*, se probaron tres diferentes métodos comerciales basados en el uso de soportes inertes unidos a oligo(dT) (oligonucleótidos de timina) para aislar ARNm poliadenilado: a) microesferas magnéticas (Dynabeads, Invitrogen Cat. No. 610-06), b) minicolumnas de partículas de poliestireno-látex (Oligotex Cat No. 72022 Quiagen), y c) columnas de celulosa (Poly(A) Quik ARNm isolation kit, Stratagene). Para la extracción con microesferas magnéticas y minicolumnas de poliestireno-látex, se partió de 100 µg de ARN total; para la utilización de las columnas de celulosa se requirieron 500 µg de ARN total. Los protocolos se realizaron conforme a lo recomendado por las respectivas casas comerciales con las siguientes modificaciones: En la extracción con esferas magnéticas el ARN total se mantuvo en contacto con las esferas

magnéticas durante 10 min, los lavados se realizaron 3 veces con el doble del volumen recomendado, se adicionó un lavado final con el buffer de reacción de la transcriptasa reversa a usar posteriormente (“SuperScript II” Invitrogen Cat. No. 18064-014), y el ARNm poliadenilado se eluyó dos veces con agua-DEPC, en un volumen final de 15 µl. En el caso de la extracción con columnas de poliestireno-látex se eluyó dos veces con agua-DEPC, obteniendo un volumen final de 50 µl. Las columnas de celulosa se eluyeron 4 veces, colectando un volumen final de 800 µl. Los ARNm obtenidos por los diferentes métodos fueron concentrados por evaporación al vacío (SpeedVac Savant, Thermo Scientific) hasta alcanzar un volumen final de 10 µl. Los ARNm aislados se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% con EtBr, y se cuantificaron por espectrofotometría (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

Para evaluar la utilidad de los ARNm poliadenilado aislados por los diversos métodos para sintetizar ADNc, se utilizó la Transcriptasa Reversa “SuperScript II” (Invitrogen Cat. No. 18064-014) para sintetizar la primera cadena de los ADNc conforme las instrucciones del fabricante, utilizando 300 ng del ARNm como templado o molde, y como “primer” o iniciador de la reacción 2.5 µg de oligo(dT)₅₀ sintetizado (SIGMA). A la mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) se adicionaron 1 µCi de [α -³²P]dCTP, (Amersham Biosciences, Catalog no. PB.10205) para generar ADNc marcados radioactivamente. La reacción se realizó a 42 °C durante 80 min en 20 µl finales. La calidad de los ADNc sintetizados fue evaluada visualizando los ADNc presentes en una aliquota de 0.5 µl de la reacción, separados por electroforesis en minigel de agarosa al 1.2 % con EtBr. Los geles se dejan correr hasta que los nucleótidos no incorporados salgan del gel. Posteriormente se detectó la radioactividad incorporada a los ADNc exponiendo de 12 a 24 h los geles previamente deshidratados al vacío

(Bio-Rad 583 Gel Dryer) ante películas Kodak X-Omat LS sensibles a la radioactividad. La eficiencia de síntesis de ADNc fue evaluada cuantificando el porcentaje de incorporación de ^{32}P . Una alícuota de 1 μl de la reacción fue adicionada con 24 μl de EDTA 20mM pH 8.0. Dos alícuotas de 10 μl de esta mezcla fueron depositadas por separado en filtros de fibra de vidrio (Whatman, Cat. No. 1822 021), uno de los cuales fue lavado conforme instrucciones del manual del CloneMiner, con pirofosfato de sodio/ácido tricloroacético. La radioactividad adherida a los filtros, lavado y no lavado, fue cuantificada con un contador de centelleo líquido (PACKARD Tri-Carb 2100 TR) y comparada, para determinar la cantidad de ADNc sintetizada, conforme cálculos indicados en el manual, considerando la cantidad de radioactividad adicionada a la reacción.

Construcción de bibliotecas de ADNc de *A. tequilana*.

Las bibliotecas de ADNc fueron construidas a partir de hoja, tallo (“piña”), y de la punta apical del tallo floral emergente (“quiote”) de *A. tequilana*. Con el fin de representar en cada biblioteca la mayor diversidad posible de diferentes transcritos expresados en cada uno de los distintos órganos, se colectaron tejidos de diferentes zonas de cada órgano, a partir de plantas de 1 y 5 años de edad de cultivos de Tequila, Jal., seleccionados por sus óptimas condiciones agronómicas y fitosanitarias.

Se colectaron tejidos de hoja completa de plantas de un año de edad. En plantas de 5 años se colectaron muestras tanto de la zona basal como de la zona media-apical de hojas fotosintéticamente activas. También se colectaron tejidos de hojas inmaduras no completamente desarrolladas aún enrolladas dentro del cono central (“cogollo”). Con el objetivo de clonar transcritos del metabolismo CAM, los tejidos de hoja de plantas de 5 años también se colectaron durante la noche (10:00 PM y 4:00 AM).

Los tejidos de “piña” de plantas de 5 años fueron colectados durante el día, a partir del corazón de la piña (“mezontle”); la zona apical de la piña, donde se incluye el meristemo apical vegetativo; la base de las hojas unida a la piña, formada por un tejido fibroso no fotosintético; y el tejido fibroso que separa a la base de las hojas del mezontle de la piña. Las puntas o extremos apicales de quiote (15-20 cm) fueron colectados en el día (10:00 AM) y durante la noche (4:00 AM). Esta zona incluye los meristemos de las ramificaciones laterales que darán lugar a la estructura de la inflorescencia, y el meristemo apical.

Todos los tejidos fueron colectados en campo, lavados con agua estéril, seccionados con instrumental estéril, y congelados en nitrógeno líquido para su transporte y almacenamiento a -80°C. Cinco gramos de cada diferente tejido fue molido bajo condiciones de congelamiento con nitrógeno líquido.

Los ARNs fueron extraídos con el método de Trizol precipitando con citrato de sodio/NaCl arriba descrito, a partir de 1.5g de cada tejido, utilizando durante el proceso volúmenes proporcionales conforme lo indicado en el manual. Las pastillas de ácidos nucleicos obtenidas con el procedimiento escalado se disolvieron, dependiendo de su tamaño, en 50 - 150 μl de agua-DEPC. Las pastillas de algunos tejidos no pudieron ser fácilmente disueltas, por lo que se utilizaron volúmenes de 500 μl de agua-DEPC y posteriormente se realizó una re-precipitación de ARN con 50 μl de acetato de potasio 3M y 1 ml de etanol absoluto.

Los ARNs extraídos a partir de los diferentes tejidos de cada órgano se mezclaron en cantidades equivalentes para la extracción del ARNm poliadenilado. En el caso del ARNm de hoja se mezclaron 50 μg de a) ARN de hoja de planta de 5 años colectada al medio día, b) ARN de hoja de planta de 1 año colectada a medio día, c) ARN de hoja de planta de 5 años colectada a las 10:00 P.M., d) ARN de hoja de planta de 5 años

colectada a las 4:00 A.M., y e) ARN de hojas en desarrollo enrolladas en la parte interna del cono central o “cogollo”; conjuntando un total de 250 µg de ARN.

Para las bibliotecas de piña se mezclaron 125 µg de cada ARN obtenido a partir de a) la base de la hoja de plantas de 5 años, b) el tejido fibroso que separa al “mezontle” o centro de la piña de la base de la hoja, c) el centro de piñas de 1 año de edad, d) zona del meristemo apical de la piña de planta de 5 años; generando un total de 500 µg de ARN total. La biblioteca de punta de quíote fue construida a partir de 250 µg de ARN total extraído a partir de puntas colectadas en el día y en la noche. Una vez mezclados los ARNs totales de cada tejido, la extracción del ARNm poliadenilado se realizó utilizando las esferas magnéticas Dynabeads conforme lo ya establecido.

Las bibliotecas de ADNc fueron construidas a partir de 1 µg de ARNm poliadenilados utilizando el “kit” de clonación CloneMiner (Invitrogen Cat. No. 18249-029), basado en una clonación direccional por recombinación en el vector pDONR222, el cual es un vector de “entrada” de la tecnología “Gateway”. Numerosos intentos previos realizados con el “SuperScript plasmid system” (Invitrogen) no resultaron exitosos en el paso de la clonación por ligación al vector pCMV-SPORT6. La utilización de cantidades mayores de ARNm resultó en síntesis de ADNc de baja eficiencia.

