



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

**Localización física de dos familias de genes *NBS-LRR*
en *Agave fourcroydes***

Tesis que presenta
SAYURI ALEXANDRA VICTORIA VELASCO

En opción al título de
MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: OPCIÓN BIOTECNOLOGÍA)

Mérida, Yucatán, México

2023

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

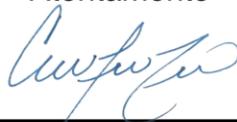


RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Sayuri Alexandra Victoria Velasco** titulado “**Localización física de dos familias de genes *NBS- LRR* en *Agave fourcroydes***”, fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en la línea de Agrobiotecnología en el laboratorio de Marcadores Moleculares del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del **Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer** y codirección del **Dr. Manuel Martínez Estévez**, dentro de la opción de Biotecnología , perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Esta tesis tiene orientación al desarrollo socioeconómico de la región ya que se enfoca a un cultivo arraigado en la cultura mexicana, los agaves, y se enfoca a herramientas que sirven de base para su mejoramiento genético

Atentamente



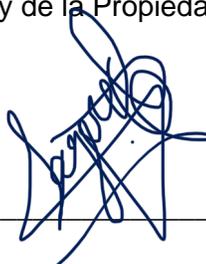
Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 27 de junio de 2023

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: Sayuri Alexandra Victoria Velasco

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de los doctores Lorenzo Felipe Sánchez Teyer y Manuel Martínez Estévez.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo financiero brindado por el CONACYT con la beca n° 1024422 para la realización de este trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por la oportunidad que me dieron para realizar mis estudios dentro de la institución y permitirme forjar la pasión por la investigación.

Al Dr. Felipe Sánchez Teyer y el Dr. Manuel Martínez Estévez mis directores de tesis, por permitirme trabajar en su laboratorio, por los consejos y sugerencias, por la paciencia y las enseñanzas compartidas.

A los Doctores, Luis David Patiño López y Jorge Humberto Caamal Velazquez, mis sinodales, por sus valiosas y acertadas sugerencias.

A mis compañeros de laboratorio, Miguel, Tere, Alba, por su sincera amistad y ayuda brindada durante mi estancia. En especial a Maria José y por orientarme y compartir sus conocimientos en gran parte del trabajo de este proyecto y Fabiola Escalante por la asistencia técnica brindada.

También deseo agradecer a todo el personal administrativo del CICY por las acciones de operación y logística implicadas para hacer posible este grado académico.

DEDICATORIAS

Agradezco a Dios por permitirme tener salud y darme la oportunidad de haber cumplido este sueño que ha sido pilar en mi vida para cumplir muchos más.

A mi madre Maribel Velasco, que siempre ha sido mi soporte y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida ya que con su amor, comprensión y motivación he logrado concluir esta etapa.

A mis compañeros de laboratorio que con su curiosidad y conocimientos han aportado muchos granitos de arena para pulir este proyecto.

A mis amigos y hermanos que me han motivado en momentos difíciles para siempre seguir adelante y no darme por vencida.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1 GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>ÁGAVE</i>	3
1.2 GENES DE RESISTENCIA	4
1.2.1 GENES R (NBS-LRR).....	7
1.2.2 EVOLUCIÓN Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE LOS GENES <i>NBS-LRR</i>	8
1.2.3 NBS-LRR EN <i>ÁGAVE</i>	9
1.3 MAPEO.....	12
1.3.1 MAPEO GENÉTICO.....	13
1.3.2 MAPEO FÍSICO	13
1.3.3 ESTUDIOS PREVIOS SOBRE MAPEOS FÍSICOS	14
1.3.4 CARIOTIPOS DEL GÉNERO <i>ÁGAVE</i>	17
1.5 ORGANIZACIÓN CROMOSÓMICA MEDIANTE FIBRA DE ADN.....	18
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS.....	19

OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
CAPÍTULO II.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA FISH	22
2.2 MARCAJE DE LA SONDA POR PCR	23
2.3 PRETRATAMIENTO Y PREPARACIÓN DE CROMOSOMAS	23
2.4 DESNATURALIZACIÓN E HIBRIDACIÓN DE LA SONDA MARCADA	24
2.5 EXTENSIÓN DE FIBRAS DE ADN	25
CAPÍTULO III.....	26
RESULTADOS	26
3.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS	26
3.2 MARCAJE DE SONDA	27
3.4 DETECCIÓN DE SITIOS DE HIBRIDACIÓN.....	28
3.5 FIBRA DE ADN.....	33
CAPITULO IV	35
DISCUSIÓN GENERAL.....	35
CAPITULO V	42
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	42
BIBLIOGRAFÍA	44

ABREVIATURAS

pb	Pares de bases
NBS-LRR	Nucleotide-Binding Site-leucine-rich repeat
Avr	Proteínas de avirulencia
SSC	Saline Sodium Citrate
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
RHOD	Rodamina
cM	Centimorgan
nm	nanómetros
Cy3	avidin-cyanine-3

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Dominios principales de las proteínas NBS-LRR.....	8
Figura 1. 1 Expresión absoluta de los genes NBS-LRR evaluados por RT-qPCR ...	11
Figura 1. 2 Porcentaje de representatividad en la expresión global de la expresión de los grupos I, II, V	12
Figura 1.4 Estrategia experimental	21
Figura 3.1 Células de raíz de <i>A. fourcroydes</i>	26
Figura 3.2 Amplificación de genes <i>NBS-LRR</i> en <i>Agave fourcroydes</i>	27
Figura 3.3 Marcaje indirecto de los genes <i>NBS-LRR</i>	28
Figura 3.4. Análisis de FISH mostrando la distribución de genes ribosomales.....	29
Figura 3.5. Análisis de FISH mostrando la distribución de genes universales y familia 1	30
Figura 3.6. Análisis de FISH mostrando la distribución de genes universales y familia 2	31
Figura 3.7. Análisis de FISH mostrando la distribución de familia 1 y familia 2 en células en interfase.....	31
Cuadro 3.1. Análisis de intensidad de fluorescencia de los sitios de hibridación. ..	32
Figura 3.8. Fibra de ADN de <i>A. fourcroydes</i>	33

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.2 Análisis de intensidad de fluorescencia de los sitios de hibridación28

Cuadro 3.1 Sondas marcadas32

RESUMEN

Agave fourcroydes es una especie que históricamente ha tenido una gran importancia económica y social en la Península de Yucatán, utilizada principalmente para la producción de fibras. Durante su etapa de desarrollo es susceptible ante distintos tipos de estrés, ya sean bióticos o abióticos, ante los cuales desarrolla una respuesta como parte de su mecanismo de defensa. Al desencadenar esta respuesta, proteínas tales como las proteínas R son involucradas en el reconocimiento específico para patógenos y por ende, distintos genes son expresados, en este caso la mayoría de las proteínas R están codificadas por un grupo de genes llamados repeticiones ricas en leucina del sitio de unión de nucleótidos (NBS-LRR). En estudios previos de nuestro grupo de investigación los genes *NBS-LRR* han sido identificados y caracterizados en *A. tequilana* bajo las condiciones de infección de un patógeno, en la caracterización de estos genes se han identificado regiones parciales del gen NBS-LRR, éstas fueron agrupadas en familias de acuerdo a su estructura y sus motivos conservados. A partir de estos grupos se diseñaron cebadores específicos y se evaluó su respuesta de expresión experimentalmente. Ante la respuesta diferencial se crearon grupos con el fin de evaluar y comparar la respuesta de cada uno. En este trabajo se usaron las familias 1 y 2 como cebadores específicos, empleadas como sondas para Hibridación Fluorescente *In Situ*. A partir de estos resultados se logró identificar físicamente cada familia en el genoma de *Agave fourcroydes* y por ende aporta la base para realizar estudios futuros de mapeo físico con relación a otros genes de interés, así como también con otras especies del mismo género que también presentan una importancia económica y social a nivel mundial.

ABSTRACT

Agave fourcroydes is a species that has historically had great economic and social significance in the Yucatan Peninsula, used mainly for the production of fibers. During its development stage it is susceptible to different types of stress, whether biotic or abiotic, to which it develops a response as a defense mechanism. By triggering this response, proteins such as the R are involved in pathogen-specific recognition and therefore different genes are expressed, in this case most of the R proteins are encoded by a group of genes called leucine-rich repeats of the site. nucleotide binding (*NBS-LRR*). In previous studies by our research group, the *NBS-LRR* genes have been identified and characterized in *A. tequilana* under pathogen infection conditions. In the characterization of these genes, partial regions of the *NBS-LRR* gene have been identified, which were grouped according to its structure and its motifs preserved. From these groups, specific primers were designed, and their expression response was evaluated experimentally. Given the differential response, groups were created in order to evaluate and compare the response of each one.

In this work, families 1 and 2 were used as specific primers, used as probes for Fluorescent *In Situ* Hybridization. The analysis of this cytogenetic technique with the described methodology contributes to physically identify each family in the *Agave fourcroydes* genome and therefore provides the basis for future physical mapping studies in relation to other genes of interest as well as other species of the same gender that also have economic and social importance worldwide.

INTRODUCCIÓN

El henequén (*Agave fourcroydes*) es una planta fácil de identificar por su roseta de hojas rígidas y alargadas de hasta metro y medio de largo. De estas hojas es de dónde se extrae su fibra, conocida por ser muy resistente y duradera, utilizada para hacer sogas, textiles, e incluso arte (Colunga y May-Pat, 1993; Colunga-García, 1999).

Es una especie tolerante a suelos alcalinos y temperaturas extremas que caracterizan su entorno. Suelen ser plantas xerófitas, adaptadas a vivir en condiciones desfavorables, con largos periodos de sequía y altas temperaturas.

De acuerdo con Mendoza (2007), las especializaciones morfológicas que adquieren las plantas a condiciones adversas consisten en modificaciones en la estructura básica como respuesta a las presiones del ambiente, por lo que los agaves poseen estrategias para sobrevivir en ambientes secos o periódicamente secos, especialmente en el suelo, con fuertes fluctuaciones de temperatura entre el día y la noche, las cuales tienden a limitar la pérdida de agua por transpiración y a acumularla en tejidos. El desarrollo de succulencia en las hojas es una de sus adaptaciones más notables, ya que el agua almacenada durante la época de lluvias permite que las plantas sobrevivan durante algún tiempo en ausencia del suministro de agua del exterior, lo que ocurre cuando las condiciones son tales que la raíz ya no es capaz de extraerla del suelo (Mendoza, 2007).

Esta especie se propaga vegetativamente a través de brotes que crecen en los extremos de la raíz y se conocen como rizomas (Colunga-García *et al.*, 1999). Dadas las condiciones climáticas bajo las que crece este cultivo y tomando en cuenta que es un cultivo que alcanza su madurez en un periodo de 15 a 20 años, se encuentra susceptible al desarrollo de patógenos microbianos; tales como bacterias (*Erwinia carotovora*, *Pectobacterium* sp.), hongos (*Fusarium oxiosporum*, *F. moniliforme*, *Lasodiplotia* sp) y plagas como el picudo (*Scyphophorus acupunctatus*, *Acanthoderes funeraria*) (Campos-Rivero *et al.*, 2020).

Los genes de resistencia son los responsables de la defensa de las plantas contra organismos patógenos, sin embargo, a pesar de la gran importancia del cultivo de henequén y la diversidad de patógenos que afectan su producción, la estructura y localización de sus genes de resistencia, han sido poco estudiadas en comparación con otras plantas. (Staskawiez *et al.*, 1995).

En plantas, las proteínas de resistencia (R) están involucradas en el reconocimiento específico de efectores patogénicos durante el proceso de infección y en el subsecuente desarrollo de la respuesta de defensa en el hospedero. La mayoría de las proteínas R contiene un dominio de unión a nucleótidos (NBS) y repeticiones ricas en leucina (LRR) (Martínez-Pacheco, 2018).

Las respuestas de resistencia a las enfermedades en las plantas son complejas y contienen múltiples capas de interacción entre genes, proteínas y metabolitos. La necesidad de desarrollar nuevas estrategias para la protección de los cultivos conduce a explorar los mecanismos moleculares de la resistencia en las plantas.

Una de estas estrategias abarca la manipulación por ingeniería genética de los genes responsables de la resistencia en cultivos económicamente importantes, tales como los agaves. Esta manipulación implica primeramente comprender la regulación de estos genes implicados en el proceso de respuesta de la planta ante la presencia de algún patógeno como mecanismo de defensa. Por consiguiente, el presente trabajo tiene por objetivo la generación de un mapa físico de las regiones que contienen diferentes familias de genes *NBS-LRR*.

Una de las principales ventajas del mapeo genético y físico es la posibilidad de integrar rasgos de interés y la función correspondiente de los genes (Bakker *et al.*, 2011). La disponibilidad de los mapas funcionales es importante no solo para comprender mejor la evolución de las especies de plantas, sino también para los programas de mejoramiento asistido por marcadores.

A partir de este tipo de investigaciones se construyen bases sólidas para estudios futuros para mapear y asociar marcadores con loci únicos o loci de rasgos cuantitativos para rasgos agronómicos importantes.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Generalidades del género *Agave*

El género *Agave* pertenece a la familia de Asparagaceae perteneciente al orden Asparagales. La familia es reconocida el sistema de clasificación APG III, dentro de la cual se encuentran 288 especies de agaves, de las cuales 166 son magueyes, agrupados en el género *Agave* (Pérez *et al.*, 2016).

Desde la antigüedad el hombre ha aprovechado a los agaves como alimento, para la obtención de fibras, fabricación de bebidas y como material de construcción. Su importancia económica actual deriva principalmente de la obtención de fibras y bebidas alcohólicas (García-Mendoza, 2007).

García-Mendoza (2007) indica que hasta el momento no existe ningún trabajo de clasificación que aborde todas las especies del género agave, ya que el más reciente fue realizado a nivel infra-genético y lo elaboró Gentry en 1982; sin embargo, sus análisis solo incluyen los agaves de Norteamérica. También se afirma que Gentry presentó resultados de un intenso trabajo de campo que incluyó colecciones, caracteres morfológicos, variaciones en las poblaciones, complejos taxonómicos, áreas de distribución, hábitat, aspectos fenológicos, usos y presencia de compuestos secundarios y con base en esto, se han descrito 15 nuevas especies de varias partes de la república (Pérez *et al.*, 2016). El gran número de especies de agave es notable, si se toma en cuenta la gran similitud morfológica y ecológica que existe entre la mayoría de las especies del género (Eguiarte *et al.*, 2000).

Estas son plantas perennes, con hojas dispuestas en forma de espiral y en rosetas en el ápice de un tallo. Las hojas son suculentas, fibrosas y carnosas (Gentry, 1982; Eguiarte *et al.*, 2000). Su tipo de metabolismo es CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*) lo que le permite establecerse en climas semiáridos (Cushman 2001). Las plantas con este metabolismo tienen una serie de adaptaciones fotosintéticas para así poder sobrevivir. Una de las principales adaptaciones es que la fijación de carbono la realizan durante la noche y el transporte de electrones durante el día, para evitar la pérdida de agua por evapotranspiración (Al-Turki *et al.*, 2014). Otra adaptación importante que les permite sobrevivir a estos climas, son sus hojas suculentas, que almacenan grandes cantidades de agua, permitiendo resistir períodos prolongados sin lluvia o riego (Sayed, 2001), además las plantas CAM tienen la posibilidad de adaptar la tasa fotosintética dependiendo de la temperatura en un lapso de 24 horas (Yamori *et*

al., 2014). Todo esto hace que el género *Agave* pueda establecerse en zonas con poca precipitación y de altas temperaturas.

Los agaves son monocárpicos, esto es, que sólo tienen una floración previa a la muerte. Durante su proceso de floración generan una alta producción de semillas obtenidas por la fecundación, siendo su tipo de reproducción sexual, sin embargo, debido a su gran depredación por insectos y también a que las condiciones de germinación no son adecuadas, lo ideal es su propagación asexual por vía de hijuelos de rizoma (Granados, 1993).

La propagación asexual por hijuelos jóvenes derivados de rizoma es la forma natural más común y exitosa de multiplicación de plantas silvestres de *Agave spp.*, así como en plantaciones comerciales donde esta práctica facilita el manejo agronómico (Arizaga y Ezcurra 2002). En el caso de la reproducción sexual, es a través de la producción de semillas: cuando inicia la floración, la planta desarrolla una larga inflorescencia (escapo floral) con flores que producen mucho néctar y polen, como resultado del crecimiento del meristemo apical, cuyas flores son polinizadas principalmente por murciélagos *Peptonycteris* y *Choeronycteris* (Gentry, 1982), mientras que los insectos como polillas, abejas y abejorros e inclusive aves como colibríes polinizan a las plantas del subgénero *Littaea* (Eguiarte *et al.*, 2000).

Los frutos producen miles de semillas, pero son escasas las que germinan y generan un individuo nuevo en el ambiente silvestre (García-Mendoza, 2007). Sus semillas suelen ser lacrimiformes, planas y de color negro brillante (Vázquez *et al.*, 2011).

Además, las plántulas que logran establecerse pocas veces prosperan por falta de condiciones adecuadas para su crecimiento, principalmente por escasa humedad en el suelo y por efectos de herbivoría o de enfermedades (Eguiarte *et al.*, 2000). Por otro lado, debido a las condiciones climáticas que requiere esta especie para crecer tales como altas temperaturas y humedad, favorecen el desarrollo de patógenos microbianos; los cuales producen enfermedades que pueden llegar a matar a la planta. El poder conocer la respuesta de la planta ante los patógenos es vital para poder saber los mecanismos y genes implicados (Eguiarte *et al.*, 2000).

1.2 Genes de resistencia

Las plantas constantemente interactúan con una gran variedad de organismos tales como virus, bacterias, hongos, nematodos e insectos. Las poblaciones silvestres generalmente pueden enfrentar este tipo de patógenos potenciales, por lo que cuando los cultivos genéticamente uniformes cubren áreas extensas, pueden sufrir graves daños por patógenos virulentos, por lo tanto, se requieren medidas costosas de protección para reducir las pérdidas productivas (García y Lozoya, 2004).