El “kit” CloneMiner utiliza la Transcriptasa reversa SuperScript II para sintetizar los ADNc. La reacción se realizó conforme a lo previamente establecido, pero a 45°C y sustituyendo el oligo(dT)₅₀ con 25-30 pmol del oligo(dT)-attB2-biotinado incluido en el CloneMiner. La síntesis de la segunda cadena del ADNc, y la ligación de los adaptadores conteniendo los sitios attB1 requeridos para la clonación por recombinación, fueron realizadas conforme a las instrucciones y reactivos incluidos en el CloneMiner. Los tamaños de los ADNc de la primera y segunda cadena se evaluaron en alicuotas

de 0.5 y 4 µl de las respectivas reacciones, por análisis electroforético y exponiendo los geles de agarosa deshidratados ante películas Kodak X-Omat LS. El porcentaje de incorporación de ³²P a la primera cadena de ADNc fue evaluada en 1 µl de la reacción, conforme lo arriba descrito.

Los ADNc de doble cadena, previamente ligados a los sitios attB1 fueron fraccionados por cromatografía de exclusión utilizando columnas con Sephadex® S-500 h (Invitrogen Cat. No. 18092-015), conforme las instrucciones del fabricante. Los tamaños de los ADNc fueron determinados por análisis electroforético en una alicuota de 3 µl de cada fracción, visualizando los ADNc sintetizados tanto por tinción con EtBr como por detección de la señal radioactiva. La cantidad en ng de ADNc presente en cada fracción fue calculada en base a la cantidad de ³²P incorporado, según lo indicado en el manual.

Con el objetivo de favorecer la clonación de ADNc completos (“full-length cDNA”), se conjuntaron 50-80 ng de ADNc utilizando fracciones seleccionadas por contener ADNc de tamaño mayor a 1 kilobase (kb). Los ADNc conjuntados fueron clonados en el vector pDONR222 por recombinación utilizando la BP Clonasa (Invitrogen Cat. No. 11789-013), utilizando como control positivo de la reacción de recombinación al ADN control pEXP7-tet, conforme las instrucciones del proveedor. Los productos de la recombinación fueron precipitados y resuspendidos en 9 µl, conforme las instrucciones del manual; y posteriormente se dializaron 30 min contra agua des-ionizada sobre filtros para microdiálisis de 0.025 µm tipo VS (Millipore Cat. VSWP 02500). Una alicuota de 1.5 µl de los productos de recombinación dializados fueron utilizados para transformar células de *Escherichia coli* DH10B electro-competentes (Invitrogen Cat. No. 12033-015), utilizando métodos estándar de electroporación (Electroporador Eppendorf 2510). Las células transformadas fueron seleccionadas en placas

con kanamicina a 50 µg/ml. La eficiencia de transformación y el número de transformantes totales obtenidos en cada evento de transformación fueron calculadas en base al conteo de unidades formadoras de colonias por 1 ml, en diluciones de la transformación.

El análisis de la eficiencia de recombinación, y de la diversidad y tamaño de los ADNc clonados, fue realizado sobre una muestra de 15 - 20 colonias transformadas aisladas elegidas al azar. El plásmido de cada clona, extraído mediante protocolos de rutina por lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), fue digerido con la enzima *Bsr*G I (New England BioLabs Cat. No. R0575S), la cual corta el vector de clonación a ambos lados del ADNc clonado, liberando el inserto (ADNc). Los tamaños de los insertos fueron verificados mediante separación electroforética en geles de agarosa al 1 % teñidos con EtBr.

Identificación de genes de importancia fisiológica para los agaves

Con el objetivo de analizar el contenido y la utilidad de las bibliotecas, y como parte de un proyecto de secuenciación de ESTs (Expressed Sequence Tags) de *A. tequilana* (Martínez-Hernández y Simpson-Williamson, en proceso), algunas clones de cada biblioteca fueron seleccionadas al azar para ser secuenciadas por el extremo 5' prima (5') por el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) en un secuenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). Las secuencias generadas fueron comparadas mediante el "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) utilizando el algoritmo BLASTN 2.2.22 (Altschul *et al.*, 1997) o BLASTX contra las bases de datos públicas "nucleotide collection" (nr/nt) o non-redundant protein (nr) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), respectivamente. ESTs que presentaron alta similitud (expectancia < 1x10⁻⁶) con genes ortólogos de otras plantas de función conocida, fueron "anotados

por homología", indicando su similitud con el ortólogo más cercano. Búsqueda de potenciales marcos de lectura abiertos (ORFs) dentro de los ESTs seleccionados, y sus traducciones a proteína, se realizaron con la herramienta EditSeq del programa DNASTAR. Comparaciones con BLASTP contra la base de datos "nr", así como alineamientos con CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) contra CDS de genes ortólogos, fueron realizadas para verificar la identidad del EST. Los genes ortólogos utilizados en la comparación fueron seleccionados por ser los mejores hits en el análisis de BLAST de cada EST, y las secuencias de sus CDS fueron obtenidas del GenBank. Algunas de las secuencias identificadas como homólogas a genes con funciones relevantes para la fisiología de los agaves, utilizadas en este trabajo, fueron depositadas en la base de datos de ESTs del GenBank del NCBI "Expressed Sequence Tags database" (dbEST). Los números de acceso asignados se reportan en la Tabla III. Estas secuencias fueron utilizadas para diseñar oligonucleótidos iniciadores ("primers") requeridos para el análisis de expresión de genes de agave por RT-PCR (Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa).

RT-PCR de genes de *rbcS*, NADP-ME, 1-SST, y LEA-like de agaves

Secuencias identificadas con alta homología a genes de interés fueron utilizadas para diseñar oligonucleótidos como "primers" iniciadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los "primers" fueron diseñados con la herramienta PrimerSelect del programa DNASTAR v5.0. La especificidad de los "primers" diseñados fue preliminarmente evaluada mediante un análisis de BLAST contra la base de datos nr/nt de NCBI, así como contra las secuencias generadas de *A. tequilana*. Las secuencias de los "primers" seleccionados para cada gen se reportan en la Tabla I. En base al tamaño del fragmento esperado, y la Temperatura de fusión ("melting") de cada primer, se

diseñaron protocolos para amplificar por PCR a cada gen seleccionado. Las temperaturas y tiempos de desnaturalización, alineamiento y extensión de cada ciclo se muestran en la Tabla I. Se corrieron 30 ciclos de amplificación en el caso de los genes *Atq-rbcS* y 1-SST; y 35 ciclos para los otros genes; con una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, y una extensión final de 5 min a 72 °C. La efectividad de los “primers” y los protocolos diseñados fue corroborada utilizando como control positivo el ADN plasmídico extraído con procedimientos de rutina (Sambrook *et al.*, 1989) a partir de las clonas de *E.coli* que contienen los ADNc de los genes seleccionados. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando 20-200 ng de cada ADN plasmídico como templado, 20 pmoles de cada “primer”, y la PCR Supermix High Fidelity (Invitrogen Cat. No 10790-020), en un volumen final de 20 µl. La efectividad de la reacción y el tamaño los productos generados fue verificado por electroforesis en gel de agarosa.

Una vez establecidas las condiciones de reacción para la amplificación por PCR de cada gen de interés, la utilidad de cada protocolo para detectar expresión génica por RT-PCR fue probado sobre cadenas de ADNc sintetizadas a partir del ARN total de hojas, piña, punta de quíote y raíz de *A. tequilana*. Para realizar comparaciones de expresión génica entre las distintas muestras, la concentración de ARN total en cada muestra fue determinada por espectrofotometría y se realizaron pruebas para verificar la homogeneidad de carga con 1 µg de ARN, visualizando los ARNr separados por electroforesis y teñidos con EtBr. Las poblaciones de ADNc de cada tejido se sintetizaron utilizando la Super-Script II conforme al protocolo previamente establecido, pero utilizando 2.5 µg de ARN total de cada muestra como templado, y 1 µl de oligo(dT)₂₀ 50 µM (Invitrogen Cat. No. 18418-020) por reacción. Posteriormente se emplearon 2.5 µl de cada reacción de retrotranscripción como ADNc templado,

para efectuar reacciones de PCR para cada gen de interés, conforme los protocolos e iniciadores descritos en la Tabla I. La efectividad de las reacciones de RT-PCR para detectar la expresión de cada gen en los distintos tejidos evaluados fue verificada por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% teñidos con EtBr. Para verificar la homogeneidad en la cantidad de ARN utilizada por muestra, se realizó paralelamente una retrotranscripción a partir de 1 µg de ARN total de cada tejido, utilizando 20 pmolas por reacción del primer “Reverse” del gen *Atq-rRNA18S*. Posteriormente 2.5 µl de la reacción fueron utilizados para realizar el PCR conforme el protocolo reportado en la Tabla I.