Desde hace tiempo se conoce que moléculas localizadas en la superficie de las células del patógeno o secretadas por las mismas activan los mecanismos de defensa en las plantas, estas moléculas pueden ser de diferente naturaleza química, como carbohidratos, lípidos, y proteínas (García y Lozoya, 2004). La necesidad de desarrollar nuevas estrategias para la protección de los cultivos conduce a explorar los mecanismos moleculares de la resistencia en las plantas (van't Slot y Knogge, 2002). Una de estas estrategias contempla con buenas posibilidades, la manipulación por ingeniería genética de los genes responsables de la resistencia en cultivos económicamente importantes (García y Lozoya, 2004).

Los genes de resistencia están estrechamente relacionados con la capacidad de respuesta de las plantas hacia organismos patógenos, estos a su vez contienen en su estructura proteínas como las proteínas NBS-LRR, que están codificadas por una de las familias de genes más grandes e importantes implicadas en la resistencia a las enfermedades en las plantas (García y Lozoya, 2004). Muchas de estas proteínas NBS-LRR reconocen efectores secretados por patógenos directa o indirectamente, que, a su vez, activan vías de señalización que conducen a la activación de la respuesta de defensa de la planta contra diversas clases de patógenos, incluidos bacterianos, fúngicos, virales, nematodos e insectos (Dubey y Singh, 2018).

El dominio NBS, contiene motivos conservados, que han servido de base para el diseño de iniciadores degenerados para el aislamiento de secuencias que presenten los motivos característicos de los genes de resistencia denominados secuencias candidatas a genes de resistencia: RGCs (Hau, 2012). Se ha visto, que las RGCs presentan homología a genes de resistencia, además que se encuentran filogenéticamente relacionados, proporcionando evidencia que ciertas regiones genómicas, probablemente codifican para resistencia ante patógenos (Hau, 2012).

La respuesta de defensa de la proteína NBS-LRR es una estrategia sofisticada que induce la inmunidad activada por efectores (ETI). ETI consta de proteínas R involucradas en el reconocimiento de patógenos intracelulares (Jones y Takemoto, 2004; Dodds y Rathjen, 2010). Las proteínas R están codificadas por una gran cantidad de genes que representan hasta el 1% de todo el genoma de las plantas (Saha *et al.*, 2013). Estos genes varían entre especies y su número puede indicar un patrón evolutivo complejo (Gu *et al.*, 2015). Su distribución de genes se ha explicado por la duplicación de genes en tándem, la duplicación ectópica y la translocación de segmentos cromosómicos completos (Leister 2004; Richly *et al.*, 2002).

El dominio NBS se une e hidroliza ATP y funciona principalmente como un interruptor de transducción de señales después del reconocimiento de patógenos (Leipe *et al.*, 2004). Los LRR son dominios estructurales altamente adaptables que están involucrados en interacciones

proteína-proteína, y estos LRR también pueden desarrollar especificidades de unión muy diferentes (Dubey y Singh, 2018).

La mayoría de estos genes, codifican para proteínas con un dominio de unión a nucleótidos, más un dominio rico repetido en leucina (*NBS-LRR*), estos a su vez, comprenden dos familias clasificadas por la presencia o ausencia del dominio TIR (homología a TOLUreceptor de interleucina-1) en la región N-terminal, denominadas non-TIR-NBS-LRR y TIR-NBS-LRR (Hau, 2012).

En algunas plantas, diferentes miembros de la familia de genes *NBS-LRR* pueden tener respuestas específicas a ciertos patógenos (Arya *et al.* 2014; Rout *et al.*, 2014). En especies de *Agave*, se ha reportado la expresión del gen *NBS-LRR* durante la infección con *Erwinia carotovora* (Tamayo-Ordóñez *et al.*, 2016) y *Lasioidiplodia* (Campos-Rivero *et al.*, 2021).

1.2.1 Genes R (NBS-LRR)

En plantas, a los genes de resistencia se les denomina R y a sus contrapartes en el patógeno, genes de avirulencia (Avr). Los genes R y los genes Avr interactúan uno a uno. Cuando un gen R identifica un gen Avr en el patógeno, activa un proceso de muerte celular en la célula infectada, la denominada respuesta hipersensible (Martínez, 2017). La muerte de la célula infectada por el patógeno detiene por completo el proceso de infección y colonización, y otorga así resistencia a la planta (Martínez-Pacheco, 2017). Se clasifican, según la organización de su dominio, en la repetición rica en leucina de unión a nucleótidos (NB-LRR) y las proteínas de resistencia extracelulares a LRR. La clase NB-LRR es la más abundante, y los miembros pueden poseer dominios de bobina enrollada (CC) o Toll/receptor de interleucina-1 (TIR) amino-terminales (Cillo y Palukaitis, 2014). El dominio NBS está involucrado en la señalización, compuesto por motivos altamente conservados y organizados (Tan y Wu, 2012). El dominio LRR está más relacionado a la interacción proteína-proteína, lo que la hace la región más variable de la proteína (Ellis *et al.*, 2000; Kuang *et al.*, 2004). Existen dos subfamilias de las proteínas NBS-LRR, definidas por la presencia de los motivos Toll/interleukin-1 receptor (TIR) o el motivo *coiled-coil* (CC) en el dominio amino terminal (Figura 1.1). Ambas formas están involucradas en el reconocimiento del patógeno (Meyer *et al.*, 1999), debido a la presencia de estos motivos se clasifican como proteínas TIR-NBS-LRR o CC-NBS-LRR. Las proteínas TIR-NBS-LRR se sabe que están ausentes en las monocotiledóneas, mientras que CC-NBS-LRR están presentes tanto en monocotiledóneas como en eudicotiledóneas y se ha descrito que se agrupan juntas, por lo que se supone un ancestro en común (Meyers *et al.*, 1999; Bai *et al.*, 2002).

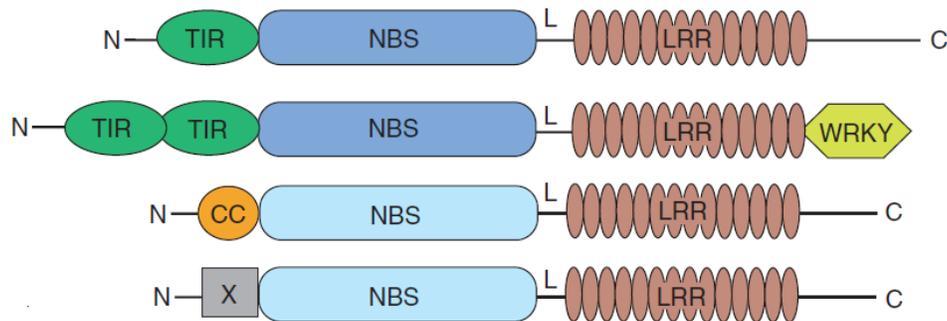


Figura 1.1 Dominios principales de las proteínas NBS-LRR.

Dominios principales de las proteínas NBS-LRR. N, dominio amino terminal; TIR, dominio Toll/interleukin-1 receptor; CC, dominio coiled coil; X, dominio sin motivo CC; NBS, nucleotide binding site; L, linker; LRR, dominio repetido rico en leucinas; WRKY, factor de transcripción tipo dedos de Zinc; C, dominio carboxil terminal (McHale *et al.*, 2006).

1.2.2 Evolución y organización genómica de los genes *NBS-LRR*

Los genes *NBS-LRR* representan una de las familias de genes más numerosas y antiguas de las plantas (Marone *et al.*, 2013). Análisis genéticos indican que el genoma de plantas puede codificar para cientos de genes *NBS-LRR* que pueden ir desde 50 a 653 o más genes dependiendo de la especie (Shang *et al.*, 2009; Porter *et al.*, 2009) agrupados en una gran diversidad de subclases. De acuerdo con Marone y colaboradores, estos genes son muy numerosos en el genoma de la planta, y a menudo ocurren en grupos en loci específicos después de eventos de duplicación y amplificación de genes. Hasta la fecha, se han mapeado cientos de genes de resistencia y relativamente pocos loci de rasgos cuantitativos para la resistencia de las plantas a los patógenos en diferentes regiones. especies, con algunas también clonadas.

Cuando estos genes *NBS-LRR* se mapearon física o genéticamente, muchos casos mostraron una ubicación conjunta entre los loci de resistencia y los genes *NBS-LRR*. Esto ha permitido la identificación de genes candidatos a resistencia y el desarrollo de marcadores moleculares ligados a genes R, lo que sugiere que estos genes están sometidos a una constante evolución (Marone *et al.*, 2013). Estos genes aparentemente parecen estar distribuidos irregularmente en los cromosomas, además su distribución depende de la especie en la que se haya estudiado (Ameline-Torregrosa *et al.*, 2008; Porter *et al.*, 2009; Lozano *et al.*, 2012; Tan y Wu 2012). Los

genes *NBS-LRR* están organizados ya sea como genes aislados o como clusters de genes ligados que se asume que es para facilitar la evolución de los genes R (Hulbert *et al.*, 2001). Estas agrupaciones de genes se pueden dividir en genes que presentan duplicación en tándem o cluster que contienen genes *NBS-LRR* que provienen de diferentes especies.

Los principales mecanismos que se han propuesto para explicar la estructura y evolución de estos genes son: duplicación, entrecruzamiento desigual, y diversificación por selección (Michelmore y Meyers, 1998; Sun *et al.*, 2001). La alta variabilidad de los dominios LRR está relacionada con su papel en el reconocimiento de productos específicos del gen *Avr*, para promover la resistencia de las plantas a los patógenos (Marone *et al.*, 2013).

En efecto, se han encontrado proporciones elevadas de sustituciones de nucleótidos no sinónimos a sinónimos en LRR dominios; esto indica que la selección diversificadora actúa sobre los dominios LRR para mantener variaciones en los residuos expuestos a disolventes (Mondragon-Palomino *et al.*, 2002). Para tener una idea de las variaciones a nivel de dominios LRR, existen, en promedio, 14 LRR por proteína y, a menudo, de cinco a 10 variantes de secuencia para cada repetición; por lo tanto, en especies como *Arabidopsis*, existe el potencial para más de 9×10^{11} variantes (McHale *et al.*, 2006).

1.2.3 NBS-LRR en *Agave*

En el género *Agave* se han aislado diferentes especies de bacterias asociadas a la pudrición del cogollo; siendo *Erwinia Carotova* la más común (Vélez Gutiérrez, 1997; Virgen-Calleros *et al.*, 2000). En la suculenta *Echeveria agavoides* se han aislado 14 cepas de este hongo, de las cuales se ha descrito que dependiendo de la zona geográfica en la que se encuentren y al hospedero, estas se agrupan de manera independiente al resto de la secuencia de otras cepas de *Fusarium spp.* depositadas en el gen bank, estos resultados se repiten en todos los genes analizados: factor de elongación *EF-1*, dos genes de exopoligalacturoasa *Pg1*, *Pg5* y dos genes endopoligalacturonasa *Pgx1* *Pgx4* (Giuseppe *et al.*, 2015). Esta diversidad y especialización se le atribuye en gran medida al gran contenido de elementos móviles en su genoma, lo que le permite un arreglo genético en respuesta a la presión de selección lo que causa que, a su vez, estén bien adaptados para infectar sobre todo a plantas que estén sometidas a cultivo intensivo (Giuseppe *et al.*, 2015).

En cultivos comerciales de *Agave tequilana* Weber var. azul, se obtuvieron 115 aislados de *Fusarium oxysporum* (López-Bautista *et al.*, 2020). Análisis genéticos indican que éstos se

agrupan de acuerdo con su localización geográfica, al igual que los aislados de *Echeveria agavoides* (Giuseppe *et al.*, 2015), además que se identificó la presencia de estos hongos en tejido enfermo y no enfermo, sugiriendo que existe la presencia de hongos no patogénicos que pueden estar presentes en ambos tejidos (Giuseppe *et al.*, 2015). Otra opción también es que las plantas podrían presentar mayor o menor susceptibilidad dependiendo de la cepa del hongo (Vega *et al.*, 2013). Como se menciona anteriormente *Agave tequilana* sufrió una crisis fitosanitaria al ser afectado por este hongo, lo que despertó el interés del estudio y la clasificación de las cepas de *Fusarium spp* en los diferentes cultivares comerciales, con el objetivo del desarrollo de estrategias de control fitosanitaria (Aceves, 2003). Este hongo tiene una amplia diversidad genética que le permite desarrollarse y por ende adaptarse a diferentes hospederos y condiciones medioambientales (Vega *et al.*, 2013). En conclusión, el estrés causado por este hongo y en general por patógenos puede llevar a la muerte a la planta y/o a la disminución de su crecimiento, lo cual afecta directamente en la producción de cual sea su utilización como producto final.

Tamayo-Ordoñez *et al.*, (2016) reportaron que la expresión de los genes *NBS-LRR* en respuesta a estrés biótico causado por *Erwinia carotovora* en *A. tequilana* var. Azul, está a niveles más elevados que algunas especies poliploides como *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* (Figura 1.2). Esto podría estar haciendo más resistente a *A. tequilana* que sus contrapartes poliploides. Esta respuesta es sorprendente ya que se ha reportado previamente que las especies poliploides son más tolerantes a estrés abiótico y biótico en comparación con las especies diploides (Wang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). Sin embargo, tal como se fundamentó anteriormente, este aumento en la expresión no siempre estará relacionado con ganancia de resistencia, se sabe que por el tipo de evolución que presentan estos genes es probable que se estén originando *pseudogenes*, genes que tienen una secuencia parecida a la de interés pero que no codifica para una proteína funcional (Meyers *et al.*, 2003; Marone *et al.* 2013). Posiblemente esto implicaría que una mayor expresión, no necesariamente este confiriendo una mayor resistencia.

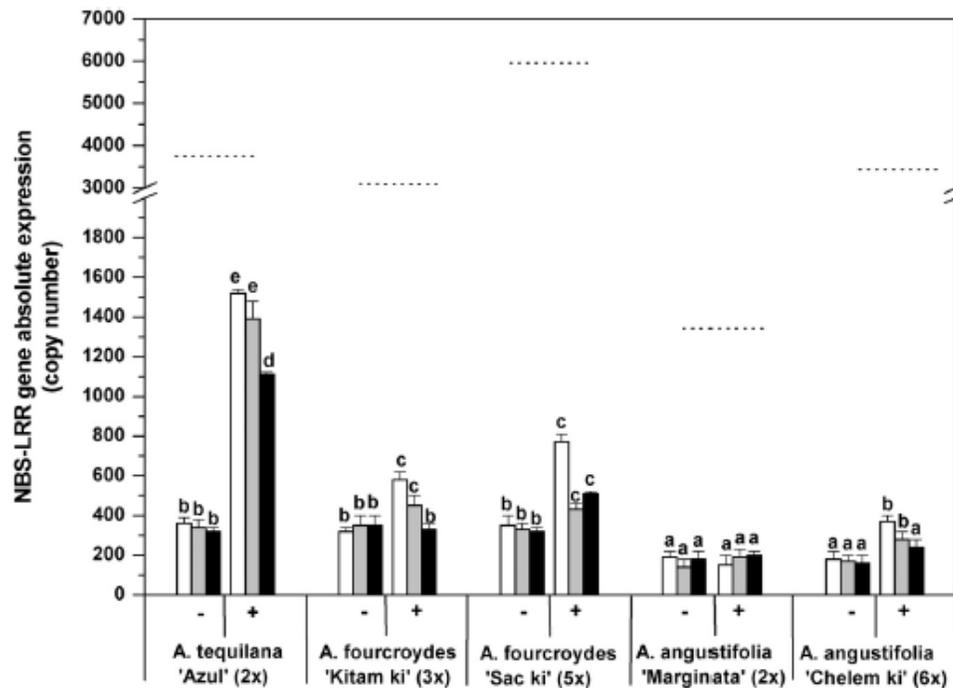


Figura 1. 3 Expresión absoluta de los genes NBS-LRR evaluados por RT-qPCR a las 0.5, 5, 12 h después de la infección con *Erwinia carotova* (Smith) Yabuuchi (+) explantes infectados (-) explantes sin infectar. Las líneas punteadas indican la representatividad (número de copias) de este gen por cada una de las accesiones de Agave (Tamayo-Ordoñez *et al.*, 2016).

Por otro lado, en un estudio realizado por Campos-Rivera *et al.*, (2020) se caracterizaron los genes *NBS-LRR* que se expresaban durante el estrés biótico en *A. tequilana* en presencia de un hongo del género *Lasioidiplodia sp.* Cabe resaltar que este hongo había sido descrito anteriormente en otras especies incluyendo *A. tequilana* (Campos *et al.*, 2020). En el estudio se realizó una búsqueda de secuencias tipo NBS-LRR en el transcriptoma de *A. tequilana*, comparando con las secuencias aminoacídicas de fragmentos previamente clonados. En total se obtuvieron 46 secuencias tipo NBS-LRR que fueron identificadas en el transcriptoma y a partir de éste se construyó un árbol filogenético que se organizaron en 7 grupos. Los clados que incluyeron el mayor número de secuencias fueron el I, II y V, a partir de los cuales se diseñaron cebadores específicos para estos grupos por medio del software Primer3 plus siendo los grupos más representativos, es decir aquellos con el mayor número de secuencias incluidas. Posteriormente se construyeron curvas estándar para analizar el número de copias expresadas de estos genes de acuerdo con la metodología descrita por Tamayo-Ordoñez *et al.*, (2016). En general se determinó que la expresión global de los genes NBS fue inducida por *Lasioidiplodia sp.* (Figura 1.3). Se observó un pico de inducción 1.15 veces mayor en las plantas

infectadas con respecto a las plantas no infectadas a las 48 HPI. Este estudio mostró que los genes *NBS-LRR* de distintas familias presentan perfiles diferenciales de expresión, lo cual sugiere que los genes posiblemente se regulan de manera diferente y por ende es probable que se localicen en regiones diferentes de los cromosomas (Campos-Rivero *et al.*, 2021).

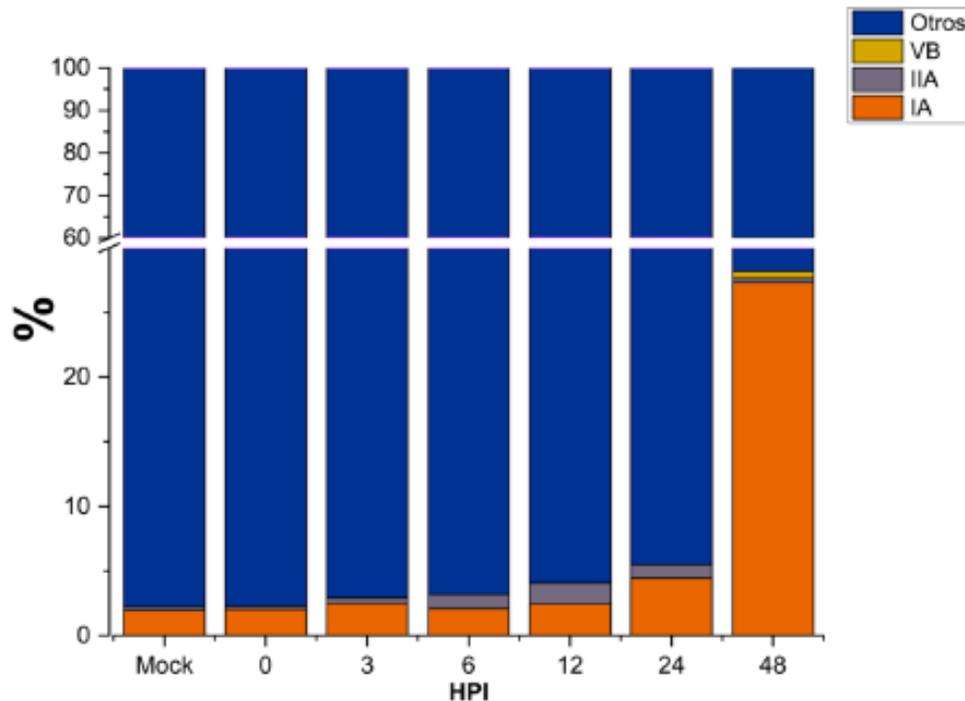


Figura 1. 4 Porcentaje de representatividad en la expresión global de la expresión de los grupos I, II, V durante las primeras 48 horas postinfección del hongo *Lasiodiplodia*. Tomando de (Campos-Rivero, 2021).

1.3 Mapeo

De acuerdo con Manzo y colaboradores (2007) mediante el apoyo de los marcadores de ADN se han podido identificar y desarrollar mapas de algunos genes de interés [avirulencia/patogenicidad, el locus *MAT* (grupo de apareamiento), algunos que están involucrados en la producción de toxinas, y en la producción de pigmentos, íter estéril, principalmente].

Los mapas genéticos y mapas físicos forman la base para numerosas investigaciones básicas y aplicadas, incluyendo estudios de la organización, estructura y evolución del genoma, clonación de genes blanco, comparaciones evolutivas entre especies y otras aplicaciones (Manzo *et al.*, 2007).

1.3.1 Mapeo genético

El mapeo genético también se denomina mapeo de ligamiento, que es una designación lineal de genes o loci dentro de un cromosoma basada en eventos de recombinación (Azhaguvel *et al.*, 2016). Este tipo de mapas ayudan a entender la estructura, función y evolución del genoma y pueden ser una herramienta importante para la identificación de genes de interés (Jurgenson *et al.*, 2002). Los mapas genéticos muestran la localización relativa de marcadores específicos de DNA a lo largo de los cromosomas. Cuanto más cercanos estén dos marcadores, es poco probable que durante un proceso de recombinación genética se separen y lo más probable es que se hereden juntos en una población segregante (Jones *et al.*, 1997).

El mapeo de ligamiento basado en recombinación solo puede usar aquellos loci que muestran polimorfismos entre las líneas parentales, lo que lo hace menos eficiente en muchos cultivos con baja diversidad genética. El mapeo genético permite establecer relaciones de enlace entre genes o marcadores moleculares y es el primer paso para el mapeo físico, que en última instancia abre la puerta al aislamiento de genes basado en mapas (Azhaguvel *et al.*, 2016). Aunque el mapeo de ligamiento puede aclarar la relación mutua entre un conjunto de genes o loci de marcadores genéticos polimórficos, no permite su asignación a un cromosoma en particular. Además, la distancia genética entre dos marcadores calculada en función del número de eventos de recombinación a menudo no refleja su distancia física real. Para abordar estos problemas, se debe realizar un mapeo físico (Kole, 2010).

1.3.2 Mapeo físico

Un mapa físico se define como un mapa que consta de un conjunto de fragmentos de ADN ordenados linealmente que abarcan todo el genoma o una región genómica particular de interés (Azhaguvel *et al.*, 2016). Actualmente, un mapa físico generalmente comprende un conjunto de clones de insertos grandes ordenados, como los cromosomas artificiales bacterianos (BAC), que han reemplazado en gran medida a los cromosomas artificiales de levadura (YAC) como los componentes básicos preferidos de un mapa físico (Meyer *et al.*, 2004). Los mapas físicos pueden ser independientes de la información genética, pero son más valiosos si se vinculan a marcadores mapeados genéticamente y son incluso más poderosos si se integran con datos de secuencias genómicas (Meyer *et al.*, 2004).

Por otro lado los mapas citogenéticos, como su nombre lo indica, incorporan datos de mapas genéticos con características citológicas reales de los cromosomas, como centrómeros y recientemente, señales de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) (Harper y Cande, 2020).

Los mapas citológicos se crean mediante la determinación microscópica de la posición de las estructuras visibles en los cromosomas fijados y teñidos. Estos mapas son un tipo de mapa físico; sin embargo, reservamos el término “mapa físico” para mapas de secuencia de ADN. Los mapas citológicos se pueden basar en cromosomas mitóticos o meióticos y no se basan en datos de recombinación ni contienen información sobre el número de pares de bases entre dos estructuras citológicas. Las posiciones generalmente se informan como un porcentaje de la longitud total del brazo del cromosoma, ya que las proporciones de las longitudes de los brazos para cualquier cromosoma tienden a permanecer constantes. Las longitudes absolutas de los cromosomas cambian drásticamente a lo largo del ciclo celular, y el número de pares de bases por unidad de longitud depende de la condensación de la cromatina (Harper y Cande, 2020).

Por otra parte, uno de los usos principales de los mapas físicos es localizar e identificar la región en el cromosoma de algún gen en particular, ya que algunos genes son usados como sondas para hibridar con algún cromosoma, tales como: ADN (ADN ribosomal), *âtub* (*â*-tubulina), *sodI* (superóxido dismutasa), *niaD* (nitrato reductasa), *Skn-7* (histidina kinasa 7), y *ops* (opsina), por mencionar algunos de ellos (Manzo-Sánchez *et al.*, 2007).

Las comparaciones de mapas citogenéticos de varias especies de plantas diferentes han revelado características comunes interesantes, como la sorprendente reducción de la recombinación alrededor del centrómero y la tendencia general de los genes a ubicarse cerca de los extremos de los cromosomas. Esto probablemente refleja limitaciones fundamentales en la organización y el comportamiento de los cromosomas (Harper y Cande, 2020).

Gracias a los recientes avances en el desarrollo de técnicas moleculares es posible ubicar la posición de secuencias de ADN específicas en mapas citológicos, refiriéndonos a la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) la cual se usa para la localización y detección de secuencias específicas de ADN y ARN en células, secciones de tejido conservadas o tejido completo mediante la hibridación de la cadena complementaria de una sonda de nucleótidos para una secuencia particular (Jensen, 2014).

1.3.3 Estudios previos sobre mapeos físicos

El mapeo físico se ha realizado anteriormente en distintas especies, tal es el caso del modelo más estudiado conocido como *Arabidopsis thaliana*, en el que los genes del ADN ribosomal 5S se mapearon en los cromosomas durante la fase mitótica mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) examinando su distribución en 3 ecotipos diferentes tomando el rDNA 5S como sonda. Los cromosomas y los brazos que portaban el ADNr 5S se identificaron mediante FISH

multicolor con clones de cósmidos y una repetición centromérica de 180 pb como co-sondas (Murata *et al.*, 2003).

En trigo harinero se construyó un mapa físico integrado basado en el cromosoma artificial bacteriano (BAC) del cromosoma más grande, 3B, que solo tiene 995 megabases. Se utilizó una biblioteca BAC específica de cromosomas para ensamblar el 82% del cromosoma en 1036 cóntigos o *contigs* que se anclaron con 1443 marcadores moleculares, lo que proporcionó un recurso importante para los estudios genéticos y genómicos. Este mapa físico pudo establecer una plantilla para los cromosomas de trigo restantes y demuestra la viabilidad de construir mapas físicos en genomas poliploides grandes y complejos con un enfoque basado en cromosomas (Paux *et al.*, 2008).

Por otro lado, se mapearon los loci de rasgos cuantitativos (QTL) para tres rasgos relacionados con trigo (longitud del aristado en la base, la mitad y la parte superior de la mazorca) en una población de línea doble haploide (DH). Para el mapeo de QTL se usó un mapa de ligamiento de marcadores moleculares de este cruce que se construyó previamente en base a 187 líneas DH y 550 marcadores. Se eligió un conjunto de loci de anclaje espaciados regularmente (un marcador cada 20,8 cM) para el análisis de regresión de marcadores y con estos resultados mostraron las ventajas de integrar mapas genéticos moleculares y físicos para lograr la clonación de muchos genes agronómicos (Sourdille *et al.*, 2002).

En especies de agave también se han realizado análisis citogenéticos, tal es el caso de un estudio realizado por Robert y colaboradores en 2008 como parte de un programa de mejoramiento para mejorar la producción de *Agave*, en el que se caracterizaron genéticamente especies con diferentes niveles de ploidía: dos diploides [*A. tequiliana* Weber y el híbrido H11648 ((*A. amaniensis*, *A. angustifolia* Haw.), una triploide (*A. fourcroydes* Lem. var. kitam ki), una tetraploide (*A. angustifolia* var. letona), tres pentaploides (*A. fourcroydes* var. sac ki, *A. fourcroydes* var. yaax ki y *A. sisalana* Perrine) y dos hexaploides (*A. angustifolia* var. chelem ki de dos lugares). Se utilizó la dispersión cromosómica para determinar el número de cromosomas, se empleó la citometría de flujo para medir el tamaño del genoma y se realizó hibridación fluorescente in situ utilizando ADN ribosómico (ADNr) 45S y 5S y las secuencias teloméricas (TTAGGG)_n y (TTTAGGG)_n como marcadores genéticos. Con la sonda (TTAGGG)_n, la señal fue localizada en los telómeros, de acuerdo con los datos publicados que muestran que muchas especies del orden *Asparagales* tienen este tipo de secuencia de telómeros. Se concluyó que las señales teloméricas esporádicas que utilizan la sonda (TTTAGGG)_n probablemente se deriven de errores en la actividad de la telomerasa o de secuencias teloméricas de tipo ancestral. (Robert *et al.*, 2008).

Los análisis genómicos comparativos han indicado que los genomas de plantas pueden codificar varios cientos de genes *NBS-LRR*, y que existe una gran diversidad en el número y distribución de las subclases de estos genes. Hasta la fecha, se ha aislado una gran cantidad de secuencias que codifican NBS de varias especies de plantas a través de análisis de genoma completo: desde alrededor de 50 en *Carica papaya* y *Cucumis sativus* (Porter *et al.*, 2009), hasta 653 en *Oryza sativa* (Shang *et al.*, 2009). Estos datos están sujetos a una evolución continua, ya que las nuevas secuencias genómicas se producen muy rápidamente, pero dan una idea del tamaño y la organización de esta familia de genes en los genomas de las plantas.

En la especie *Phaseolus vulgaris* con la finalidad de caracterizar la organización del grupo de genes B4 R y comprender su evolución en cromosomas, se determinaron y compararon secuencias genómicas seleccionadas del grupo de genes B4 R en dos genotipos de frijol común: BAT93 y JaloEEP558. A través de la técnica de FISH en cromosomas meióticos de un genotipo se reveló que las secuencias B4-CNL del grupo de genes B4 R están ubicadas en la región subtelomérica del brazo corto del cromosoma 4 adyacente a un bloque heterocromático principal y en ambos lados de un bloque heterocromático menor (Geffroy *et al.*, 2008).

La secuencia genómica de BA8 se usó como referencia para la anotación de los genes que codifican *NBS-LRR*. La secuencia de nucleótidos en lugar de la secuencia de proteínas se usó para la comparación porque unos 10 genes, denominados "pseudogenes", no contenían la secuencia de codificación completa. Estos pseudogenes contienen una metionina de inicio, pero presentan cambios de marco o codones de parada prematuros que conducen a proteínas predichas truncadas en comparación con genes *NBS-LRR* de codificación de "longitud completa" (Geffroy *et al.*, 2008).

Así pues, se han construido mapas físicos basados en BAC y se han anclado a mapas genéticos en varias plantas como *Oriza sativa* (Chen *et al.*, 2002), *Z. mays* (Wei *et al.*, 2007), *Carica papaya* (Yu *et al.*, 2009, donde se utilizaron para ordenar mapas físicos y proporcionan un marco para ensamblajes de secuencias genómicas).

El hecho de que los genes residan cerca de los extremos de los cromosomas en una variedad de familias de plantas sugiere que existe alguna razón biológica para esta conservación. De hecho, el aumento de la recombinación y la densidad de genes cerca de los extremos de los cromosomas, y la reducción de la recombinación alrededor del centrómero también es una característica común en los genomas animales. Se especula que estos fenómenos están relacionados con el requisito de recombinación para una división meiótica exitosa, y

posiblemente incluso con el proceso de emparejamiento de cromosomas homólogos durante la profase meiótica temprana.

1.3.4 Cariotipos del género *Agave*

Desde el punto de vista de los estudios cromosómicos, en la familia Agavaceae son pocos (Castorena-Sánchez *et al.*, 1991). Sin embargo, en la actualidad las conclusiones de estas investigaciones, que se iniciaron desde 1944 (Granick, 1944) sostienen que los datos cromosómicos característicos para la familia Agavaceae muestran que el número básico (x) y el haploide es 30 ($2n=60$) (Granick, 1944; Pinkava y Baker, 1985). Partiendo de este origen, estas plantas son consideradas paleopoliploides, esto es, que a partir de estos números cromosómicos se pueden desarrollar poliploides secundarios o neopoliploides. Esto quiere decir, que serían especies con números gaméticos que son múltiplos del número básico $x=30$ (Pinkava y Baker, 1985; García-Mendoza, 2007). El género tiene variación en sus niveles de ploidía con $2n$, $3n$, $4n$, $5n$ y $6n$ (Pinkava *et al.*, 1985). Las especies de *Agave* se caracterizan por tener cariotipo bimodal altamente asimétrico tanto en su condición diploide como poliploide (Castorena *et al.*, 1991). Este rasgo bimodal está dado por un grupo de cinco pares de cromosomas grandes y veinticinco pequeños, lo cual sugiere que evolutivamente existe una tendencia a la orto-selección. Este proceso consiste en la amplificación de regiones de ADN que no codifican genes, en sitios distribuidos entre las regiones de entrecruzamiento en los cromosomas del complemento (Brandham y Doherty, 1998). Este proceso da como resultado un número básico uniforme y cariotipos que mantienen su estructura con cromosomas grandes y pequeños (Brandham y Doherty, 1998; Moreno *et al.*, 2007). En el caso de *A. fourcroydes* el modelo descrito en el presente trabajo es una especie pentaploide que cuenta con 5 juegos de cromosomas, equivalente a un total de 150 cromosomas por célula.

1.4 HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH). La técnica de FISH fue descrita por Gall y Pardue en 1969. El principio de la técnica consiste en la hibridación de una sonda de ADN previamente marcada con un fluorocromo específico directamente sobre el ADN cromosómico, aprovechando la homología existente entre éstas (Herrera, 2007). La sonda es el fragmento de ADN o ARN que se marca para su detección durante el experimento de hibridación *in situ*, se puede utilizar cualquier fuente de ADN o ARN para obtener la sonda para la hibridación *in situ* en función de los requisitos del experimento (Schwarzacher y Heslop, 2000). Las secuencias de ADN clonadas son unas de las más utilizadas al igual que las de ADN genómico total, los productos de PCR y los oligonucleótidos sintéticos. A menudo, se conoce la información molecular sobre la secuencia, el número de copias, la organización genómica y la especificidad

de la sonda y puede ser la razón para llevar a cabo el experimento de hibridación *in situ*, tal es el caso del presente trabajo, en el cual, la sonda utilizada son las familias de genes *NBS-LRR*. La hibridación *in situ* del ADN puede proporcionar información sobre la organización, la ubicación cromosómica y la distribución genómica, el número de copias, los cambios evolutivos y cambios con otras secuencias, que no se puede obtener por otros métodos (Schwarzacher y Heslop-Harrison, 2000). Así como también permite el mapeo de secuencias repetidas (microsatélites, satélites y los retrotransposones) y su distribución a lo largo del componente cromosómico con un gran poder de resolución espacial debido principalmente a la evolución en los métodos de marcaje (Herrera, 2007).

FISH se ha desarrollado y mejorado continuamente, y es ahora la técnica más utilizada para la localización *in situ*, como lo ilustra la gran variedad de aplicaciones que la utilizan en investigación y diagnóstico. FISH, al igual que otros enfoques basados en el ADN, aprovecha la capacidad de los ácidos nucleicos para desnaturalizarse y renaturalizarse. Aquí, la característica más relevante de los ácidos nucleicos es que, en ADN monocatenario, las secuencias homólogas se encuentran y construyen una doble hélice de nuevo. En un experimento FISH regular, la formación de híbridos ADN-ADN está prevista normalmente (Liehr, 2017).

1.5 Organización cromosómica mediante fibra de ADN

La hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) de alta resolución en ADN estirado es un método muy potente para analizar la organización y la intersección de las sondas de ADN a nivel de kilobases, y se lleva a cabo mediante la extracción *in situ* de células que contengan material genético permitiendo la visualización de genes individuales u otros elementos pequeños en los cromosomas, con una resolución de aproximadamente 1000 pb (Ersfeld, 2004).