Para determinar si los protocolos de RT-PCR establecidos son útiles para detectar los genes de interés en otras especies de *Agave*, estos fueron probados sobre ADNc sintetizados a partir de ARN de *A. fourcroydes* extraído con el método de Trizol a partir de hojas de plántulas de bulbos enraizadas y establecidas, sometidas a deshidratación y rehidratación. La temperatura de alineamiento del protocolo para amplificar el gen de la 1-SST se modificó en este caso a 60°C.

RESULTADOS

Selección de métodos para la extracción de ARN total y de ARNm de alta calidad a partir de *A. tequilana*

Con el fin de comparar la utilidad de diferentes métodos comerciales para la obtención de ARN total de alta calidad a partir de agave, se realizaron extracciones paralelas comparativas a partir de hoja y tallo (“piña”) de *A. tequilana*. En la figura 1 se mencionan los criterios de evaluación considerados en todas las etapas metodológicas de este trabajo. En la figura 2A se muestra un resultado representativo de una de 3 extracciones en paralelo realizadas con los 3 métodos a evaluar, utilizando dos tejidos

Tabla I. Condiciones de las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR).

GEN	“FORWARD”	“REVERSE”	CICLOS	Tamaño (pb)
RuBisCO <i>Atq-rbcS</i>	5'ACCTTCTCCGCAA CAACTGG 3'	5'ACTGTGGGGCTT GTAGGCGAT 3'	94°C / 1 min 60°C / 30 seg 72°C / 1 min	270
Enzima Málica <i>Atq-NADP-ME</i>	5'CGTCGCCATGCTC TCACTCAAAG 3'	5'CTCGCCGTACACG TCCTCAAACC 3'	94°C / 1 min 58°C / 30 seg 72°C / 1 min	268
Fructosiltransferasa <i>1-SST</i>	5'CGGGGCCGGGGTT GAAGTA 3'	5'CCGGCCACAGGAT GAGGTTG 3'	94°C / 30 seg 65°C / 30 seg 72°C / 1 min	333
Similar a LEAs <i>Atq-LEA-like</i>	5'GGGCGTGGCGGA GGAGAGC 3'	5'AGCCAGCCGCCAA TACTTCAA 3'	94°C / 1 min 65°C / 30 seg 72°C / 1 min	204
Ribosomal 18S <i>Atq-rRNA18S</i>	5'CTGCCGTCCCGTC CCTTCTGC 3'	5'CCTGGTGGTGCCC TTCCGTCAA 3'	94°C / 30 seg 63°C / 30 seg 72°C / 1 min	491

Genes considerados de importancia fisiológica para los agaves fueron seleccionados entre secuencias de ESTs previamente generadas. Las condiciones de reacción para su amplificación por PCR fueron establecidas. Se muestran las secuencias de los iniciadores “forward” y “reverse” seleccionados para amplificar cada gen, los tiempos y las temperaturas utilizadas durante los ciclos de amplificación, así como los tamaños esperados en los productos de cada reacción.

de *A. tequilana*. Con los tres métodos evaluados se logró obtener ARN a partir de *A. tequilana*, con diferentes rendimientos y calidades, a partir de ambos tejidos (hoja y piña). El método con el que aparentemente se obtuvo un mayor rendimiento de ácidos nucleicos fue el de “Concert”; sin embargo, el análisis electroforético muestra que con este método el ADN genómico co-precipita junto con el ARN, por lo que la cuantificación espectrofotométrica incluye ambos tipos de ácidos nucleicos. El rendimiento obtenido con el método de Trizol precipitando con citrato de sodio/NaCl es el menor; sin embargo, la calidad e integridad del ARN extraído en términos de limpieza y definición de las bandas correspondientes a los ARN ribosomales (ARNr) 28S y 18S, así como de las bandas correspondientes a los ARNr mitocondriales y cloroplastídicos (16S-17S), es mayor con este método;

tanto para ARNs extraídos de hoja como de piña. La precipitación con citrato de sodio/NaCl utilizando el método de Trizol es recomendada por el fabricante para evitar la coprecipitación de polisacáridos, los cuales se encuentran en altas cantidades en los tejidos de agave. El ARN extraído con el método de Trizol sin la modificación de precipitar con citrato de sodio/NaCl se observa menos limpio y con poca definición en las bandas de ARNr. La banda 28S de ARNr de hoja se observa en menor proporción que la 18S cuando se extrae con Concert, lo cual no corresponde a lo esperado y sugiere degradación del ARNr. El ARNr 5S no precipita cuando se utiliza citrato de sodio/NaCl. Independientemente del método, se observa una mayor concentración de ARN extraído a partir de piña que de hoja.

A pesar de que comparado contra los otros métodos el rendimiento es menor en

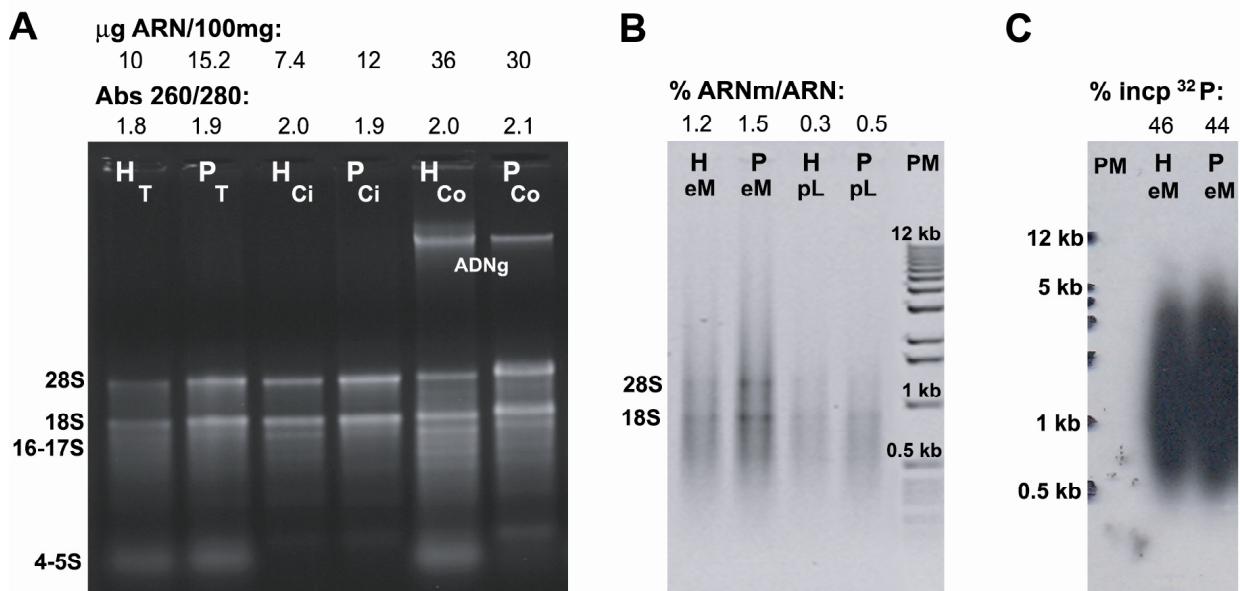


Figura 2. Extracción de ARNm de tejidos de *A. tequilana* para síntesis de ADNc.

A. Rendimiento ($\mu\text{g ARN}/100\text{mg}$ tejido), índice de pureza (Abs 260/Abs 280), y análisis electroforético de ácidos nucleicos extraídos a partir de hoja (H) o piña (P) de *A. tequilana* con el método de Trizol (T), Trizol precipitando con citrato de sodio/NaCl (Ci), o Concert (Co). ADNg: ADN genómico. 28, 18, 16-17, y 4-5S: ARN ribosomales y de transferencia, citoplásmicos y organelares. **B.** Rendimiento (% ARNm/ARN) y análisis electroforético de ARNm poliadenilado aislado a partir de ARN total de hoja (H) o piña (P), utilizando oligo(dT) acoplado a esferas magnéticas (eM) o columnas de poliestireno-látex (pL). PM: Marcador de peso molecular de 1 kb. **C.** Detección de ADNc radioactivos, sintetizados a partir de ARNm de hoja (H) o piña (P) de *A. tequilana* aislado con esferas magnéticas (eM). El % de Incorporación de ^{32}P refleja la cantidad de ADNc sintetizado a partir del total de ARNm utilizado en la retrotranscripción. El film de detección muestra la posición en el gel de electroforesis de bandas de diferente tamaño del marcador de 1 kb.

el caso de la extracción de ARN con Trizol precipitando con citrato de sodio/NaCl; basados en la mayor pureza indicada por la relación 260/280 y visualizada en la electroforesis, por la ausencia de ADN genómico que implicaría el uso de "ADNasas" para su eliminación por digestión para usos posteriores, así como por la integridad de las bandas 28S y 18S de ARNr obtenidas a partir de los dos diferentes tejidos utilizados; se eligió este método como el más adecuado para extraer ARN de agave con alta pureza. Este método también resultó útil para la extracción de ARN a gran escala a partir de 1 - 2.5 g de tejido, durante la construcción de bibliotecas de ADNc; así como para la obtención de ARN a partir

de otros tejidos de agave como punta de quíote, raíz, u órganos florales; los cuales mostraron mayor pureza que los obtenidos a partir de hoja y piña (datos no mostrados), probablemente por la menor cantidad de carbohidratos en esos tejidos.