La técnica de fibra FISH se ha aplicado ampliamente de diversas maneras en la investigación del genoma en animales y plantas, van desde la determinación del número de genes repetitivos hasta el establecimiento del orden físico de fragmentos de ADN clonados a lo largo de secciones continuas de cromosomas individuales. Particularmente en organismos con genomas relativamente pequeños y densos en genes, como los parásitos protozoarios, la fibra-FISH se puede usar fácilmente como una técnica complementaria a los enfoques clásicos de mapeo *in vitro* (Ersfeld, 2004).

Las técnicas para extender el ADN se realizan desde los núcleos individuales como "halos" extendidos (Gerdes *et al.* 1994). Los pares de bases del ADN se apilan con una separación de aproximadamente 0,34 nm en la doble hélice del ADN, por lo que una fibra de doble hélice de

ADN extendida de 1 kb se extiende a 0.34 μm (o 2,9 kb μm^{-1}), cerca del valor experimental de 3.3 kb μm^{-1} obtenido de la difusión mecánica del ADN. Se observan variaciones entre los portaobjetos a causa de la eliminación incorrecta de material extranuclear o de un esparcimiento defectuoso del ADN, lo que da lugar a mediciones inexactas (Sjoberg *et al.* 1997), por lo que no es necesario que los portaobjetos se encuentren en el mismo plano.

JUSTIFICACIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, el género de *Agave* es un cultivo de gran importancia a nivel comercial y por ende ha tenido un fuerte impacto tanto económico como social en diversas regiones de México.

En general las especies de agave tienen un largo ciclo de vida, son monocárpicas y en la mayoría de los casos son semidomesticadas o silvestres. Estas características han dificultado su incorporación como modelo de estudio.

En la actualidad, las investigaciones se han enfocado en determinar la variabilidad morfológica de distintas especies de *Agave* con respecto a distintos mecanismos de propagación, sin embargo, es indispensable entender e identificar a nivel cromosómico, dónde se encuentran localizados los genes específicos responsables de proporcionar la resistencia a patógenos, para utilizarlos como blanco en estrategias de mejoramiento interespecífico o dentro de una misma especie, así como también lograr la identificación de genes candidatos a resistencia y el desarrollo de marcadores moleculares ligados a genes R.

HIPÓTESIS

Con base a la abundancia de los genes *NBS-LRR* en *A. tequilana* se espera que la familia 1 y 2 de estos genes se encuentre en regiones cromosómicas distintas en *A. fourcroydes*.

OBJETIVO GENERAL

Generar un mapa físico de las regiones de los genes *NBS-LRR* presentes en distintas familias en *Agave fourcroydes*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Ubicar las regiones de genes *NBS-LRR* en cromosomas en interfase de *A. fourcroydes*, mediante hibridación fluorescente *in situ*.

- 2) Determinar la región cromosómica donde hibrida cada familia en el contexto del contenido cromosómico completo.
- 3) Evaluar la organización genómica para determinar la existencia de arreglos en tándem de estas familias de genes.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental llevada a cabo se muestra en la figura 1.4. Esta se construyó con base a los objetivos a desarrollar a lo largo de la investigación partiendo por la obtención del material vegetal, utilizando las raíces para la obtención de cromosomas en metafase y las hojas para la obtención de ADN el cual es vital para el procedimiento del marcaje de sondas.

Por otro lado, para la organización genómica *in situ* se realizó un experimento por separado el cual se realizó a partir de extracción de ADN genómico.

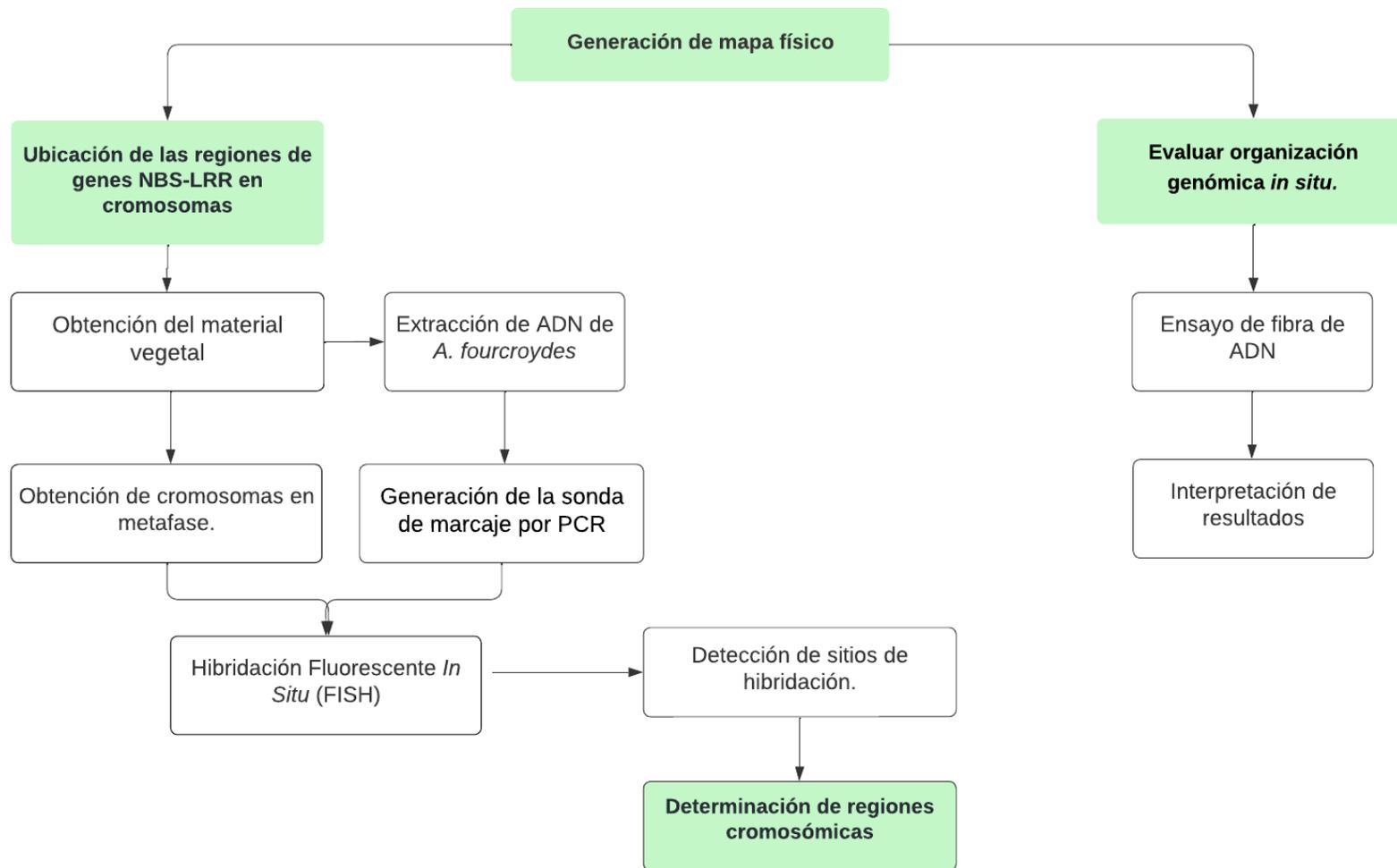


Figura 1. 4 Estrategia experimental

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA FISH

Para la obtención del material vegetal se utilizaron plantas de *A. fourcroydes*, que se tomaron de charolas y que fueron previamente fueron cultivadas en condiciones de invernadero. El muestreo se realizó aproximadamente a los 2 meses de haber sembrado las plantas y fueron conservadas en agua y tierra para favorecer el crecimiento de la raíz.

Una vez que las plantas se tuvieron en frascos con agua y en tierra, las puntas de raíz fueron cosechadas durante las primeras horas del día (6-7 am), ya que acorde a Quija-Lamina *et al.*, (2010) se estableció que la mejor hora para obtener un mayor índice mitótico en meristemas radiculares es durante las primeras horas del día. Las características específicas requeridas para las puntas de raíz fueron: mínimo 1 cm de longitud, las puntas color blanco e íntegras.

Una vez colectadas, se lavaron 2 veces en agua destilada; y se incubaron por 3 h en pretratamiento en una solución saturada de paradiclorobenceno (PDB) a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), con la finalidad de detener el ciclo celular y obtener preparaciones en metafase.

Transcurrido ese tiempo se lavaron las raíces por segunda ocasión para eliminar los residuos del agente antimitótico. Posteriormente estas fueron colocadas en una solución de alcohol absoluto y ácido acético glacial (3:1) para fijar el material y fueron mantenidas en la solución al menos 24 h. Las raíces pueden ser almacenadas en el fijador por varios meses.

Una vez fijadas las raíces se procedió a dar un lavado con agua para eliminar el exceso del fijador. Posteriormente y con la finalidad de degradar la pared celular estas raíces fueron transferidas a tubos eppendorf que contenían 100 μl de viscozima diluida (SIGMA cat. V2010) con 100 μl de buffer de citrato (10 mM ácido cítrico) y se incubaron a 37°C durante 25 min en un baño seco. Transcurrido el tiempo del tratamiento, estas fueron lavadas dos veces en agua destilada y a continuación se procedió a tratarlas individualmente bajo un estereoscopio, como se enuncia a continuación; con ayuda de un gotero se colocó una gota de ácido acético al 0.1 M sobre la raíz, se eliminó la cofia y material excedente tratando de rescatar el ápice radicular. Con ayuda de una micropipeta se procedió a tomar el material libre de tejido y se procedió a colocarlo en un nuevo portaobjetos. A continuación, se procede a cubrir la muestra con un cubreobjetos y posteriormente se llevó a cabo el “squash” o aplastamiento de la muestra para facilitar que esta se disgregara a lo largo de la preparación. Posteriormente las preparaciones

fueron observadas en un microscopio de contraste de fases para realizar el análisis. Una vez analizadas las preparaciones, estas pueden ser conservadas en congelación a -20°C.

2.2 MARCAJE DE LA SONDA POR PCR

Para el marcaje de la sonda, primeramente, fue necesario realizar la extracción de ADN de *A. fourcroydes* para lo cual se utilizó el protocolo propuesto por Echevarria *et al.*, (2005).

Una vez que se tuvo el ADN íntegro y puro, éste se utilizó para llevar a cabo una reacción de PCR convencional en un termociclador (2720 Thermal Cycler; Applied Biosystems) con un volumen final de 50 µl que consistió de 100 ng de ADN de *A. fourcroydes*, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.1 mM de Digoxigenina -11-dUTP (ROCHE cat. 11093088910)/ Biotina , 2.5 U de Taq ADN polimerasa (BIOLINE)/ Fluorescein-12-dUTP(ROCHE), 1x PCR buffer y 1 mM de cada juego de cebadores: 5S(FW5'CGATCATACCAGCACTAAAGCACC-3' RV 5'-TGCAACACGAGGACTTCCCAG-3') 18S (FW 5'CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' RV 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3') Familia 1 (NBS1_IA_Fw TGT TAT TCA AAC AGC GGG CA, NBS1_IA_Rv GCT AAC CAC TCT GCT TCT GT), Familia 2: (NBS2_A_FW AGT GAA GGA ATT GGC TTA CGC, NBS2_A_RV TGT ATG TTG GCG GCA ATA CG) (Campos-Rivero *et al* 2020). Universales: NBS_U_Fw TGG TTA CAC CGT TGA GGA CT, NBS_U_Rv CTG GTC TTC CCC AGT CCA C ((Tamayo-Ordoñez *et al.*, 2016)].

Las condiciones de PCR iniciaron con una temperatura de desnaturalización a 94°C por 3 min seguido de 30 ciclos de una desnaturalización a 94°C por 30 seg., un alineamiento a 63°C por 30 seg, y una extensión final a 72°C por 30 seg. Posteriormente una extensión final a 72°C por 10 min.

El marcaje de sonda se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Para fines de estandarización se realizó primeramente con los genes ribosomales 5S y 18S y posteriormente con las familias de los genes *NBS-LRR* (Figura 3.3) Ambas electroforesis se desarrollaron durante 90 min a 85 volts, se aplicaron 12 µl del producto de PCR mezclado con 3 µl de buffer de carga para cada pozo.

2.3 PRETRATAMIENTO Y PREPARACIÓN DE CROMOSOMAS

La hibridación *in situ* se realizó al adicionar a las preparaciones, 85 µl de RNasa A (100 µg/ml) (INVITROGEN) al área marcada de cada preparación, posteriormente se cubre con parafilm y se incuba durante 1 h a 37°C en una placa. Se removieron cuidadosamente las coberturas de parafilm lavando las preparaciones dos veces en 2XSSC (Dodecilsulfato sódico (SIGMA) por 5 min. A continuación, las preparaciones se incubaron en 10 mM de HCl por 5 min. Después se

adicionaron 85 µl de pepsina (10 µg/ml) (SIGMA) y fueron cubiertas con parafilm. Las preparaciones se incubaron durante 10 min a 37°C. Transcurrido el tiempo del tratamiento las preparaciones fueron lavadas dos veces en el buffer 2XSSC durante 5 min. Posteriormente las preparaciones se colocaron en un frasco coplin con una solución de fijación 3:1 etanol: ácido acético durante 10 min. Transcurrido el tiempo se lavaron dos veces en 2X SSC por 5 min y se deshidrataron en una serie de lavados con etanol (70%, 90% y 100%) por 5 min cada uno. A continuación, se dejaron secar durante varias h.

2.4 DESNATURALIZACIÓN E HIBRIDACIÓN DE LA SONDA MARCADA

Tras secar las preparaciones se procede a la desnaturalización de la sonda marcada, para lo cual las preparaciones se colocaron en una caja coplin conteniendo formamida al 70% previamente calentado en un baño maría a 75°C durante 15 min. Inmediatamente las muestras fueron deshidratadas durante 2 min en una serie de etanol comenzando con 70, 90% y 100% respectivamente. En seguida las preparaciones se pusieron a secar. Una vez deshidratadas y secas se procedió a la hibridación de la sonda. Para cada preparación se aplicó 40 µl de la mezcla de hibridación compuesta de 15 µl de formamida al 100%, 3 µl de 20XSSC, 6 µl de sulfato de dextrano al 50%, 0.5 µl de SDS y 1 µl de sonda, previamente desnaturalizada a 75°C y mantenida en hielo hasta su aplicación. Enseguida se cubrió el área con parafilm y se incubaron durante toda la noche en el baño húmedo a 40°C.

2.4.1 Detección de la sonda

Se retiraron las preparaciones del baño húmedo y a continuación fueron lavadas dos veces en 2XSSC por 5 min. Inmediatamente fueron colocadas por 5 min (una preparación a la vez), en un frasco coplin conteniendo formamida al 20% previamente incubado en un baño húmedo a 42°C. Después las preparaciones se lavaron dos veces por 5 min en 2XSSC colocado en un baño húmedo a 42°C. Enseguida las preparaciones fueron lavadas dos veces por 5 min en 4XSSC conteniendo Tween 20 al 0.2%. Transcurrido el tiempo de lavados astringentes las preparaciones se dejaron secar y se aplicaron 60 µl de BSA al 5%. Posteriormente se cubrieron con parafilm y se dejaron incubar 20 min a 37°C. Las sondas marcadas con biotina se detectaron con estreptavidina Cy3 (INVITROGEN).

Para el paso de detección se retiraron los parafilms cuidadosamente y se aplicaron 50 µl del reactivo de detección correspondiente para cada sonda, después se incubaron durante 1 h a 37°C. Transcurrido el tiempo de detección, las preparaciones fueron lavadas dos veces en

4xSSC conteniendo tween 20 al 0.2%. A continuación, se escurrieron las preparaciones y se aplicó 40 µl del medio de montaje vectashield (Vector Laboratories) que contenía 2,5 g L⁻¹ de DAPI (40,6-diamidino-2-fenilindol; Serva), se colocó un cubreobjetos de cristal que cubriera la mayor parte posible del portaobjetos y fueron mantenidas en oscuridad por 10 min. Se eliminó el exceso del medio de montaje con papel absorbente y las preparaciones fueron analizadas en un microscopio de epifluorescencia (ZEISS Axioscope) y las imágenes digitales obtenidas se procesaron a Adobe Photoshop versión 23.3.2

Posterior al análisis de las preparaciones, éstas fueron almacenadas a 4°C protegiéndolas de la luz.

2.5 EXTENSIÓN DE FIBRAS DE ADN

Para este procedimiento se realiza un estiramiento mecánico partiendo de una solución de ADN aislado.

Se coloca la solución de ADN aislado en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se calienta a 37°C. Se añade un volumen igual de agarosa de bajo punto de fusión a unos 50°C (concentración final 1,5-2%). Se pipetea en pequeños moldes con unos 100 núcleos por bloque y se deja solidificar. Posteriormente se remueven las proteínas incubando los bloques en solución de proteinasa durante 20 min a 50°C con agitación suave. Se procede a lavar los bloques cuatro veces en fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a 50°C durante 1 h cada uno y se almacenan en buffer TE a 4°C. Posteriormente se lava el bloque en agua y se coloca en una pequeña gota de agua hacia el final de un portaobjetos. Se coloca el portaobjetos en el microondas y se calienta hasta que la agarosa esté completamente disuelta pero apenas se tenga fundido se sumerge rápidamente el lado corto de un cubreobjetos de 22 x 40 mm en la gota fundida y se cubre con esta una vez a lo largo de la superficie del portaobjetos, extendiendo la agarosa de manera uniforme y rápido. Se procede a sumergir los portaobjetos en el fijador en una jarra de tinción durante 2 min y se deja secar a temperatura ambiente. Se incuban los portaobjetos durante 30 min a 60°C y se debe examinar una muestra mediante tinción DAPI. Una vez finalizado los portaobjetos pueden guardarse en una caja seca a 4 o -20°C.

CAPÍTULO III**RESULTADOS**

A continuación, se presentan los resultados correspondientes a las diferentes etapas del protocolo previamente descrito.

3.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las puntas de raíz fueron incubadas con las soluciones previamente descritas (sección de materiales y métodos) y fueron tratadas bajo un estereoscopio (VELAB VE-S1) recuperando el mayor número de células posibles para después fijar las muestras en portaobjetos que posteriormente fueron analizadas bajo el microscopio de contraste de fases (Nikon ECLIPSE E100) con los diferentes enfoques (Figura 3.1).

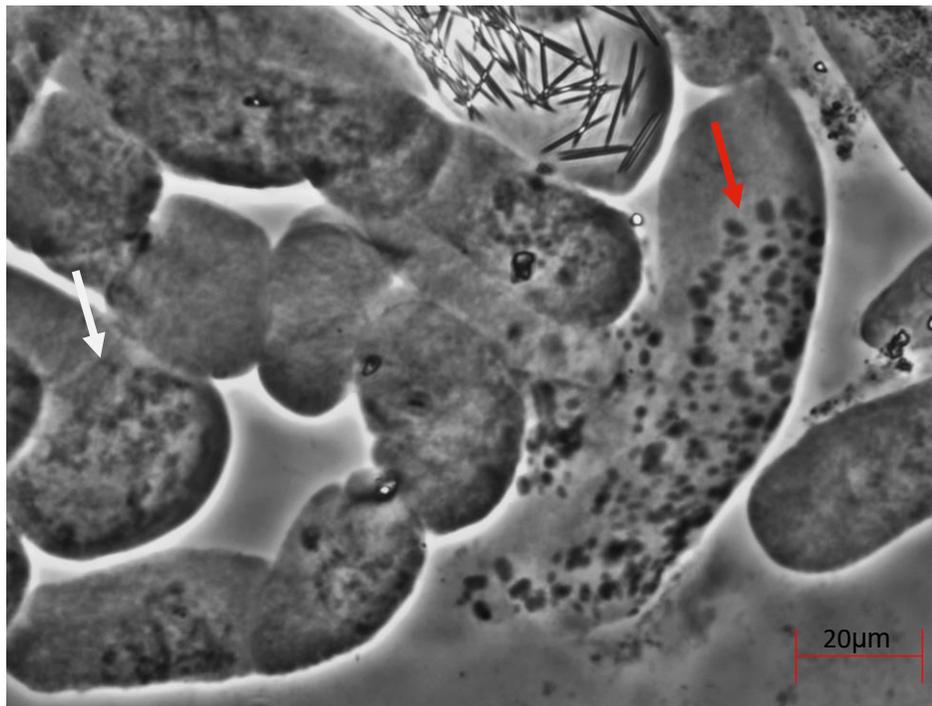


Figura 3.1 Células de raíz de *A. fourcroydes*. La flecha blanca señala una célula e interfase y la flecha roja señala una célula con cromosomas en metafase en una escala de 20 µm.

Se observaron distintas células obtenidas a partir de la raíz de *A. fourcroydes* donde algunas se mostraban en interfase y otras en metafase. Lo ideal para la elaboración de mapas físicos es partir de metafases, sin embargo desde la introducción de FISH, los citogenetistas han podido analizar los cromosomas en interfase, así como los cromosomas en metafase utilizados en los cariotipos (Trask, 2002); sin embargo, la cromatina en interfase es unas 10.000 veces menos compactada que la cromatina mitótica, esto es importante considerarlo ya que la distancia que

podemos percibir desde el punto de vista óptico es relativa en comparación con la distancia real de los cromosomas que puede ser de miles de pares de bases entre ellos.

En el presente estudio es posible poder comparar los sitios de hibridación aunque las células se encuentren en interfase, como se observó con los genes ribosomales.

3.2 MARCAJE DE SONDA

3.2.1 Amplificación de genes *NBS-LRR* en *Agave fourcroydes*

Se amplificaron las familias de genes *NBS-LRR* para corroborar su integridad con ADN de *A. fourcroydes*. (Figura 3.3).

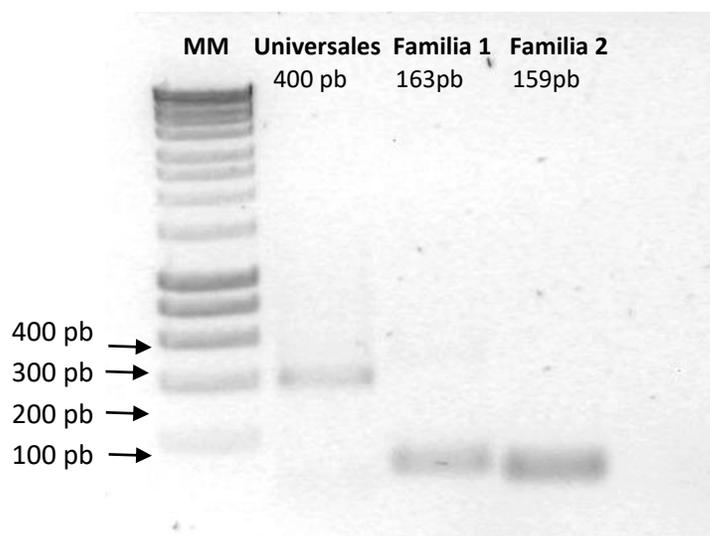


Figura 3.2 Amplificación de genes *NBS-LRR* a partir de ADN de *Agave fourcroydes*. Visualización en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Electroforesis realizada por 1 h a 77 volts. MM: Marcador molecular de 1 kb.

Los productos de amplificación obtenidos para los primers específicos de cada familia correspondieron al tamaño esperado los cuales son 400 pb para los universales, 163 pb para la familia 1 y 159 pb para la familia 2.

3.2.2 Marcaje de sonda con genes *NBS-LRR*

Para el proceso de estandarización del marcaje de sonda se realizó una PCR convencional, donde se utilizaron las secuencias ya conocidas de primers ribosomales 5S, como control positivo, esto, debido a que los genes de los ADNr son altamente conservados, presentan un alto número de copias de unidades de repetición y posiciones específicas en los cromosomas

en especies eucariotas como son *Triticum spp.* (Jiang y Gill, 2006), *Anoplotrupes stercorosus* (Colomba *et al.*, 2004) y Agaves (Robert *et al.*, 2008).

El marcaje se llevó acabo como se describe en la seccion 2.2 de materiales y metodos. Los controles positivos utilizados son los que no presentan el fluróforo añadido y por ende se puede apreciar el retardamiento en gel en cuanto a las bandas. Este mismo procedimiento se llevó acabo con cada familia de genes *NBS-LRR* (Figura 3.3).

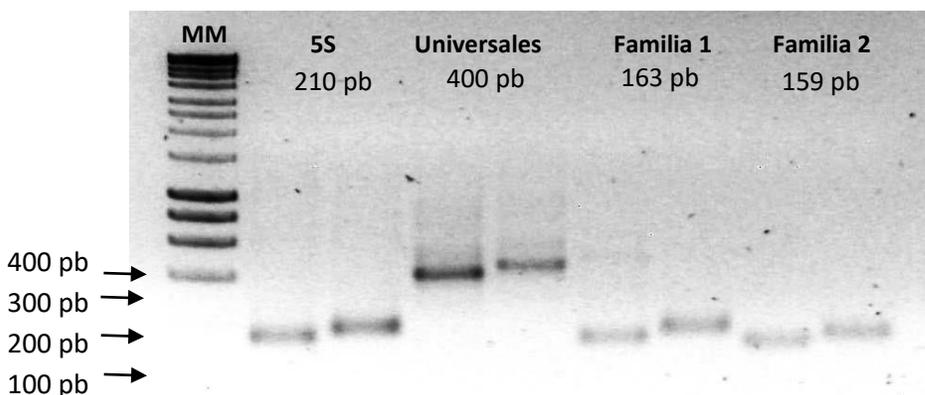


Figura 3.3 Marcaje indirecto de los genes *NBS-LRR* con ADN de *A. fourcroydes*. Se incluyó como control positivo el gen ribosomal 5S que ya había sido marcado anteriormente. Carriles 4 y 5: Genes Universales, Carriles 6 y 7: Familia 1, Carriles 8 y 9: Familia 2 a partir de ADN de *A. fourcroydes*. Visualización en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. MM: Marcador molecular de 1 kb.

Como se muestra en la figura 3.3 las sondas se pudieron marcar de manera adecuado para posteriormente utilizarlas en el procedimiento de hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

3.4 DETECCIÓN DE SITIOS DE HIBRIDACIÓN

Las preparaciones se observaron por microscopía de epifluorescencia, se identificaron diferentes campos a diferentes longitudes de onda como se indica en el cuadro 3.1

Cuadro 3.1. Sondas marcadas

Gen marcado	Marcador fluorescente	Onda de excitación	Onda de emisión
5S, NBS-LRR-U, NBS-LRR-1, NBS-LRR-2	DAPI	355 nm	450 nm
NBS-LRR-U, NBS-LRR-1	FITC	495 nm	515 nm
NBS-LRR-1, NBS-LRR-2	Cy3	552 nm	568 nm

Las sondas marcadas con fluoresceína y biotina se detectaron simultáneamente, para biotina se utilizó el conjugado de estreptavidina-Cy3 y para fluoresceína no fue necesario ya que es un marcaje directo y no requiere el paso de detección.

En la figura 3.4 se observa la hibridación fluorescente *in situ* con genes ribosomales como parte de la estandarización. La hibridación se llevó a cabo utilizando la sonda marcada con fluoresceína para 5S y la marcada con biotina para 18S. En el panel a) se logra apreciar las células en interfase, en el panel b) se observan 5 puntos de hibridación dentro de cada célula, en el panel c) se observan otros 5 puntos de hibridación en diferentes sitios en contraste con el marcaje de fluoresceína. Para el último panel (d) se observa la figura acoplada con filtro DAPI, FITC y RHOD ubicándose los sitios de hibridación en diferentes regiones del material genético en una escala de 10 μm .

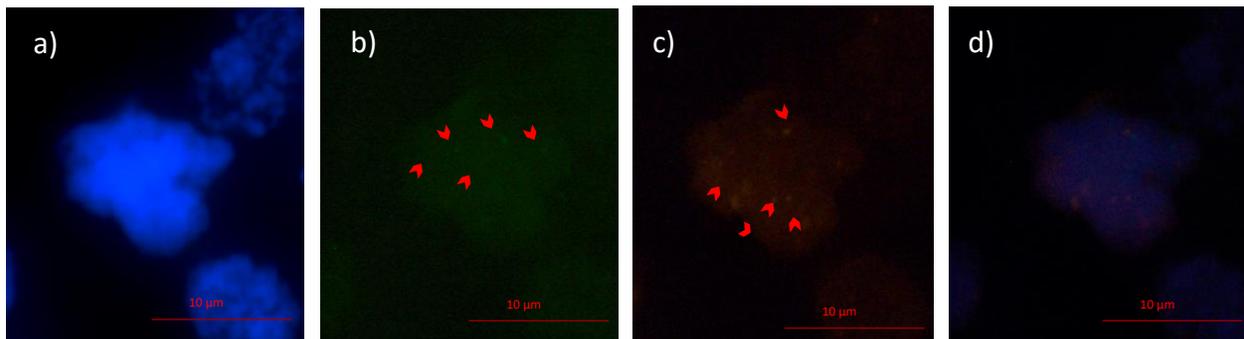


Figura 3.4. Hibridación de cromosomas de *A. fourcroydes* con genes ribosomales 5S y 18S marcado con fluoresceína para 5S y Biotina para 18S, detectado con Cy3-Streptavidin. a) DAPI b) FITC c) RHOD d) Acoplado. La barra en cada imagen representa una escala de 10 μm .

Tal y como se ha reportado en estudios previos, (Robert *et al.*, 2008), los genes ribosomales están relacionados con el nivel de ploidía de cada especie de *Agave*, en este caso al tratar con una especie pentaploide, se observó el patrón de hibridación esperado con 5 sitios dentro de cada célula por cada gen ribosomal. Así también se sabe que estos genes han sido mapeados previamente en diferentes especies de *Agave* en células en metafase, sin embargo la cromatina en los núcleos en interfase está mucho menos condensada que los cromosomas en metafase, lo que hace que el poder de resolución de la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) sea dos órdenes de magnitud mayor en los núcleos en interfase que en los cromosomas en metafase (Jiang *et al.*, 1996) y es posible observar los sitios de hibridación esperados en esta fase del ciclo celular.

Para la hibridación de los genes *NBS-LRR* primeramente se evaluó la distribución de los genes universales marcados con fluoresceína (en verde), en contraste con cada familia marcada con biotina por separado. En la figura 3.5 se observa la distribución de los genes universales y la

familia 1, que de igual forma en el panel a) se aprecia una célula de *A. fourcroydes* en interfase, en el panel b) se observa la hibridación de los genes universales distribuidos por toda la célula, la hibridación presenta un patrón característico donde se ven agrupamientos de 3 a 5 sitios de hibridación alrededor de las regiones nucleolares que se distinguen como espacios oscuros, contando un total de 23 sitios de hibridación para la célula mostrada. Por otro lado, en el caso de la familia 1 identificada en el panel c) se observa una distribución similar que va en agrupamientos de 4 a 5 con un total de 14 sitios de hibridación. Estos sitios tienden a agruparse más al centro del núcleo y su porcentaje de hibridación es un 40% menor en contraste con los genes universales, sin embargo al observar el acoplamiento de ambos filtros (d) es posible identificar que la familia 1, en contraste con los genes universales, se encuentran en diferentes sitios y los sitios de hibridación son menos intensos y más pequeños.

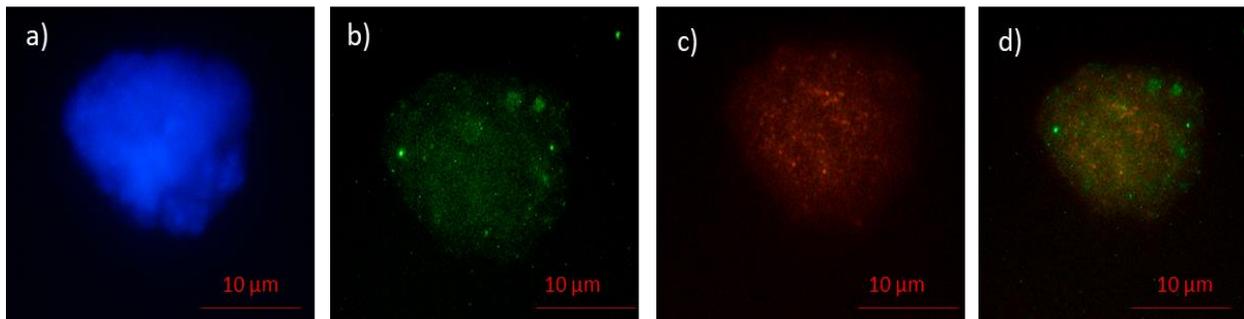


Figura 3.5. Análisis de FISH mostrando la distribución de genes universales (en verde) y familia 1 (en rojo) de cromosomas en interfase de *A. fourcroydes*. Marcaje con Biotina y Fluoresceína. Detección con a) DAPI b) FITC c) RHOD d) Acoplada. La barra en cada imagen representa una escala de 10 µm.

Es notorio observar que tanto los genes universales como la familia 1 presentan un patrón de hibridación específico al analizarlos en conjunto, siendo la hibridación de los universales más predominante.

Posteriormente se realizó el análisis de FISH de genes universales nuevamente con fluoresceína (en verde) y la familia 2 con biotina (en rojo), en la figura 3.6 panel a) se observa la distribución de cromosomas en interfase de *A. fourcroydes*. Para el caso de los genes universales en el panel b) se observa una distribución uniforme de los sitios de hibridación por toda la célula con agrupamientos que van de 7 a 10 sitios de hibridación que presentan el mismo patrón que con la familia 1, ubicándose alrededor de las regiones nucleolares con un total de 82 sitios. Para el caso de la familia 2, panel c) se observan de igual forma, los sitios de hibridación distribuidos por toda la célula con agrupamientos de entre 6 y 8 sitios con un total de 76 sitios que representan un 92 % en comparación con los genes universales para el caso de la célula analizada. Por último, en el panel d) correspondiente al acoplamiento de FITC con

RHOD se puede apreciar que los sitios de hibridación de la familia de genes universales (en verde) representan un aumento en cuanto a la intensidad y el número de sitios de hibridación en contraste con la familia 2. A pesar de que los puntos de hibridación se encuentran cercanos, no se observan cohibridaciones entre ellos.

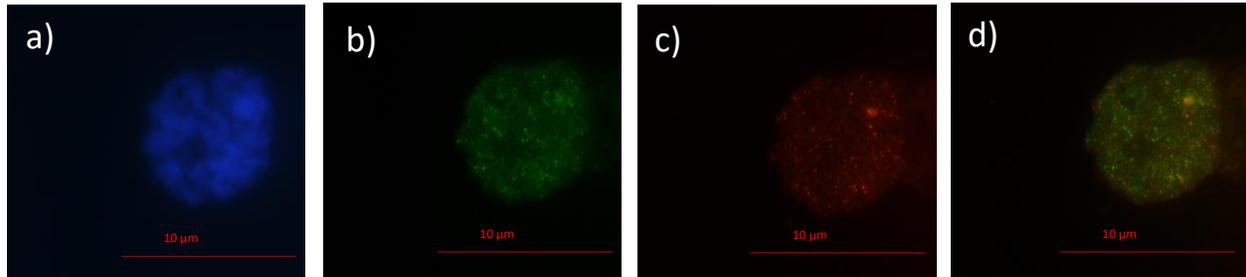


Figura 3.6. Análisis de FISH mostrando la distribución de genes universales (en verde) y familia 2 (en rojo) de cromosomas en interfase de *A. fourcroydes*. Marcaje con Biotina y Fluoresceína. Detección con a) DAPI b) FITC c) RHOD d) Acoplada. La barra en cada imagen representa una escala de 10 µm.

Al realizar el análisis de los genes universales con la familia 2 se observan los mismos resultados que para la familia 1, en donde predominan los genes universales en cuanto a su intensidad de señales y número de sitios de hibridación, localizándose en diferentes sitios.

Por último, se evaluó la distribución de la familia 1 y 2 de los genes *NBS-LRR* mostrada en la figura 3.7. En el panel a) se observa una célula en interfase, mostrando el material genético disperso, típico de una célula en interfase, en el panel b) se observa la hibridación de la familia 1 (en verde) mostrando agrupamientos que van de 5 a 8 sitios de hibridación con un total de 65 sitios. Para el caso de la familia 2 observada con en el panel c) se muestran agrupamientos de 6 a 8 sitios de hibridación con aproximadamente 46 sitios. En el último panel d) correspondiente al acoplamiento de la familia 1 y 2 se observa que el 92% de los sitios de hibridación totales de ambas familias están en diferentes regiones, presentando únicamente un 8% de sitios que al mostrar una tonalidad diferente (amarillo) nos indica una cohibridación.