Muestras de ARN total extraído a partir de hojas o piñas de *A. tequilana* con el método de Trizol precipitando con citrato de sodio/NaCl fueron utilizadas para purificar ARNm con dos distintos métodos basados en la unión de los ARNm poliadenilados a soportes acoplados a oligo(dT). En la figura 2B se muestra el rendimiento de ARNm obtenido a partir de ARN total con los métodos de esferas magnéticas y columnas de poliestireno-látex; así como

la calidad, pureza y tamaños del ARNm extraído visualizados en la electroforesis. El rendimiento obtenido con las perlas magnéticas en las numerosas ocasiones que fueron utilizadas fluctuó entre el 0.8 y el 1.2 %. Estos valores coinciden con el porcentaje promedio de ARNm presente en ARN total de eucariontes. El rendimiento obtenido con las columnas de poliestireno-látex fue muy bajo, fluctuando entre el 0.3 y el 0.45 %. La separación electroforética muestra que, en todos los casos, la mayor cantidad de ARNm se encuentra entre 500 pb (pares de bases) y 1.5 kb, lo cual se considera adecuado; sin embargo, con las esferas magnéticas se obtuvieron ARNm de mayor tamaño que los obtenidos con las columnas de poliestireno-látex, logrando visualizar ARNm hasta de aproximadamente 7 kb en el caso del ARNm extraído a partir de ARN de piña, y de 4-5 kb en el caso de ARNm extraído a partir de hoja. El análisis electroforético muestra también que en ambos métodos existe una cantidad remanente de ARN ribosomal (ARNr) en las muestras enriquecidas en ARNm, más visible en el ARNm obtenido con las esferas magnéticas probablemente por las mayores concentraciones obtenidas. El ARNm obtenido a partir de piña mostró cierta cantidad de impurezas al ser extraído con este método. Las extracciones en paralelo con ambos métodos fueron repetidas y los resultados cualitativos y cuantitativos mostrados fueron reproducibles.

Ensayos posteriores mostraron que el método de las esferas magnéticas es ampliamente flexible en cuanto a la cantidad de ARN total requerido para iniciar la extracción, y ha sido utilizado para extraer ARNm a partir desde 10 hasta 500 µg de ARN total de agave, obteniendo resultados similares en cuanto a rendimiento y pureza.

Con el método de las columnas de celulosa se obtuvo un rendimiento adecuado, del 0.85 %, pero el ARNm mostró una alta cantidad de impurezas, requirió como punto de partida una cantidad de ARN total

de 500 µg mínimo y, para eluir el ARNm se requirió un volumen final mayor que con las esferas magnéticas (500 µl), por lo que requirió un paso adicional prolongado (1 h) para concentrar el ARNm por evaporación al vacío, poniendo en riesgo de degradación al ARNm; por lo que el método no se consideró adecuado. Actualmente este producto se encuentra descontinuado.

Por el rendimiento obtenido, por los mayores tamaños de ARNms observables, por el volumen mínimo de elución final, y porque tener ARNm en altas concentraciones facilita el manejo de volúmenes en la síntesis de ADNc; el método seleccionado para purificar ARNm de alta calidad a partir de tejidos de agave fue el de las perlas magnéticas acopladas a oligo(dT).

En la figura 2C se muestran los ADNc radioactivos sintetizados a partir de ARNm de hoja y piña extraídos con las esferas magnéticas, en la cual se observan abundantes ADNc desde 500 pb hasta 5 kb, y en menor proporción ADNc de aproximadamente hasta 10 kb. Los ARNm extraídos con los 3 métodos sirvieron como templado para generar ADNc de tamaños similares (datos no mostrados). El porcentaje de incorporación de ^{32}P ; el cual representa la cantidad de ADNc sintetizado con respecto a la cantidad total de ARNm utilizado en la reacción de retrotranscripción; medido en las múltiples ocasiones durante la construcción de las bibliotecas de ADNc, varió entre el 39 y el 48 % cuando se utilizó entre 0.8 y 1.2 µg de ARNm, independientemente del origen tisular del mismo. Este porcentaje de incorporación se considera adecuado en base a lo recomendado en el manual del CloneMiner. Sin embargo, consistentemente, al utilizar 2 µg de ARNm o más, el porcentaje de incorporación disminuyó por debajo del 15 %, sugiriendo una posible inhibición de la retrotranscriptasa por impurezas presentes en el ARNm.

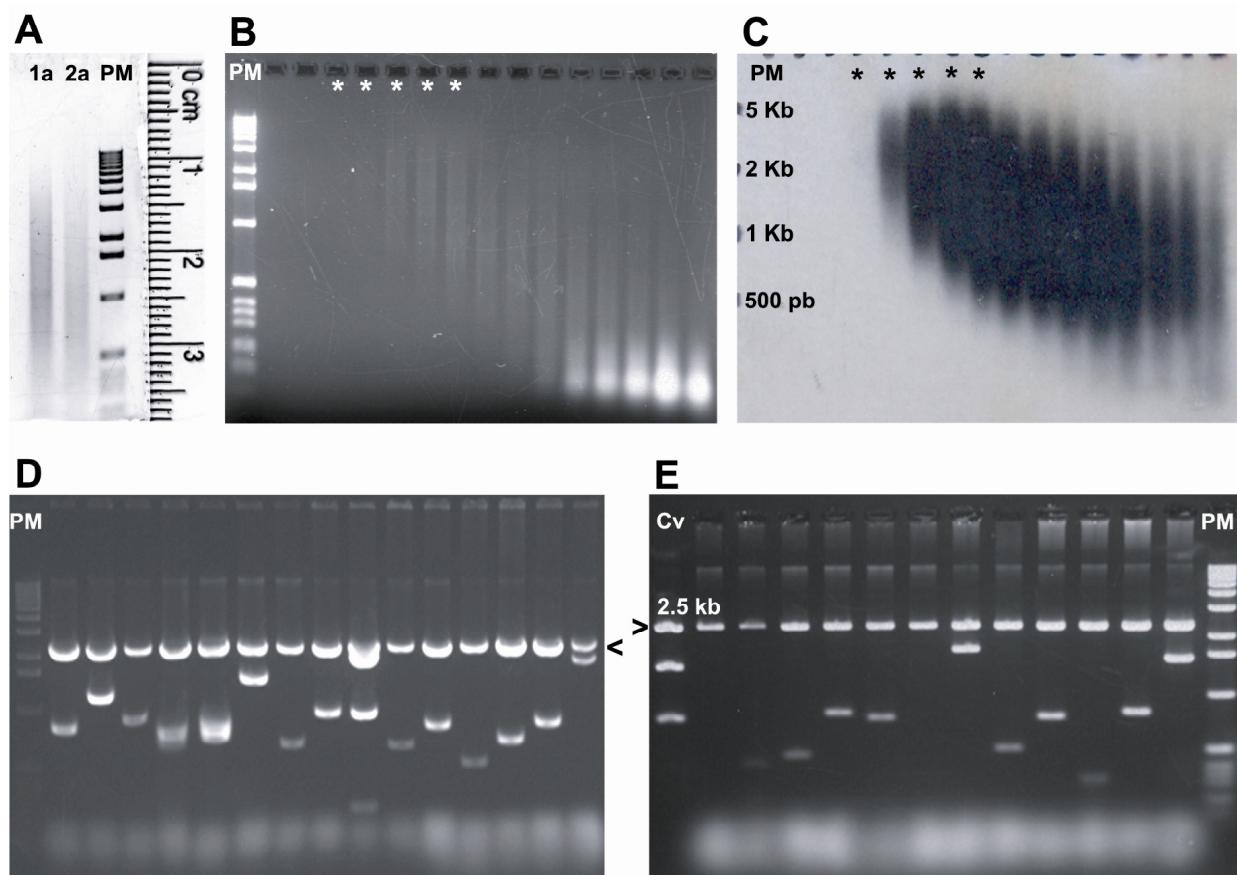


Figura 3. Construcción de bibliotecas de ADNc de *A. tequilana*.

A. Primera (1a) y segunda (2a) cadena de ADNc de punta de quioye. PM: Marcador de peso molecular de 1 kb. **B.** Fracciones de ADNc de hoja separados por cromatografía de exclusión y visualizados con EtBr. Los asteriscos (*) señalan las fracciones con ADNc mayores a 500 pb seleccionadas en cada caso para usar en la clonación por recombinación. **C.** Detección de ADNc radioactivos de punta de quioye. El film de detección muestra la posición en el gel de electroforesis de bandas de diferente tamaño del marcador de 1 kb. **D** y **E.** Análisis de insertos clonados mediante digestión con BsrG I de la biblioteca construida a partir de punta de quioye (**D**) o piña (**E**). El fragmento liberado de 2.5 kb (<, >) corresponde al vector de clonación, Cv: digestión control del vector de clonación pDONR222 sin recombinación.

Construcción de bibliotecas de ADNc a partir de distintos tejidos de *A. tequilana*

Los métodos anteriormente establecidos para la extracción de ARN total y ARNm a partir de tejidos de agave, así como para la síntesis de ADNc, fueron utilizados para la construcción de bibliotecas de ADNc a partir de distintos tejidos de *A. tequilana*: hojas, piña, y punta del quioye.

En la figura 3A se muestra un ejemplo de los ADNc obtenidos en las reacciones de primera y segunda cadena, durante la construcción de las bibliotecas. Los ADNc

sintetizados a partir de los diferentes tejidos alcanzaron tamaños mayores a 5 kb y una eficiencia de incorporación de ^{32}P promedio del 45%. En la figura 3 se muestran también ejemplos de las fracciones de ADNc obtenidas por cromatografía de exclusión después de ligarle los adaptadores a los ADNc, visualizadas en los geles de agarosa tanto por tinción con EtBr (Fig 3B), como mediante detección de la emisión radioactiva de los ADNc (Fig 3C); respectivamente. El remanente de adaptadores no ligados a los ADNc, al no ser radioactivos, solo se

Tabla II. Características de las bibliotecas de ADNc de *A. tequilana*.

BIBLIOTECA	UFC/ml	% REC	Tamaño de insertos (pb)		
			Promedio	Máx	Mín
Hoja	2.7×10^7	100	871	1400	400
Piña	6×10^6	83	813	1800	200
Punta de Quiote	7.3×10^6	100	1130	3150	600
Piña-2	1.2×10^7	78	832	1600	250

La eficiencia de transformación expresada como unidades formadoras de colonia (UFC) por ml de cada biblioteca es mostrada; así como los resultados de la evaluación del contenido de insertos en las clonas transformadas, expresados como porcentaje de recombinantes con inserto (% REC); y tamaños promedio en pares de bases (pb), máximo (Máx) y mínimo (Mín), de los insertos clonados.

observan en las últimas fracciones del gel teñido con EtBr. Resultados similares a lo aquí mostrado se obtuvieron en todas las bibliotecas. Las fracciones conteniendo ADNc de alto peso molecular fueron seleccionadas para realizar la reacción de clonación por recombinación.

En la Tabla II, se muestran las eficiencias de transformación y el porcentaje de recombinación exitosa, obtenidas en cada biblioteca. En todos los casos se obtuvo una eficiencia de transformación alta, que permite obtener desde 1×10^7 hasta 1×10^8 clonas conjuntando 10 ml de transformaciones independientes. La eficiencia de transformación mostrada requirió de una eficiencia de las células competentes utilizadas mayor a 1×10^{10} . Obtener un alto número de transformantes es un requisito necesario para que una biblioteca representante de forma amplia y diversa los distintos transcritos presentes en cada tejido.

En la figura 3D y E se muestran dos ejemplos del análisis electroforético del contenido de ADNc de una muestra representativa de clonas en dos de las bibliotecas generadas. Para realizar este análisis se corta el vector de clonación a ambos lados del ADNc clonado, liberando el inserto. En cada clona digerida se observa una banda de aproximadamente 2.5 kb correspondiente al vector de clonación pDONR222, así como una o más bandas adicionales que corresponden al ADNc liberado. La

digestión del pDONR222 sin recombinarse genera, además del fragmento de 2.5 kb, dos fragmentos adicionales correspondientes a la región que es sustituida por el ADNc clonado durante la recombinación (figura 3E, Cv). El análisis muestra que la biblioteca construida a partir de puntas de quiote (figura 3D) contiene una alta diversidad en el tamaño de los insertos; sugiriendo que contienen una alta diversidad de diferentes ADNc. Adicionalmente, este análisis muestra que todas las clonas contienen insertos, por lo que se obtuvo un porcentaje de recombinación exitosa del 100% (Tabla II). Resultados similares se obtuvieron en bibliotecas posteriormente construidas a partir de otros tejidos reproductivos (Abraham-Juárez M.J. y Delgado-Sandoval S.C., datos no publicados), demostrando que el sistema de clonación es muy eficiente. Sin embargo, en las dos bibliotecas aquí construidas a partir de piña, de forma totalmente independiente, alrededor del 20 % de las clonas analizadas no contenían inserto (figura 3E, Tabla II); lo cual sugiere que el tamaño de los transcritos obtenidos a partir de ese tejido, o las impurezas observadas en los ARNm de piña, disminuyeron la eficiencia del método de clonación.

La Tabla II muestra el valor promedio y los valores máximo y mínimo encontrados en el análisis de los insertos de cada biblioteca. El valor promedio de ADNc de *A. tequilana* clonados con este método es mayor a 900

pb, y en algunos casos se observaron insertos de hasta 3.15 kb, los cuales pueden representar genes completos o fragmentos de genes de gran tamaño. Sin embargo, a pesar de que en la construcción de todas las bibliotecas se usaron fracciones favoreciendo la presencia de ADNc de gran longitud, los muestreros realizados no mostraron insertos de tamaño superior a 4.5 kb, lo que sugiere que el método de clonación por recombinación utilizado no favorece la clonación de ADNc de gran tamaño.

Cabe mencionar que la eficiencia de la síntesis de ADNc realizada con los métodos aquí aplicados resultó ser lo suficientemente alta como para visualizar los ADNc directamente en geles de agarosa, incluso en las fracciones separadas por cromatografía; por lo que la segunda biblioteca de piña (piña-2) fue construida sin utilizar marca radioactiva. Las características obtenidas entre ambas bibliotecas de piña fueron similares (Tabla II).

En base a las eficiencias de transformación y al promedio de los tamaños de los insertos, se concluye que el método de Cloneminer resultó útil para generar bibliotecas de ADNc de *Agave* de alta calidad. Los métodos utilizados resultaron reproducibles al ser aplicados en diversos tejidos de agave; siendo la calidad y pureza del ARN y el ARNm utilizados el principal factor determinante para obtener bibliotecas de alta calidad. Las bibliotecas aquí generadas son útiles para buscar genes específicos por hibridación en colonia, o para proyectos de secuenciación masiva y análisis del transcriptoma expresado en cada tejido.

Identificación de genes de *Agave* por secuenciación de las bibliotecas de ADNc

Como un ejemplo de las aplicaciones de las bibliotecas generadas, se analizó su contenido secuenciando colonias seleccionadas al azar, aisladas a partir de una alícuota de cada biblioteca. Entre las clonas

Tabla III. Identidad de ESTs de *Agave tequilana* identificados por homología.