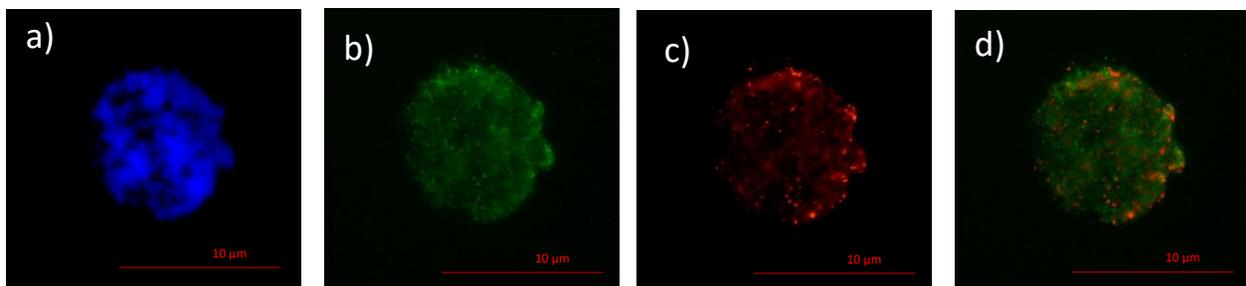


Figura 3.7. Análisis de FISH mostrando la distribución de familias. Familia 1: marcados con fluoresceína (en verde) y familia 2 marcado con biotina (en rojo) de cromosomas en interfase de *A. fourcroydes*. Detección con a) DAPI b) FITC c) RHOD d) Acoplada. La barra en cada imagen representa una escala de 10 µm.

Al comparar los sitios de hibridación de los genes universales con la familia 1 y 2 en distintas células en interfase se observa que los sitios para los genes universales son más grandes e intensos y el patrón que marca para todas las células analizadas es que se ubican siempre cerca de las regiones nucleolares y dispersos por toda la célula, también estos sitios siempre se encuentran presentes en un porcentaje mayor con respecto a cada familia y en grupos de entre 5 y 7 sitios conjuntos. Para el caso de la familia 1 y 2 al analizar distintas células en interfase los sitios para la familia 1 siempre son más abundantes con respecto a la familia 2, la cual representa en promedio el 55% del total de sitios de hibridación de ambas familias. En el conteo de sitios de hibridación, (Cuadro 3.1) estos fueron discriminados de acuerdo con su nivel de intensidad, por lo que se puede decir que el 40.2% de sitios de hibridación para la familia 1 se ubican en el rango considerado como el más intenso y el 60% restante se encuentra distribuido en rangos de menor intensidad. Para el caso de la familia 2 el porcentaje de sitios de hibridación que más predomina corresponde al rango de intensidad menor representada por un 33.7%, el 65.2% restante se encuentra distribuido en distintos rangos que presentan una intensidad mayor.

Cuadro 3.2. Análisis de intensidad de fluorescencia de los sitios de hibridación.

	<i>Filtro</i>	<i>Rango</i>	<i>Familia 1</i>	<i>% Familia 1</i>	<i>Familia 2</i>	<i>% Familia 2</i>	<i>Familia 1 y 2</i>	<i>%Familia 1 y 2</i>	<i>Cohibridaciones</i>
<i>Sitios de hibridación</i>			87		77		73		8
<i>Agrupamientos</i>			5 a 8		6 a 8		10 a 16		
	FITC	66-100	12	13.7					8
		101-135	14	16.0					
		136-170	26	29.8					
		171-205	35	40.2					
	RHOD	95-130			10	12.9	10	13.6	
		131-165			26	33.7	11	15.0	
		166-200			9	11.6	21	28.7	
		201-235			12	15.5	18	24.6	3
		236-271			20	25.9	12	16.4	5
<i>Total</i>			87	99.9	77	99.9	72	98.5	

Es importante mencionar que la variación de sitios para las distintas células se debe a que la estructura del ADN es una molécula tridimensional por ende aunque ambas células se encuentren en interfase el material genético se encontrará en distintos planos unidimensionales que representan las imágenes capturadas.

3.5 FIBRA DE ADN

Se realizó la extensión de fibra de ADN a fin de conocer la organización genómica de las familias de genes a nivel de kilobasas. Las sondas utilizadas para este experimento fueron la familia 1 marcada con fluoresceína y la familia 2 con biotina. En la figura 3.8 panel a) se observa el material genético distribuido en un mismo sentido, esto debido a la técnica de desplazamiento utilizada, logrando apreciar una cadena extendida de ácidos nucleicos. Por otro lado, en el panel b) donde se muestra la distribución de la familia 1, se observan señales de hibridación continuas, las cuales se observan con una mayor intensidad en los sitios específicos que están señalados, mientras que en el resto de los sitios donde también hay material genético la hibridación es más tenue. Para el caso de la familia 2 panel c) de igual forma se observan sitios continuos y el mismo patrón de intensidad que para la familia 1 en los mismos sitios, sin embargo también es posible resaltar que también se observa otro patrón que difiere de la familia 1 donde se muestran señales de hibridación en donde se aprecia una mayor intensidad y cantidad de sitios en comparación que no se observan en la familia 2.

Al analizar la imagen acoplada correspondiente al panel d) los sitios de ambas familias se observan con un cambio de coloración amarilla lo cual indica una colocalización entre ambas familias para los mismos sitios.

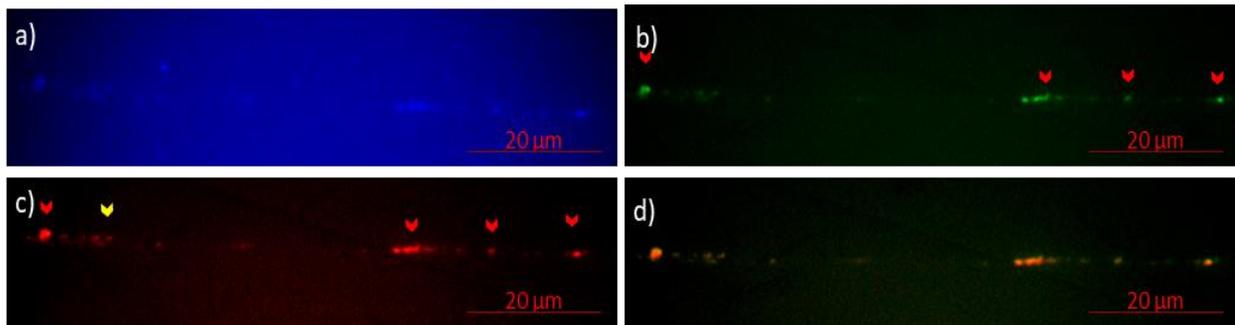


Figura 3.8 Fibra de ADN de *A. fourcroydes*. Las flechas rojas en el inciso b) y c) corresponden a la colocalización de la familia 1 y 2. La flecha amarilla corresponde a la organización diferencial de la familia 2. La barra en cada imagen representa una escala de 20 µm.

La figura 3.8 nos brinda la información necesaria para evaluar la organización genómica de cada familia. El patrón de fluorescencia mostrado se observó consistentemente en ambas familias. Gracias a la utilización de los dos fluoróforos se mostró que cada familia se encuentra ordenada de forma lineal en arreglos en tandem, es decir los sitios son repeticiones consecutivas separadas en ciertas regiones donde no hay material genético. Al observar la figura acoplada la colocalización de los sitios de hibridación para la familia 1 y 2 corresponde a

un 90% del total, donde solo un 10% se encuentra en diferentes sitios, lo cual coincide con los resultados obtenidos a lo largo de la investigación.

En resumen, a partir de los experimentos de hibridación fluorescente *in situ* en células en interfase y fibra de ADN de genes universales, de la familia 1 y de la familia 2 podemos decir que:

- Los genes universales siempre se presentan en mayor número e intensidad de hibridación.
- Los genes de la familia 1 y familia 2 hibridan en sitios diferentes en contraste con el patrón de hibridación de los genes universales.
- Solamente el 8% aproximadamente de los sitios de hibridación de familia 1 y 2 cohibridan en células en interfase, mientras que aproximadamente el 92% se encuentran en sitios diferentes del genoma.

Hasta nuestro conocimiento esta investigación es el primer reporte de mapeo físico en *Agaves*, en el orden asparagales y en monocotiledóneas. Es importante mencionar que de 1300 referencias identificadas con el término mapeo de NBS-LRR y agregando la búsqueda FISH, solamente se encontró un artículo en la especie de *Glycine max* (Kang *et al.*, 2012).

CAPITULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

El género *Agave* tiene importancia económica en México debido a que es empleado para la obtención de distintos productos de importancia económica tales como bebidas alcohólicas, biocombustibles, frútanos y fibras naturales (Nava-Cruz *et al.*, 2015). Dentro de éste género se encuentra el henequén ó *A. fourcroydes* el cual se caracteriza por tener fibras naturales de mayor calidad e importancia mundial, además de ser altamente productivo en áreas ecológicas limitantes. En Yucatán, ha mantenido gran relevancia económica y cultural (Colunga-García, 1999).

Esta especie es susceptible ante patógenos que posteriormente desencadenan enfermedades. La familia de genes de repetición rica en leucina (LRR) del sitio de unión de nucleótidos (NBS) representa la mayor cantidad de genes conocidos de resistencia a enfermedades y es una de las familias de genes más grandes en los genomas de plantas. A menudo, aparecen en grupos en loci específicos después de los eventos de duplicación y amplificación de genes (Marone *et al.*, 2013).

En esta tesis, empleando hibridación fluorescente *in situ* se determinó la localización física de genes universales, familia 1 y familia 2 de NBS-LRR en células en interfase de *A. fourcroydes*. Bajo la misma técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) anteriormente se ha determinado el número y la distribución de los sitios de ADNr 18S-25S y 5S en los cromosomas mitóticos de 6 accesiones diploides ($2n=22$) pertenecientes a dos especies: *Musa acuminata* y *M. balbisiana*. La técnica de FISH dió como resultado señales en un par de cromosomas, la posición de las señales correspondía a la constricción secundaria al final de un brazo corto. La intensidad del marcaje fue diferente entre los homólogos y el sitio más grande correspondió a una constricción secundaria más grande, concluyendo que los cromosomas satélite que portaban los loci 18S-25S no portaban los loci 5S (Doleželová, M., *et al* 1998).

Estudios recientes en plantas de *Agave* han demostrado que el número de copias ribosomales aumenta con el nivel de ploidía (Robert *et al.*, 2008), y que este aumento también podría generar copias ribosomales redundantes y no redundantes que muestran diferentes perfiles de expresión (Tamayo-Ordoñez *et al.*, 2015).

En el mapeo físico de ADNr 18S y 5S con el fin de corroborar el número de copias por genoma de *A. tequilana* mediante FISH, se mostró una relación lineal ($R^2 = 0.992$) y se evidenció que las estimaciones de qPCR de los diferentes ADNr eran muy coherentes con los datos de FISH (Rubio *et al.*, 2016). Este enfoque se ha utilizado en la identificación y caracterización de

variaciones en el número de copias de ADNr en el genoma de plantas y microalgas (Żmieńko *et al.*, 2014), y establece una buena relación entre las copias de ADNr y la visualización directa del número de copias de ADN a nivel de células individuales (Rubio *et al.*, 2016).

Las variantes del número de copias (CNV) son reordenamientos genómicos resultantes de ganancias o pérdidas de segmentos de ADN. Los análisis genómicos iniciales indican que las CNV prevalecen en las plantas y han afectado en gran medida la evolución del genoma de las plantas (Żmieńko *et al.*, 2014).

Las CNV generalmente se encuentran en todos los cromosomas, con puntos críticos de CNV intercalados con regiones de variación genética muy baja. Aunque la CNV se asocia principalmente con regiones intergénicas, muchas CNV abarcan genes que codifican proteínas (Żmieńko *et al.*, 2014).

Los datos recopilados sugieren que las CNV afectan principalmente a los miembros de grandes familias de genes funcionalmente redundantes como los NBS-LRR. Sin embargo, hay muchos casos en los que las CNV de genes específicos se han relacionado con rasgos importantes como el tiempo de floración, la altura de la planta y la resistencia al estrés biótico y abiótico. Informes recientes sugieren que las CNV pueden formarse rápidamente en respuesta al estrés (Żmieńko *et al.*, 2014).

A partir de los resultados obtenidos al ubicar las familias 1 y 2 en contraste con los genes universales, se observó un claro patrón de hibridación, en donde los genes universales siempre se presentaron en un mayor número e intensidad de hibridación, con respecto a ambas familias, esto indicaría que se encuentran distribuidos por todo el material genético de *A. fourcroydes* y que en base a los análisis de Tamayo-Ordóñez *et al.* 2016 su alta expresión en cuanto al número de copias se ve reflejada con la intensidad de las señales observadas (Figura 3.5 y 3.6).

Por otro lado, en el análisis de FISH de las familias 1 y 2 (Figura 3.7) del presente trabajo, la distribución es homogénea por toda la célula en interfase; sin embargo, se observan patrones característicos para cada familia. Los sitios para la familia 1 siempre son más abundantes con respecto a la familia 2 y estos en su mayoría se encuentran en sitios cercanos, observando un pequeño porcentaje de cohibridación equivalente a un 8%, lo cual es lo esperado de acuerdo a la relación que existe entre las diferencias en la intensidad de la señal que se correlacionan con la variación en el número de copias del gen evaluado (Leitch y Heslop, 1992) o la homología entre la sonda y secuencias diana.

A. fourcroydes es una especie pentaploide, lo cual implica que si el nivel de ploidía se encuentra directamente relacionado con la cantidad de sitios de hibridación, en efecto se

observa una mayor cantidad de sitios de hibridación en comparación con una especie diploide, como lo es *A. tequilana*. Es importante mencionar que experimentalmente, FISH también se realizó en la especie de *A. tequilana* con el fin de demostrar su reproducibilidad y en efecto se comprobó que la cantidad de sitios de hibridación de ambas familias era mayor en el caso de *A. fourcroydes*.

Hasta nuestro conocimiento este es el primer reporte en *Agave* de la localización física de regiones NBS-LRR.

Por otro lado, Grube *et al.*, (2000) demostraron que los loci del gen R en los géneros de cultivos de solanáceas tales como *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum* y *Capsicum annuum* están presentes en las posiciones correspondientes y que los homólogos de genes R previamente identificados derivados de *Solanum lycopersicum* y *Nicotiana tabacum* podrían identificarse en posiciones similares en especies como *Capsicum annuum*. La ubicación de los loci del gen R entre diferentes genotipos de *Solanum tuberosum* o incluso otras especies de solanáceas se ilustra por el hecho de que se han encontrado secuencias NBS-LRR homólogas a genes R identificados previamente en las especies ya mencionadas en ubicaciones genómicas correspondientes. Sin embargo, también se sabe que los loci de genes de resistencia son regiones muy dinámicas (Ballvora *et al.* 2007; Kuang *et al.* 2005).

Se sabe que el número de genes *NBS-LRR* presente en el genoma, varía dependiendo de la especie, por ejemplo, para *Medicago truncatula* se estiman entre 400 y 500 genes (Ameline-Torregrosa *et al.*, 2018; Sing y Nan, 2014) mientras que para *A. thaliana* se han aislado un total de 207 genes distintos que codifican dominios TIR, CC y *NBS-LRR* similares a la proteína R (Meyers *et al.*, 1999).

Jia y colaboradores (2015) encontraron también esta gran variación en el número de secuencias NBS-LRR comparando entre cinco especies de cucurbitáceas y cinco rosáceas, ya que las cucurbitáceas tenían entre 45 y 80 genes *NBS-LRR* codificantes y las rosáceas entre 346 y 1303 (Sekhwal *et al.*, 2015).

En un estudio realizado en la especie *Lens Culinaris* por (Tartilán-Menéndez, 2015) se observó que los motivos se encuentran más conservados entre genes de especies vegetales evolutivamente más distantes que entre especies del mismo género, ya que las secuencias consenso obtenidas a partir de la especie *Lens culinaris* muestra muchas variaciones nucleotídicas en comparación con las de otras especies.

En otro estudio realizado por Moncada *et al.*, (2022) se identificaron genes que codifican para proteínas NBS-LRR en el genoma de *C. arabica* utilizando un enfoque bioinformático. Se

identificaron motivos conservados de genes R de *C. arabica* relacionados con genes similares encontrados en *Coffea canephora* y *Coffea eugenoides*, dos especies evolutivas relacionadas con *C. arabica*. Los resultados de estos análisis revelaron proteínas con origen evolutivo provenientes de dicotiledóneo ancestrales, así como proteínas de resistencia específicas del género *Coffea*. Además, todas las secuencias de los genes R de *C. arabica* mostraron una gran similitud con proteína CNL de *A. thaliana*. Finalmente, la presencia de motivos altamente conservados, la distribución cromosómica y las relaciones filogenéticas de los genes R de *C. arabica* mostraron procesos de coevolución con patógenos adaptados.

En una especie de planta acuática: *Nymphaoides indica*, se identificaron 160 genes *NBS-LRR* en el genoma, los cuales se distribuyeron de manera desigual en nueve cromosomas con un tamaño total de ~ 520 Mb. Estudios previos han revelado que una cantidad sustancial de genes *NBS-LRR* están agrupados en cromosomas y están asociados con la duplicación en tándem. En *N. indica*, se identificaron 26 grupos de genes que contienen 131 genes *NBS-LRR*. Los patrones de expresión de los genes *NBS-LRR* en los cuatro tejidos fueron significativamente diferentes en *N. indica*. Las hojas tenían 44 genes *NBS-LRR* que mostraban niveles de expresión más altos que otros tejidos, lo que puede explicar por qué las hojas entran en contacto con el agua para resistir a los patógenos. Se ha informado que muchos genomas de plantas acuáticas, como *S. polyrhiza*, *Z. marina* y *Utricularia gibba*, han perdido de forma convergente la mayoría de sus motivos LLR y el conocido complejo de señalización inmunitaria. (Jing-Shan *et al.*, 2022).