GEN	Número GenBank	Mejor HIT BLASTN (nr/nt)	Max ident	E value
RuBisCO <i>Atq-rbcS</i>	GW667494	gb AF008214.1 <i>Musa acuminata</i> ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit (<i>rbcS1</i>) mRNA, complete cds	80%	1e-132
Enzima Málica <i>Atq-NADP-ME</i>	GW667496	dbj AB005808.1 <i>Aloe arborescens</i> mRNA for NADP-malic enzyme, complete cds	80%	0.0
1-SST Fructosil transferasa	GW667497	gb DQ535031.1 <i>Agave tequilana</i> sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (SST1) mRNA, complete cds	97%	0.0
Similar a LEA_3 <i>Atq-LEA-like</i>	GW667495	gb AY098519.1 <i>Ananas comosus</i> late-embryogenesis abundant protein-like protein mRNA, partial cds	79%	2e-10
Ribosomal 18S <i>Atq-rRNA18S</i>	GU980213	gb AF206841.1 <i>Agave ghiesbreghtii</i> 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0.0

“Expressed sequence tags” (ESTs) de *A. tequilana*, generadas por secuenciación tipo Sanger de clonas seleccionadas al azar dentro de las bibliotecas de ADNc, fueron comparadas con BLAST contra las bases de datos “non-redundant” (nr) y “nucleótides” (nt) del NCBI. El mejor hit encontrado por BLASTN, así como su porcentaje de identidad y el valor de expectancia (E value) de cada EST son mostrados. Las secuencias fueron depositadas en el GenBank y el número de acceso es mostrado.

secuenciadas varias presentaron homología significativa ($<1 \times 10^{-6}$) a genes ortólogos previamente descritos en otras plantas. Secuencias (ESTs) homólogas a genes con putativas funciones relevantes para la fisiología de los agaves fueron depositadas en el GenBank del NCBI (Tabla III). Entre dichas secuencias encontramos un EST altamente homólogo a los genes *rbcS* de otras plantas, codificantes de la enzima RuBisCO, fijadora de carbono durante la fotosíntesis. Análisis comparativos contra otros genes *rbcS* indican que este EST de *A. tequilana* incluye la región codificante y al menos una parte de ambos UTR's (regiones no traducidas) del aquí denominado *Atq-rbcS*, por lo que la clona podría contener un ADNc completo (datos no mostrados). Identificamos también un EST que corresponde a un fragmento localizado hacia el extremo 5 prima (5') del gen codificante de una enzima ácido málica de *A. tequilana*, aquí denominada *Atq-NADP-ME*, potencialmente involucrada en el metabolismo CAM de los agaves. Los análisis comparativos indican que esta clona contiene el ATG reportado en los genes ortólogos, y al menos un fragmento del UTR del lado 5 prima (5'), por lo que la clona también parece contener el gen completo *Atq-NADP-ME* y está actualmente en proceso de secuenciación por el extremo 3 prima (3') para obtener la secuencia completa del gen *Atq-NADP-ME*.

Entre los ESTs secuenciados, identificamos una secuencia 97 % idéntica a un gen de *A. tequilana* previamente reportado (Ávila-Fernández *et al.*, 2007), codificante de la enzima sucrosa:sucrosa 1-fructosiltransferasa (1-SST) participante en la biosíntesis de oligofructanos. El análisis de alineamiento indica que la secuencia es un ADNc parcial contenido dentro del gen previamente reportado.

El EST del gen de *A. tequilana* aquí denominado *Atq-LEA-like* mostró una homología relativamente baja con secuencias de otras especies identificadas como similares a proteínas tipo LEA, ("Late-embryogenesis

abundant protein"), las cuales juegan un importante papel en estrés abiótico en plantas. La proteína traducida a partir del EST aquí reportado contiene el dominio conservado de la superfamilia de LEAs tipo 3, de función molecular no establecida. El posible papel del gen *Atq-LEA-like* en la tolerancia de los agaves ante el estrés abiótico deberá ser posteriormente analizado. Entre las secuencias obtenidas también identificamos una correspondiente al gen de ARN ribosomal 18S. En principio, los transcritos de ARNr no deberían ser clonados en abordajes como los aquí utilizados, diseñados para clonar ADNc a partir de ARNm; sin embargo, debido a la presencia de una cierta proporción de ARNr remanente en la extracción de ARNm, es relativamente común que se clone una baja proporción de secuencias de ARNr. El EST del aquí denominado *Atq-rRNA18S* es 99 % homólogo a la secuencia de *A. ghiesbreghtii* previamente reportada en el GenBank. Desde que los genes de ARNr suelen expresarse de forma constitutiva en todos los tejidos de los organismos bajo la gran mayoría de condiciones ambientales, son utilizados como "control de carga" para estudios de expresión génica comparativa, por lo que se incluyó esta secuencia en el desarrollo de métodos para detección por RT-PCR.

Establecimiento de protocolos para el análisis por RT-PCR de los genes *rbcS*, *SST-1*, *NADP-ME*, *LEA-like* y *rRNA18S* de *A. tequilana*

En base a las secuencias de ESTs se diseñaron oligonucleótidos para ser utilizados como iniciadores o "primers" de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como los protocolos para amplificar cada uno de los genes de interés (Tabla I). Los "primers" y los protocolos diseñados fueron probados utilizando plásmido extraído a partir de las clonas previamente secuenciadas como control positivo de cada gen. En la figura 4A se muestra que, en todos los casos, se obtuvo una reacción positiva con la clona

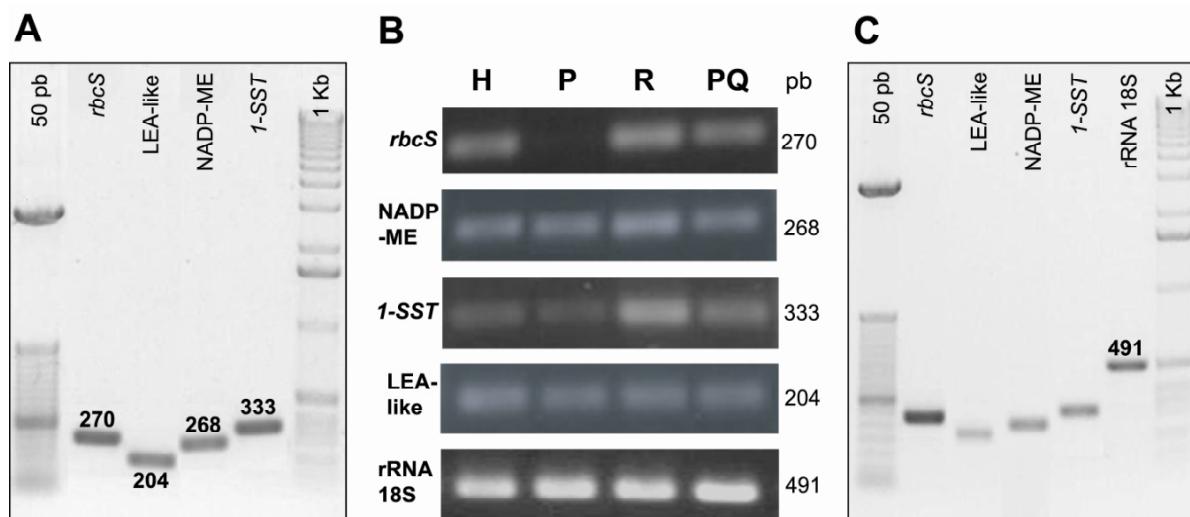


Fig. 4 Detección por RT-PCR de genes de importancia fisiológica para los Agaves. **A.** Amplificación por PCR de los genes RuBisCO (*rbcS*), Enzima Málica (NADP-ME), sucrosa:sucrosa-1-Fructosiltransferasa (1-SST), y proteína similar a LEAs (LEA-like) de *A. tequilana*. Los números indican el tamaño esperado de los fragmentos amplificados. 50 pb y 1 kb: Marcadores de peso molecular. **B.** Detección por RT-PCR de la expresión de genes de importancia fisiológica en diversos tejidos de *A. tequilana*: hoja (H), piña (P), raíz (R) y punta de quiole (PQ). *rRNA18S*: detección del gen de ARN ribosomal 18S como control de carga mediante amplificación de un fragmento de 491 pb. **C.** Detección de la expresión génica en hojas de *A. fourcroydes*.

correspondiente y se generó un fragmento de ADN amplificado del tamaño esperado.

Para corroborar la utilidad de los protocolos de amplificación establecidos en el análisis de expresión de cada gen por RT-PCR, estos fueron aplicados sobre ADNc sintetizados a partir de ARN total de distintos tejidos de *A. tequilana*, utilizando oligo(dT) como iniciador. Como puede observarse en la figura 4B, distintos fragmentos del tamaño esperado fueron amplificados a partir del ADNc de cada tejido de *A. tequilana*. También puede observarse que cada gen tiene un patrón de expresión tisular distinto. Los genes *Atq-NADP-ME* y *Atq-LEA-like* se expresan en niveles similares entre los cuatro tejidos evaluados, mientras que el gen de *Atq-rbcS* no fue detectado en el tejido de piña y el gen 1-SST mostró niveles de expresión aparentemente mayores en la muestra de raíz. El gen ribosomal *Atq-rRNA18S* utilizado como control

de carga se detecta a niveles homogéneos entre los diferentes tejidos comparados, corroborando que la cantidad de ARN utilizado entre los distintos tejidos fue similar, y validando que las diferencias en el patrón de expresión tisular detectadas en los otros genes son reales. Estos resultados no son cuantitativos y la relevancia fisiológica de los resultados mostrados deberá ser evaluada.