Las secuencias de *NBS-LRR* suelen estar estrechamente unidas en loci complejos (Hulbert *et al.* 2001; Leister 2004; Mcdowell y Simón 2006). Por ejemplo, en el genoma de *A. thaliana*, el 73,2 % (109 de 149) de las secuencias *NBS-LRR* están ubicadas en grupos de genes y 40 secuencias que están presentes solo una vez (Meyers *et al.*, 2003). En eucariotas, los sistemas genéticos para generar nuevas funciones a menudo se basan en loci complejos que comprenden genes organizados en tándem de función relacionada (Borst y Greaves, 1987). Los complejos grupos de genes de resistencia identificados en las plantas se ajustan a esta situación. De hecho, se supone que la organización agrupada favorece los intercambios de secuencias, como el entrecruzamiento desigual y/o los eventos de conversión de genes, que pueden dar lugar, en algunos casos, a nuevas especificidades R (no parentales) (Chin *et al.*, 2001; Richter *et al.*, 1995; Sudupak *et al.* 1993).

Dentro del genoma, los genes *NBS-LRR* se organizan como genes aislados o como grupos vinculados de diferentes tamaños que se cree que facilitan la rápida evolución de éstos.

Estos grupos se pueden dividir en dos tipos en función de sus relaciones filogenéticas: (i) grupos que contienen genes *NBS-LRR* que han sido sometidos a duplicación en tándem, por lo que se ve que los genes *NBS-LRR* que se derivan de estos eventos se agrupan en árboles de genes de toda la especie; y (ii) grupos mixto. La mayoría de los miembros de la familia del gen *NBS-LRR*. Como ejemplos: *Li et al., 2010* informaron que en todo el genoma de *Lotus japonicus*, el 38,2% de los genes NBS mapeados se encontraban en ocho grupos, con una distribución cromosómica desigual, en el genoma del *Oryza sativa*, el 50% de los genes *NBS-LRR* identificados están agrupados y en *B. distachyon*, el 51% están agrupados (*Marone et al., 2013*).

Aunque la mayoría de los grupos *NBS-LRR* están compuestos de secuencias similares, muchos grupos también contienen algunos genes NBS filogenéticamente distantes. De hecho, alrededor del 25 % de los grupos de *M. truncatula* incluyen genes TNL y CNL. (*Marone et al., 2013*).

La tasa de evolución y los efectos de la selección no son homogéneos a nivel de los diferentes dominios dentro de cada secuencia génica, ni tampoco para los miembros de los diferentes subgrupos dentro de una familia génica. Con respecto a este primer aspecto, la tasa de conversión de genes parece haber sido mayor para los dominios LRR que para las regiones NBS, que parecen estar sujetas a una selección purificadora. La alta variabilidad de los dominios LRR está relacionada con su papel en el reconocimiento de productos específicos del gen *Avr*, para promover la resistencia de las plantas a los patógenos. De hecho, se han encontrado proporciones elevadas de sustituciones de nucleótidos no sinónimos a sinónimos en los dominios LRR; esto indica que la selección diversificadora actúa sobre los dominios LRR para mantener las variaciones. Para tener una idea de las variaciones a nivel de los dominios LRR, hay, en promedio, 14 LRR por proteína y, a menudo, de cinco a 10 variantes de secuencia para cada repetición; por lo tanto, en una especie como *A. thaliana*, existe el potencial de más de 9×10^{11} variantes (*Marone et al., 2013*).

En la presente investigación las familias mapeadas fueron agrupadas a partir de un análisis filogenético realizado por Campos Rivero (2020), el cual se generó utilizando secuencias completas de genes transcritos del tipo *NBS-LRR* seleccionados del transcriptoma de distintas especies en el que en la mayoría de las secuencias CNL, al igual que en las especies anteriores se encontraron motivos conservados. En el dominio NBS predominaron motivos característicos, en cuanto al dominio LRR, se encontraron 10 motivos conservados. Este dominio fue el más variable entre todas las secuencias analizadas NBS_Ateq. Con base a los

motivos característicos que compartían las diferentes secuencias analizadas fueron agrupadas en las familias 1 y 2 con las que se realizó la técnica de Hibridación Fluorescente *in situ*.

En el estudio realizado por Campos Rivero (2020), se observó que para la familia 1 y 2 todas las secuencias tenían una distribución espacial similar de motivos conservados en los dominios NBS que están involucrados en la señalización, los motivos más conservado son el bucle P, la quinasa-2 y los motivos Gly-Leu-Pro-Leu. Por otro lado, los LRR son dominios estructurales altamente adaptables que se dedican a las interacciones proteína-proteína y son los más variables, como se reportó previamente en especies como *B. distachyon* (Tan y Wu, 2012), *C. nucifera* (Puch Hau *et al.*, 2015), *H. vulgare* (Andersen *et al.*, 2016) y *C. amada* (Karthika *et al.*, 2019).

Los dominios LRR en el análisis filogenético de *A. tequilana* difiere de la familia 1 y la 2 ya que el LRR3 y LRR4 se encuentran presentes en la familia 2 sin embargo en la 1 no se encuentran, así como también el LRR8 está presente en la 1 pero no en la familia 2.

La presencia de estos motivos puede explicar la distribución en el patrón de hibridación para cada familia que se encuentran mayormente en diferentes sitios, sin embargo, las cohibridaciones son los dominios NBS que tienen en común.

La formación de grupos heterogéneos probablemente se deba a que provenían de un ancestro común y se derivaron de eventos de duplicación segmentaria que llevaron a la pérdida de algunos de los dominios característicos. Este mecanismo de duplicación ha sido descrito como aquel que contribuye al tipo de organización y diversificación de este tipo de gen (Marone *et al.*, 2013).

Para corroborar estos resultados se realizó el análisis de fibra de ADN el cual nos permitió conocer la organización genómica de cada familia en conjunto, mostrando arreglos en tandem y una colocalización de aproximadamente el 90% para la familia 1 y 2, donde se comprueba que estas familias conservan los dominios NBS que comparten, sin embargo el otro 10% del total de sitios de hibridación es diferente, lo cual implica que los loci de cada gen es distinto para el caso del dominio LRR variable.

El análisis de la secuencia completa del genoma de algunas especies vegetales, como *Oriza Sativa* y *A. thaliana* ha puesto en evidencia que la mayoría de los genes *NBS-LRR* se encuentran agrupados en tándem, disposición que podría estar relacionada con la generación de nuevas especificidades. Estas nuevas especificidades podrían desarrollarse por recombinación, conversión génica o por inserción de elementos móviles entre los diferentes genes agrupados (Ritchter y Ronald, 2000; Meyers *et al.*, 2003). La distribución física de los genes *NBS-LRR* en los genomas de las plantas indica que la duplicación en tándem y

segmentaria son factores importantes en la proliferación del gen R. La mayoría de los genes R residen en grupos y la frecuencia de recombinación entre genes agrupados puede variar notablemente, incluso dentro de un solo grupo. Se ha demostrado que los factores bióticos y abióticos aumentan la frecuencia de recombinación en ensayos basados en transgenes informadores, lo que sugiere que los factores estresantes externos pueden afectar la estabilidad del genoma.

El análisis de fibra de ADN se ha utilizado anteriormente en estudios de telómeros proporcionando información importante sobre las posibles correlaciones entre parámetros como la longitud de los telómeros (Kahl *et al.*, 2020) y el estado de metilación (Wang *et al.*, 2013).

La técnica de extensión de fibra permite la detección simultánea de un marcador específico de cromosoma y una repetición particular. Específicamente, mediante el análisis de fibras individuales, es posible distinguir entre un patrón verdaderamente uniforme y el resultado promedio de diversos patrones en una región cromosómica específica (Franek *et al.*, 2021).

Extender la cromatina y las fibras de ADN nos permite estudiar la epigenética de las repeticiones individuales en su contexto cromosómico específico y, por lo tanto, constituye una herramienta importante para obtener una comprensión completa de la organización epigenética de los genomas. La aplicación clave en epigenética es el mapeo de varias repeticiones en tándem, como telómeros, genes rDNA y centrómeros.

Cabe mencionar que el uso de un protocolo de extensión de fibra optimizado es esencial para obtener datos más reproducibles y minimizar la agrupación de fibras (Franek *et al.*, 2021).

Cuando se trata de resolución, la obtención de imágenes de fibras de ADN no requiere microscopía de súper resolución, ya que el estiramiento físico del ADN generalmente conduce a señales discretas de sondas o anticuerpos FISH.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

De acuerdo con los datos obtenidos en el presente trabajo la hipótesis planteada se acepta, ya que el 90% de sitios de hibridación entre la familia 1 y 2 se encuentra en distintas regiones dentro del núcleo en interfase, únicamente el 9.75% de sitios restante están en cohibridación lo cual puede ser explicado por los motivos NBS conservados que comparten.

Por otro lado, al analizar la organización genómica in situ de ambas familias se observó una colocación del 90% de ambas en una pequeña parte del genoma, la cual está representada por kilobasas, permitiendo la visualización en tandem de cada familia que era lo esperado de acuerdo a los estudios previos. Es importante resaltar que la resolución observada es de aproximadamente 1000 pb.

Hasta nuestro conocimiento esta investigación es el primer reporte de mapeo físico en *Agaves*, en el orden asparagales y en monocotiledóneas.

Este trabajo presenta una gran importancia ya que no existen estudios previos del mapeo físico de los genes *NBS-LRR* en *Agave* lo que puede ser la base para realizar próximos estudios de análisis comparativos en base a los distintos cariotipos del género en asociación con los sitios de hibridación y la variación del número de copias de las especies analizadas.

Como se ha mencionado a lo largo de esta investigación, se sabe que la presencia de los genes *NBS-LRR*, así como la expresión de éstos se encuentran directamente relacionada con la respuesta de las plantas como mecanismo de defensa ante patógenos.

Se han caracterizado más de 30 genes de diferentes especies de plantas que brindan resistencia a una variedad de diferentes especies de patógenos y plagas. Las estructuras de la mayoría son consistentes con un papel en el reconocimiento de patógenos y la señalización de la respuesta de defensa. Los genes de resistencia son muy abundantes en los genomas de las plantas y la mayoría pertenecen a familias de genes estrechamente vinculadas.

Los estudios de las familias de genes *NBS-LRR* en plantas representan un desafío que puede ser la base para el conocimiento sobre los mecanismos genómicos y moleculares que conforman la regulación génica y la función de las proteínas. Su evolución a nivel genético y genómico se puede definir a través de esta antigua y numerosa familia de genes.

Finalmente, la participación de los genes *NBS-LRR* en la resistencia a una gran cantidad de patógenos hace que estos genes sean una fuente invaluable para mejorar la resistencia a enfermedades en las plantas mediante el uso de marcadores moleculares perfectos o mediante la transformación genética.

Hasta la fecha, se han mapeado en diferentes especies cientos de genes de resistencia y relativamente pocos loci de rasgos cuantitativos para la resistencia de las plantas a los patógenos, y algunos también se han clonado.

Los resultados obtenidos en el presente estudio pueden proporcionar una forma de validación funcional de las familias 1 y 2 como genes candidatos y el desarrollo de marcadores adecuados para la selección asistida por marcadores (MAS) de resistencia a patógenos.

Por otro lado, se puede considerar la utilización de la selección asistida por marcadores para el mejoramiento genético, así como también el mapeo de características cuantitativas a través de la identificación de loci de caracteres cuantitativos (QTL) para así poder asociarlos como marcadores y el fenotipo de los individuos de una población de mejoramiento. Es decir, poder establecer una correlación entre la ubicación del gen en un cromosoma para determinar la expresión de un carácter específico e identificar el gen que confiere resistencia ante distintos patógenos.

La identificación de los genes o loci de rasgos cuantitativos (QTL) que son encargados de la resistencia a enfermedades sería de suma importancia para disminuir las pérdidas económicas provocadas a causa de los patógenos a los que esta especie es susceptible.

Cabe resaltar que es importante realizar más investigaciones citogenéticas para comprender la evolución de este género y desarrollar programas de reproducción para preservar su biodiversidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham-Juárez, M. J., Martínez A., Leyva-González M, Herrera L., Simpson J. (2010). Class I KNOX genes are associated with organogenesis during bulbil formation in *Agave tequilana*. *Journal of Experimental Botany* 14, 4055-4067.
- Aceves R.J. (2003). Prevención y manejo integral de la marchitez de *Agave tequilana* Weber var. azul en Jalisco. Folleto Técnico No. 1. Campo Experimental Centro Altos de Jalisco, INIFAP, pp. 62.
- Al-Turki, T. A., Masrahi, Y. S., Sayed, O. H. (2014). Photosynthetic adaptation of *Euphorbia fractiflexa* (Euphorbiaceae) and survival in arid regions of the Arabian Peninsula. *Journal of Plants interactions*, 9:1, 107-111.
- Ameline-Torregrosa, C., Wang, B. B., O'Bleness, M. S., Deshpande, S., Zhu, H., Roe, B., Cannon, S. B. (2007). Identification and characterization of Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat genes in the model plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 146(1), 5-21.
- Andersen, E. J., Ali, S., Reese, R. N., Yen, Y., Neupane, S. (2016). Diversity and Evolution of Disease Resistance Genes in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Evolutionary Bioinformatics*, 12, 99-108.
- Arizaga, S., Ezcurra, E. (2002). Propagation mechanism in *Agave macroacantha* (Agavaceae), a tropical arid-land succulent rosette. *Am. J. Bot.* 89, 632-641.
- Arya, P., Kumar, G., Acharya, V., Singh, A. K. (2014). Genome-wide identification and expression analysis of NBS-encoding genes in *Malus x domestica* and expansion of NBS genes family in Rosaceae. *PLOS ONE*, 9,9.
- Azhaguvel, P., Weng, Y., Babu, R., Manickavelu, A., Saraswathi, D. V., y Balyan, H. S. (2016). Fundamentals of Physical Mapping. In Principles and Practices of Plant Genomics, Volume 3 (pp. 60-98).
- Bai, J., Pennill, L. A., Ning, J., Lee, S. W., Ramalingam, J., Webb, C. A., Hulbert, S. H. (2002). Diversity in nucleotide binding site-leucine-rich repeat genes in cereals. *Genome research*, 12, 1871-1884.
- Bakker, E., Borm T., Prins P., Van der Vossen, E., Uenk, G., Arens, M., Boer, J., Van-Eck, H., Muskens, M., Vossen, J, van der Linden G, van Ham R, Klein-Lankhorst, R., Visser, R., Smant, G., Bakker, J., Goverse, A. (2011). A genome-wide genetic map of NB-LRR disease resistance loci in potato. *Springer* 123, 493-508.

-
- Ballvora, A., Jocker, A., Viehover, P., Ishihara, H., Paal, J., Meksem, K., Bruggmann, R., Schoof, H., Weisshaar, B., Gebhardt, C. (2007). Comparative sequence analysis of *Solanum* and *Arabidopsis* in a hot spot for pathogen resistance on potato chromosome V reveals a patchwork of conserved and rapidly evolving genome segments. *Genomics* 8,112.
 - Borst, P., D. R. Greaves. (1987). Programmed gene rearrangements altering expression. *Science* 235, 658–667.
 - Brandham, P. E., M. J. Doherty. (1998). Genome size variation in the *Alloaceae*, an angiosperm family displaying karyotypic orthoselection. *Annals of Botany* 82, 67–73.
 - Campos-Rivero, G. (2020). Caracterización y Análisis de expresión de los genes NBS-LRR en *Agave Tequilana* Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., México. Pp. 15,73.
 - Campos-Rivero, G., Sánchez-Teyer, L.F., De la Cruz-Arguijo, E. A., Ramírez-González, M.S., Larralde-Corona, C. P., Narváez-Zapata, J. A. (2019). Bioprospecting for fungi with potential pathogenic activity on leaves of *Agave tequilana* Weber var. Azul. *J Phytopathol.* 16, 283– 294.
 - Campos-Rivero, G., Narváez-Zapata, J. A., Escalante-Erosa, F., & Sánchez-Teyer, L. F. (2021). Variability and evolution of *NBS-LRR* genes in *Agave tequilana* and their differential response to *Lasiodiplodia* infection. *European Journal of Plant Pathology*, 162, 305-327.
 - Castorena-Sánchez, I., Escobedo, R., M. Quiroz, A. (1991). New cytotaxonomical determinants recognized in six taxa of *Agave* in the section *Rigidiae* and *Sisalane*. *Canadian Journal of Botany* 69, 1257–1264.
 - Chen, M., Presting, G., Barbazuk, W. B., Goicoechea, J. L., Blackmon, B., Fang, G., Kim, H., Frisch, D., Yu, Y., Sun, S. (2002). An integrated physical and genetic map of the rice genome. *Plant Cell.* 14 (3), 537-545.
 - Chin, D. B., Arroyo Garcia, R., Ochoa, O. E., Kesseli, R. V, Lavelle, D. O. (2001). Recombination and spontaneous mutation at the major cluster of resistance genes in lettuce (*Lactuca sativa*). *Genetics* 157, 831–849.
 - Colunga-García, Marín. P., Coello-Coello, J., Eguiarte, L. E., Pinero, D. (1999). Isozymatic variation and phylogenetic relationships between henequen (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *A. angustifolia* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 86, 115–123.