Considerando que los genes ortólogos entre plantas de un mismo género pueden ser altamente homólogos, y que los “primers” diseñados para un gen de una especie pueden funcionar amplificando el gen ortólogo de otra especie cercana; analizamos si los protocolos aquí establecidos para la detección de la expresión génica por RT-PCR pueden ser aplicados a otras especies de *Agave*. En la figura 4C se muestra la detección por RT-PCR de los genes de *rbcS*, NADP-ME, 1-SST, LEA-like y *rRNA18S*

expresados en hojas de *A. fourcroydes*. En todos los casos fue posible detectar el gen correspondiente con los protocolos establecidos para *A. tequilana*.

DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluaron y aplicaron métodos de extracción de ARN total y ARNm en la construcción de bibliotecas de ADNc de *Agave tequilana*; se secuencian ESTs de genes de importancia en la fisiología y el metabolismo de los agaves, y se establecieron métodos para el análisis de su expresión génica por RT-PCR; generando herramientas e información básica para futuros estudios de fisiología molecular y análisis transcriptómico en los agaves. Los métodos aquí evaluados para la extracción de ARN de agave son métodos comerciales que ofrecen una alternativa rápida y fácil de ejecutar, comparativamente con otros métodos previamente aplicados para extraer ARN de agaves (Guerrero *et al.*, 2006; Reina *et al.*, 2007; Luján *et al.*, 2009), ya que evitan la preparación de soluciones libres de ARNasas, disminuyendo el riesgo mínimo de degradación de las muestras, y no requieren precipitaciones diferenciales consecutivas. La calidad del ARN extraído, tanto con el método de "Trizol" precipitando con citrato de sodio/NaCl como con el reactivo "Concert", fue alta; pero se eligió el primero por no co-precipitar ADN genómico. En cuanto al método de purificación de ARNm poliadenilado, las esferas magnéticas acopladas a oligo(dT) permitieron recuperar a partir de ARN total el porcentaje máximo de ARNm esperado, el cual mostró características de pureza adecuadas y tamaños de mensajeros arriba de 5 kb, y el ARNm se recupera a altas concentraciones en un volumen final mínimo; por lo que se consideró el más adecuado para ser utilizado en la síntesis de ADNc para la construcción de bibliotecas.

El método aquí utilizado para la construcción de las bibliotecas de ADNc, inclu-

yendo la síntesis de ADNc, y la clonación de los mismos por recombinación en vectores "Gateway"; fueron útiles para generar de forma reproducible, a partir de una variedad de tejidos, bibliotecas de ADNc de *A. tequilana* que; en base a su alto título y eficiencia de recombinación, así como en base al tamaño de insertos entre los cuales verificamos por secuenciación contienen un porcentaje de ADNc completos ("full lenght cDNAs"); son consideradas de alta calidad. La eficiencia de clonación obtenida, en términos de número de clonas por biblioteca y porcentaje de clonas recombinantes, fue altamente reproducible y comparable con lo recientemente publicado por Luján y col. (2009), donde no se reportan los tamaños de los insertos clonados. Desde que comprobamos que el uso de radioactividad para dar seguimiento a la síntesis y separación cromatográfica de los ADNc durante el proceso de construcción de las bibliotecas es dispensable; este método es además factible de ser establecido en cualquier laboratorio básico de biología molecular.

Las 4 bibliotecas de ADNc de *A. tequilana* generadas en este trabajo fueron construidas a partir de 3 diferentes órganos en diferentes estados de desarrollo: hojas en diferentes estados de desarrollo y condiciones del ciclo luz/oscuridad; diferentes zonas de piñas en diferentes estados de desarrollo; y puntas de quiote enriquecidas en tejido meristemático colectadas durante el día y la noche; a diferencia de las bibliotecas previamente reportadas las cuales fueron generadas a partir solamente de hojas de *A. americana* o de *A. tequilana* (Reina *et al.*, 2007; Luján *et al.*, 2009); por lo que cubren más ampliamente el transcriptoma de los agaves.

Como una aplicación de estas bibliotecas; mediante un análisis preliminar de su contenido por secuenciación al azar de ESTs; identificamos genes involucrados en respuestas fisiológicas y en vías metabólicas básicas o particularmente relevantes en los agaves; como son: la fijación de carbono,

el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), el estrés abiótico, y la biosíntesis de carbohidratos de reserva de alto peso molecular. Cuatro de las secuencias de ESTs aquí reportadas (*Atq-rbcS*, *Atq-NADP-ME*, *Atq-LEA-like*, y *Atq-rRNA18S*) no habían sido previamente reportadas en *A. tequilana* y representan un porcentaje importante de los diferentes tipos de genes actualmente depositados en el GenBank. Los protocolos aquí establecidos para el análisis de expresión por RT-PCR de los genes reportados, son útiles para el estudio de la expresión génica no solo en *A. tequilana* si no también en otros agaves, podrán ser adaptados para realizar análisis cuantitativos de expresión génica por RT-PCR Tiempo Real, y aplicarse en el estudio de la participación de estos genes en procesos fisiológicos como la maduración de la piña, estudiar su regulación por factores ambientales como el desarrollo bajo diferentes condiciones de cultivo, y analizar a nivel molecular posibles adaptaciones fisiológicas y metabólicas que le confieren a este tipo de plantas su alta tolerancia a estrés abiótico. Otros genes con funciones específicas dentro del complejo metabolismo o la fisiología de los agaves podrán ser aislados e identificados a partir de las bibliotecas aquí generadas, ya sea con abordajes como la hibridación en colonia, o por secuenciación masiva de los ADNc. Adicionalmente, en estas bibliotecas los ADNc se encuentran clonados en vectores de “entrada” de la tecnología Gateway, lo cual hace factible transferir posteriormente por recombinación los ADNc clonados a diversos vectores de expresión (“destino”), y expresarlos en sistemas heterólogos para analizar las propiedades y funciones de las proteínas recombinantes.

CONCLUSIONES

Se establecieron métodos rápidos y fáciles de ejecutar, que permiten extraer ARN total y ARNm de alta calidad en términos

de pureza e integridad, en cantidades y concentraciones adecuadas para realizar retrotranscripciones y construir bibliotecas de ADNc. El método de contrucción de bibliotecas mostró ser altamente reproducible a partir de una variedad de tejidos, en términos de eficiencia de clonación y tamaños de inserto. Los métodos aquí establecidos y detalladamente descritos son técnicamente accesibles y factibles de ser establecidos en cualquier laboratorio básico de biología molecular; por lo que podrán ser útiles para el número creciente de grupos de investigación a nivel nacional e internacional interesados en la fisiología de los agaves, su metabolismo, y sus productos biotecnológicos. Las bibliotecas de ADNc de *A. tequilana* aquí generadas son de alta calidad; en base a su alto título y eficiencia de recombinación, así como en base al tamaño de insertos los cuales, según verificamos por secuenciación, pueden contener ADNc completos (“full lenght cDNAs”); y cubren el transcriptoma expresado en 3 órganos de agave (hoja, piña, y punta apical del quiote), en plantas de diferente estado de desarrollo y bajo diferentes estados del ciclo luz/oscuridad. Los genes de *A. tequilana* aquí identificados aportan información relevante al actualmente escaso conocimiento de secuencias génicas codificantes de agaves, y servirán para posteriores estudios de fisiología molecular y regulación metabólica. Los protocolos aquí establecidos para el análisis de expresión por RT-PCR de los genes reportados, son útiles para el estudio de la expresión génica no solo en *A. tequilana* si no también en otros agaves. Las bibliotecas de ADNc aquí generadas, son un producto de alto valor ya que podrán ser utilizadas para realizar estudios transcriptómicos del *A. tequilana*, a través de la secuenciación masiva de ESTs, la impresión de microarreglos para realizar análisis masivos de expresión génica, y/o la trasferencia masiva de genes a vectores para la expresión de proteínas recombinantes en sistemas heterólogos; e identificar y estudiar otros

genes de agave involucrados en los distintos procesos fisiológicos, metabólicos y de desarrollo de este género.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo SEP-Ciencia Básica 44404 y el proyecto FOMIX-Campeche 23821; utilizados para el desarrollo de este proyecto y el otorgamiento de becas. Al rancho Sta. Elena en Tequila, Jal.

y la Tequilera Corralejo por la donación de material vegetal. A la Ing. Ma. Jazmín Abraham Juárez por el cDNA de raíz utilizado en los RT-PCR. Al Dr. Luis Herrera Estrella y el personal técnico del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) por las facilidades prestadas para la secuenciación de los ESTs. Al Dr. Juan José Peña Cabriales del CINVESTAV campus Gto., por la amable facilitación del uso de contador de centelleo líquido.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Annunciado, T.R., Sydenstricker, T.H., Amico, S.C. (2005) Experimental investigation of various vegetable fibers as sorbent materials for oil spills. *Marine Pollution Bulletin* **50**: 1340-1346.
- Ávila-Fernández, A., Olvera-Carranza, C., Rudiño-Piñera, E., Cassab, G.I., Nieto-Sotelo, J., López-Munguía, A. (2007) Molecular characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Plant Science* **173**: 478-486.
- Bhimte, N.A., Tayade, P.T. (2007) Evaluation of microcrystalline cellulose prepared from sisal fibers as a tablet excipient: a technical note. *AAPS PharmSciTech* **8**: 8.
- Bianchi, E., Cole, J.R. (1969) Antitumor agents from *Agave schottii* (Amaryllidaceae). *Journal of Pharmaceutical Sciences* **58**: 589-591.
- Bousios, A., Saldana-Oyarzabal, I., Valenzuela-Zapata, A.G., Wood, C., Pearce, S.R. (2007) Isolation and characterization of Ty1-copia retrotransposon sequences in the blue agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) and their development as SSAP markers for phylogenetic analysis. *Plant Science* **172**: 291-298.
- Callen, E.O. (1965) Food habits of some pre-Columbian Mexican Indians. *Economic Botany* **19**: 335-343.
- Cedeño, M. (1995) Tequila production. *Critical Reviews in Biotechnology* **15**: 1-11.
- 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.
- Colunga-García Marín, P., Coello-Coello, J., Eguiarte, L., Piñero, D. (1999) Isoenzymatic variation and phylogenetic relations between henequén *Agave fourcroydes* Lem. and its wild ancestor *A. angustifolia* Haw. *American Journal of Botany* **86**: 115-123.
- 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. *Journal of Ethnopharmacology* **8**: 149-161.
- García-Mendoza, A. (2002) Distribution of *Agave* (Agavaceae) in México. *Cactus and Succulent Journal* **74**: 177-188.
- García-Mendoza, A. (1995) Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México. En Linares-Mazari, E., Dávila, P., Chiang, F., Bye, R., Elias, T.S. (eds.) Conservación de plantas en peligro de extinción: Diferentes enfoques. UNAM, Inst. Biología, México D.F., pp. 45-47.
- García-Mendoza, A. Galván-Villanueva, R. (1995) Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaeae 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. (1982) Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press.
- Gil-Vega, K., Diaz, C., Nava-Cedillo, A., Simpson, J. (2006) AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science* **170**: 904-909.
- Gomez, E., Tuohy, K.M., Gibson, G.R., Klinder, A., Costabile, A. (2009) In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of agave fructans. *Journal of Applied Microbiology*, Nov 4. Publicado en línea previo a publicación impresa.
- Goncalves de Lima O (1956) El maguey y el pulque en los códices mexicanos. Fondo de Cultura Económica. México.
- Good-Ávila, S.V., Souza, V., Gaut, B.S., Eguiarte L.E. (2006) Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **103**: 9124-9129.
- Granados-Sánchez, D. (1993) Los Agaves en México. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- 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 *Trichomonas vaginalis*. *Revista de Biología Tropical* **56**: 1645-1652.
- Guerrero, C., Martín-Ruifán, M., Reina, J.J., Heredia, A. (2006) Isolation and characterization of a ADNc encoding a membrane bound acyl-CoA binding protein from *Agave americana* L. epidermis. *Plant Physiology and Biochemistry* **44**: 85-90.
- Hernández F. (1942) Historia de las plantas de Nueva España. Instituto de Biología de la Universidad Autónoma de México. México.
- Kelly, G. (2009) Inulin-type prebiotics: a review. (Part 2). *Alternative Medicine Review* **14**: 36-55.
- Kelly, G. (2008) Inulin-type prebiotics--a review: part 1. *Alternative Medicine Review* **13**: 315-29.
- Lozoya, X. (1995) Arqueología de la tradición herbolaria. *Arqueología Mexicana* **3**: 3-9.
- Luján, R., Lledías, F., Martínez, L.M., Barreto, R., Cassab, G.I., Nieto-Sotelo, J. (2009) Small heat shock proteins and leaf cooling capacity account for the unusual heat-tolerance of the central spike leaves in *Agave tequilana* var. Weber. *Plant Cell and Environment* **32**: 1791-803.
- Mancilla-Margalli, N.A., López, M.G. (2006) Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 7832-7839.
- Matic, M. (1956) The chemistry of plant cuticles: a study of cutin from *Agave americana* L. *Biochemistry Journal* **63**: 168-176.
- Muthangya, M., Mshandete, A.M., Kivaisi, A.K. (2009) Two-stage fungal pre-treatment for improved biogas production from sisal leaf decortication residues. *International Journal of Molecular Science* **10**: 4805-4815.

- Narváez-Zapata, J.A., Sánchez-Teyer, F. (2009) Agaves as a Raw Material, Recent Technologies and Applications. *Recent Patents on Biotechnology* **3**: 185-191.
- 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.
- 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.
- Parsons, R., Darling, J.A. (2000) Maguey (*Agave* spp.) Utilization in Mesoamerican Civilization: A case for Precolumbian "Pastoralism". *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, **66**: 81-91.
- Parson, J.R., Parsons, H. (1990) Maguey utilization in highland central Mexico: an archaeological ethnography. University of Michigan; Ann Arbor.
- Peana, A.T., Moretti, M.D., Manconi, V., Desole, G., Pippia, P. (1997) Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroid saponins of *Agave americana*. *Planta Medica* **63**: 199-202.
- Pereira-Da Silva, B., Valente, A.P., Parente, J.P. (2006) A new steroid saponin from *Agave shrevei*. *Natural Product Research* **20**: 385-390.
- Pizarro, A.P., Oliveira-Filho, A.M., Parente, J.P., Melo, M.T., dos Santos, C.E., Lima, P.R. (1999) Utilization of the waste of sisal industry in the control of mosquito larvae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **32**: 23-29.
- Ramírez, J. (1995) Los magueyes, plantas de infinitos usos. *Biodiversitas. CONABIO* **3**: 1-7
- Ravenscroft, N., Cescutti, P., Hearshaw, M.A., Ramsout, R., Rizzo, R., Timme, E.M. (2009) Structural Analysis of Fructans from *Agave americana* Grown in South Africa for Spirit Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 3995-4003.
- Reina, J.J., Guerrero, C., Heredia, A. (2007) Isolation, characterization, and localization of AgaSGNH cDNA: a new SGNH-motif plant hydrolase specific to *Agave americana* L. leaf epidermis. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2717-2731.
- Roberfroid, M.B. (2007) Inulin-type fructans: functional food ingredients. *Journal of Nutrition* **137**: 2493S-2502S.
- Sahagún, Fray B. de. (2001) Historia general de las cosas de la Nueva España. Vols. I y II. Crónicas de América. Dastin Historia. Madrid.
- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **74**: 5463-5467.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680.
- Urias-Silvas, J.E., Cani, P.D., Delmée, E., Neyrinck, A., López, M.G., Delzenne, N.M. (2008) Physiological effects of dietary fructans extracted from *Agave tequilana* Gto. and *Dasyliuron* spp. *British Journal of Nutrition* **99**: 254-261.
- Vargas-Ponce, O., Zizumbo-Villarreal, D., Martínez-Castillo, J., Coello-Coello, J., Colunga-GarcíaMarín, P. (2009) Diversity and structure of landraces of *Agave* grown for spirits under

- traditional agriculture: A comparison with wild populations of *A. angustifolia* (Agavaceae) and commercial plantations of *A. tequilana*. *American Journal of Botany* **96**: 448-457.
- Villena, J.F., Dominguez, E., Stewart, D., Heredia, A. (1999) Characterization and biosynthesis of nondegradable polymers in plant cuticles. *Planta* **208**: 181-187.
- 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.