-
- Colunga P., May-Pat, F. (1993). Agave studies in Yucatan, Mexico. I. Past and present germplasm diversity and uses. *Economic Botany* 47, 312-327.
 - Cushman, J. C. (2001). Crassulacean Acid Metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiology*, 127(4), 1439-1448.
 - Dodds, P. N., Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*. 11, 539–548.
 - Doleželová, M., Valárik, M., Swennen, R. (1998). Physical mapping of the 18S-25S and 5S ribosomal RNA genes in diploid bananas. *Biologia Plantarum* 41, 497–505.
 - Dubey, N., Singh, K. (2018). *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*. Springer, Singapore, pp. 5.
 - Ellis, J., Dodds, P., Pryor, T. (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current opinion in plant biology*, 3(4), 278-284.
 - Echevarría-Machado, I., Sánchez-Cach, L. A., Hernández-Zepeda, C., Rivera-Madrid, R., and Moreno-Valenzuela, O. A. (2005). A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. *Molecular Biotech*, 31,129-135.
 - Eguiarte, F. L., Souza, V., Silva-Montellano, A. (2000). Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, ecología evolutiva de la reproducción y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 66, 131-150.
 - Eguiarte F. L. E. y González, G. A. (2007). De genes y magueyes: estudio y conservación de los recursos genéticos del tequila y el mezcal. *Ciencias*. 87, 28-35
 - Ersfeld, K. (2004). Fiber-FISH: fluorescence *in situ* hybridization on stretched DNA. *Methods Mol Biol.*;270, 395-402.
 - Franek, M., Kilar, A., Fojtík, P., Olšinová, M., Benda, A., Rotrekl, V., Dvořáčková, M., Fajkus, J. (2021). Super-resolution microscopy of chromatin fibers and quantitative DNA methylation analysis of DNA fiber preparations. *J Cell Sci* 1, 134.
 - Gall, J. G., Pardue, M. L. (1969). Formation and detection RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 63: 378-383.
 - García-Mendoza, A. J. (2007). Los Agaves de México. *Ciencias*. 87, 14-23.
 - Garcia, P. E., Lozoya, G. E. (2004). Genes de Resistencia a Enfermedades en Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 414-422.
 - Geffroy, V., Mireille, S., Billant, P., Dron, M., Langin, T. (2008). Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: A case study for mapping two

independent genes. TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische and angewandte *Genetics*. 116, 407-15.

- Gentry H. S. (1982). Agaves of Continental North America. The University of Arizona press, Tucson.
- Gerdes MG, Carter KC, Moen PT Jr, Lawrence JB (1994) Dynamic changes in the higher-level chromatin organization of specific sequences revealed by *in situ* hybridization to nuclear halos. *J Cell Biol* 126:289–304.
- Giuseppe, O. R. T. U., Bertetti, D., Gullino, M. L., Garibaldi, A. (2015). *Fusarium oxysporum* f. sp. *echeveriae*, a novel forma specialis causing crown and stem rot of *Echeveria agavoides*. *Phytopathologia Mediterranea*, 54, 64-75.
- Granados Sanchez D. (1993). Cultura y utilización del Maguey. Los Agaves de México. Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco. México, pp. 150.
- Granick, B. E., (1944). A Karyosystematic study of the genus *Agave*. *American Journal of Botany*, 31, 283-298.
- Grube, R. C., Radwanski, E. R., Jahn, M. (2000). Comparative genetics of disease resistance within the Solanaceae. *Genetics*. 155,873–887.
- Gu, L., Si, W., Zhao, L., Yang, S., Zhang, X. (2015). Dynamic evolution of NBS-LRR genes in bread wheat and its progenitors. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(2), 727-738.
- Harper, L., Cande, Z. (2020). Mapping a new frontier; development of integrated cytogenetic maps in plants. *Funct Integr Genomics* , 89-98.
- Hau, C. A. (2012). Aislamiento y caracterización de secuencias candidatas a genes de resistencia en cocotero. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., México. pp. 65.
- Herrera, J. C. (2007). La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 26-35.
- Hulbert, S.H.; Webb, C.A.; Smith, S.M.; Sun, Q. (2001). Resistance gene complexes: Evolution and utilization.. *Phytopathology* 39, 285–312.
- Jensen, E. (2014). Technical Review *In situ* Hybridization. *The Anatomical Record*, 1349-1353.
- Jia, Y., Yuan, Y., Zhang, Y., Yang, S., Zhang, X., (2015). Extreme expansion of NBS-encoding genes in Rosaceae. *BMC Genet.* 3, 16-48.

-
- Jiang, J., Hulbert, S.H., Gill, B.S. (1996). Interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping: a physical mapping strategy for plant species with large complex genomes. *Molecular and General Genetics MGG*. 252, 497–502.
 - Jiang, J., Gill, S. B. (2006). Current status and future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome*. 49: 1057-1068.
 - Jing-Shan, Y., Zhi-Hao, Q., Tao, S., Zhi-Zhong, Li., Jin-Ming, Chen. (2022). Chromosome-level genome assembly of the aquatic plant *Nymphoides indica* reveals transposable element bursts and NBS-LRR gene family expansion shedding light on its invasiveness, *DNA Research*.
 - Jones, N., Ougham, H., Thomas, H. (1997). Markers and mapping: we are all genetics now. *New Phytologist* 137, 165-177.
 - Jones, D. A., Takemoto, D. (2004). Plant innate immunity Direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 48-62.
 - Jurgenson, J.E., Bowden, R.L., Zeller, K.A., Leslie, J.F., Alexandra, N.J., and Plattner, R.D. 2002. A genetic map of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Genetics* 160:1451-1460.
 - Kahl, V. F. S., Allen, J. A. M., Nelson, C. B., Sobinoff, A. P., Lee, M., Kilo, T., Vasireddy, R. S. and Pickett, H. A. (2020). Telomere length measurement by molecular combing. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 493.
 - Kang, Y.J., Kim, K.H., Shim, S., Yoon, M.Y., Sun, S., Kim, M.Y., Van, K., Lee, S.H. (2012). Genome-wide mapping of NBS-LRR genes and their association with disease resistance in soybean. *BMC Plant Biol.* 12, 139.
 - Karthika, R., Prasath, D., Anandaraj, M. (2019). Transcriptome-wide identification and characterization of resistant gene analogs (RGAs) of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) under stress induced by pathogen. *Scientia Horticulture*, 81-88.
 - Kole, C. (2010). Principles and Practices of Plant Genomics. Taylor and Francis. pp. 370.
 - Kuang, H., Woo, S.-S., Meyers, B. C., Nevo, E., Michelmore, R. W. (2004). Multiple genetic processes result in heterogeneous rates of evolution within the major cluster disease resistance genes in Lettuce. *The Plant Cell*, 16(11), 2870-2894.

-
- Kuang HH, Wei FS, Marano MR, Wirtz U, Wang XX, Liu J, Shum WP, Zaborsky J, Tallon LJ, Rensink W, Lobst S, Zhang PF, Tornqvist CE, Tek A, Bamberg J, Helgeson J, Fry W, You F, Luo MC, Jiang JM, Buell CR, Baker B. (2005). The R1 resistance gene cluster contains three groups of independently evolving, type I R1 homologs and shows substantial structural variation among haplotypes of *Solanum demissum*. *Plant Journal*. 44:37–51.
 - Leipe, D. D., Koonin, E. V., Aravind, L. (2004). STAND, a class of P-Loop NTPases including animal and plant regulators of Programmed Cell Death: Multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *Journal of Molecular Biology*, 343(1), 1-28.
 - Leister, D., (2004). Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. *Trends Genet.* 20 116–122.
 - Leitch, I. J., Heslop-Harrison, S. (1992). Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rRNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome*, 35, 1013-1018.
 - Li X., Cheng Y., Ma W., Zhao Y., Jiang H., Zhang M. (2010). Identification and characterization of NBS-encoding disease resistance genes in *Lotus japonicus*. *Plant Syst. Evol.* 289:101–110.
 - Liehr, T. (2017). Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH). Jena: Springer.
 - Lozano, R., Ponce, O., Ramirez, M., Mostajo, N., & Orjeda, G. (2012). Genome-wide identification and mapping of NBS-encoding resistance genes in *Solanum tuberosum* Group phureja. *PLOS ONE*, 4-7.
 - Manzo-Sánchez, G., James-Kay, A., Ortiz-Vázquez, E., Simpson-Williamson, J. (2007). Desarrollo de Mapas Genéticos y Físicos de Hongos Fitopatógenos: Aplicaciones y Perspectivas. *Rev. mexicana. Fitopatología.* 54-65.
 - Marone, D., Russo, M. A., Laido, G., De Leonadis, A. M., Mastrangelo, A. M. (2013). Plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: Active guardians in host defense responses. *International Journal of Molecular Sciences.* 14(4), 7302–7326.
 - Martínez-Pacheco, J. (2017). Proteínas R y percepción de efectores patogénicos en la familia Solanaceae. *Revista De Protección Vegetal*, 32(1), 1–9.
 - McHale, L., Tan, X., Koehl, P., Michelmore, R. W. (2006). Plant NBS-LRR proteins: Adaptable guards. *Genome Biology.* 4,212-214.
 - McDowell, J. M., y Simon, S. A. (2006). Recent insights into R gene evolution. *Molecular Plant Pathology*, 7(5), 437-448.

- Mendoza, A. G. (2007). Los Agaves de México. *Ciencia*, 14-23.
- Meyer, B.C., Scalabrin, S., Morgante, M. (2004). Mapping and sequencing complex genomes: let's get physical. *Nature*, 5, 578-588.
- Meyers, B. C., Dickerman, A. W., Michelmore, R. W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. W., Young, N. D. (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant Journal*, 20(3), 317-332.
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., Michelmore, R.W. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15:809–834.
- Michelmore, R. W., Meyers, B. C. (1998). Clusters of Resistance Genes in Plants Evolve by Divergent Selection and a Birth-and-Death Process. *Genome Research*, 8(11), 1113-1130.
- Moncada, M. M., Elvir, M. A., Lopez, J. R., Ortiz, A. S. (2022). Predicción bioinformática de proteínas NBS-LRR en el genoma de *Coffea arabica*. *Bionatura*, 7 (3), 19.
- Mondragon-Palomino, M., Meyers, B.C., Michelmore, R.W., Gaut, B.S. (2002). Patterns of positive selection in the complete NBS-LRR gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.* 12, 1305–1315.
- Moreno–Salazar, S. F., M. Esqueda. J. Martínez, G. Palomino. (2007). Tamaño del genoma y cariotipo en *Agave angustifolia* y *A. rhodacantha* de Sonora, México. *Fitotecnía Mexicana*, 30, 13–23.
- Murata, M., Heslop, H., Fusao, M. (2003). Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence *in situ* hybridization with cosmid clones. *The plant Journal*, 31-37.
- Nava-Cruz, N. Y., Medina-Morales, M. A., Martinez, J. L., Rodriguez, R., Aguilar, C. N. (2015). Agave biotechnology: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4), 546-559.
- Paux, E., Sourdille, P., Salse, J., Saintenac, C., Korol, A., Leroy, P., y Alaux, M. (2008). Un mapa físico del cromosoma 3B de trigo harinero de 1 gigabase. *Science*, 101-104.
- Pérez Hernández, E., Chávez Parga, M., y González Hernández, J. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Revista colombiana de Biotecnología*, 148-164.
- Pinkava, D. J., M. A. Baker. (1985). Chromosome and hybridization studies of agaves. *Desert Plants*, 7, 93-100.

-
- Porter, B. W., Paidi, M., Ming, R., Alam, M., Nishijima, W. T., Zhu, Y. J. (2009). Genome-wide analysis of *Carica papaya* reveals a small NBS resistance gene family. *Molecular Genetics and Genomics*, 281(6), 609-626.
 - Puch-Hau, C., Oropeza-Salín, C., Peraza-Echeverría, S., Gongora-Paredes, M., Córdova-Lara, I., Narvaez-Cab, M., ... Sáenz-Carbonell, L. (2015). Molecular cloning and characterization of disease-resistance gene candidates of the nucleotide binding site (NBS) type from *Cocos nucifera* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 89, 87-96.
 - Quija-Lamina, P., Segovia Salcedo, M. C., Jadán, M., Proaño, K. I. (2010). Estandarización de la metodología para el conteo cromosómico en especies del género *Polylepis* en el Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas: REMCB*. Vol. 31, Nº. 1-2, 33-49.
 - Richter, T. E., Pryor, T. J., Bennetzen J. L., Hulbert, S. H. (1995). New rust resistance specificities associated with recombination in the Rp1 complex in maize. *Genetics* 141, 373–381.
 - Robert, M. L., Lim, K. Y. Hanson, L., Sanchez-Teyer, F., Bennett, M. D., Leitch, A. R. Leitch, I. J. (2008). Wild and agronomically important *Agave* species (Asparagaceae) show proportional increases in chromosome number, genome size, and genetic markers with increasing ploidy. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 158(2), 215-222.
 - Rout, E., Nanda, S., Nayak, S., Joshi, R. K. (2014). Molecular characterization of NBS encoding resistance genes and induction analysis of a putative candidate gene linked to Fusarium basal rot resistance in *Allium sativum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 85, 15-24.
 - Rubio-Piña, J., Quiroz-Moreno, A., Sánchez-Teyer, L. F. (2016). A quantitative PCR approach for determining the ribosomal DNA copy number in the genome of *Agave tequila* Weber. *Electronic Journal of Biotechnology*, 22, 9-15.
 - Saha, D., Rana, R. S., Sureja, A. K., Verma, M., Arya, L., Munshi, A. Das. (2013). Cloning and characterization of NBS-LRR encoding resistance gene candidates from Tomato Leaf Curl New Delhi Virus resistant genotype of *Luffa cylindrica* Roem. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 81, 107-117.
 - Sayed. O. H. (2001). Crassulacean Acid Metabolism 1975-2000, a check list. *Photosynthetica*, 39(3), 339-352.

-
- Sekhwal M. K., Li P., Lam I., Wang X., Cloutier S., You F. M. (2015). Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 19248–19290.
 - Schwarzbacher, T., Heslop-Harrison P. (2000). Practical *in situ* hybridization. BIOS, Scientific Publishers, UK, pp 203.
 - Shang, J., Tao, Y., Chen, X., Zou, Y., Lei, C., Wang, J., Li, X., Zhao, X., Zhang, M., Lu, Z. (2009). Identification of a new rice blast resistance gene, Pid3, by genome wide comparison of paired nucleotide-binding site leucine-rich repeat genes and their pseudogene alleles between the two sequenced rice genomes. *Genetics*, 182, 1303–1311.
 - Sjöberg A, Peelman LJ, Chowdhary BP. (1997). Application of three different methods to analyse fibre-fish results obtained using four lambda clones from the porcine MHC III region. *Chromosome Res* 5,247–253.
 - Sourdille, P., Cadalen, T., Gay, G., Gill, B., y Bernard , M. (2002). Molecular and physical mapping of genes affecting awning in wheat. *Plant Breeding* , 320-324.
 - Staskawez, B., Ausubel, F., Baker B., Ellis J. and Jones J. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 268, 661-667.
 - Sudupak, M. A., J. L. Bennetzen and S. H. Hulbert, (1993). Unequal exchange and meiotic instability of disease-resistance genes in the Rp1 region of maize. *Genetics* 133 119–125.
 - Sun, Q., Collins, N. C., Ayliffe, M., Smith, S. M., Drake, J., Pryor, T., Hulbert, S. H. (2001). Recombination between paralogues at the rp1 rust resistance locus in maize. *Genetics*, 158(1), 423-438.
 - Tan, S., Wu, S. (2012). Genome wide analysis of nucleotide-binding site disease resistance genes in *Brachypodium distachyon*. Comparative and functional genomics, 2012.
 - Tamayo-Ordóñez, Y.J., Narváez-Zapata, J.A., Sánchez-Teyer, L.F., (2015). Comparative characterization of ribosomal DNA regions in different agave accessions with economical importance. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1–16.
 - Tamayo-Ordóñez, M. C., Rodríguez-Zapata, L. C., Narváez-Zapata, J. A., Tamayo-Ordóñez, Y. J., Ayil-Gutiérrez, B. A., Barredo-Pool, F., Sánchez-Teyer, L. F. (2016). Morphological features of different polyploids for adaptation and molecular

characterization of CC-NBS-LRR and LEA gene families in *Agave* L. *Journal of Plant Physiology*, 195, 80-94.

- Tartilán Menéndez, M. N. (2015). Análisis de secuencias NBS-LRR en el género *lens*. Tesis de Doctorado. Universidad de León. México. pp. 97.
- Trask, B. J. (2002) Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nature Reviews Genetics* 3, 769–778.
- Van't Slot, K. (2002). A dual role for microbial pathogen-derived effector proteins in plant disease and resistance. *Critical Reviews in Plant Science*, 21, 229-271.
- Vázquez Díaz, E., García Nava, J. R., Peña Valdivia, C. B., Ramírez Tobías, H. M., Morales Ramos, V. (2011). Tamaño de la semilla, emergencia y desarrollo de la plántula de maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck). *Revista fitotecnia mexicana*, 34(3), 167-173.
- Vélez-Gutlérrez, C. (1997). Selección celular para resistencia a filtrados microbianos en *Agave tequilana* Weber. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. 97 p.
- Vega-Ramos, K. L., Uvalle-Bueno, J. X., Gómez-Leyva, J. F. (2013). Molecular variability among isolates of *Fusarium oxysporum* associated with root rot disease of *Agave tequilana*. *Biochemical genetics*, 51, 243-255.
- Virgen-Calleros, G., Martínez-Ramírez, J. L., Rodríguez-Ruvalcaba, R., Bernal, F. J., Vázquez-García, M. Pimienta-Barrios, E. (2000). Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber var. Azul. Universidad de Guadalajara. Informe técnico para el Programa General de Apoyo y Desarrollo Tecnológico a la Cadena Productiva Agave-Tequila. Guadalajara, México. 50 p.
- Wang, K., Zhang, W., Jiang, Y., Zhang, T. (2013). Systematic application of DNA fiber-FISH technique in cotton. *PLOS ONE*, 8-9.
- Wei, F., Coe, E. D., Nelson, W., Bharti, A. K., Engler, F., Butler, E., Wing, R. A. (2007). Physical and genetic structure of the maize genome reflects its complex evolutionary history. *PLoS genetics*, 3(7).
- Yamori, W., Hikosaka, K., Way, D. A. (2014). Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation *Photosynthesis Research*, 119, 101-117.

- Yang, C., Zhao, L., Zhang, H., Yang, Z., Wang, H., Wen, S., Liu, B. (2014). Evolution of physiological responses to salt stress in hexaploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(32), 11882-11887.
- Yu, Q., Tong, E., Skelton, R. L., Bowers, J. E., Jones, M. R., Murray, J. E. (2009). A physical map of the papaya genome with integrated genetic map and genome sequence. *BMC Genomics* 10:371.
- Żmieńko A, Samelak A, Kozłowski P, Figlerowicz M. (2014). Copy number polymorphism in plant genomes. *Theor Appl Genet*, 127, 1-18.