



**Centro de Investigación Científica
de Yucatán, A.C.**

Posgrado en Ciencias Biológicas

**DESARROLLO DE MARCADORES SCAR A PARTIR
DE AFLP EN *Agave tequilana***

Tesis que presenta

NELLY BEATRIZ SANSORES SANTOS

En opción al título de
MAESTRO EN CIENCIAS

(Opción Biotecnología)



Mérida Yucatán, México; Febrero 2012

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 titulado "Desarrollo de marcadores SCAR a partir de AFLP en *Agave tequilana*" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. bajo la dirección del Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer, dentro de la Opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado de Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,



Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela
Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Mérida, Yucatán, México; a 21 de Octubre de 2011

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación 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 ha 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 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.



Nelly Beatriz Sansores Santos

Este trabajo de tesis se realizó en los laboratorios del Departamento de Biotecnología Del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., haciendo uso de sus instalaciones y equipos, bajo la asesoría del Dr. Felipe Sánchez Teyer.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Felipe Sánchez Teyer por haberme guiado en el desarrollo de la presente tesis por su asesoría y apoyo.

A la M.C. Adriana Quiroz y a la Q.F.B. Matilde Ortiz por su apoyo técnico en laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio de Genómica Funcional y Marcadores Moleculares: María y Yahaira Tamayo, Antonio Rescalvo y Javier Hujara por su amistad.

A mis amigos Ana Laura, Fabiola, Fernando y Leonel que siempre estuvieron al pendiente de mi gracias por su amistad.

Y en general a todos los compañeros y maestros de esta institución que de alguna forma contribuyeron a mi desarrollo profesional.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) la ayuda económica proporcionada durante el desarrollo del presente trabajo y al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY).

DEDICATORIA

A Dios por todas las cosas buenas que me ha proporcionado en cada etapa en mi vida.

A mis padres María Santos y Lázaro Sansores por su infinito amor, cariño y consejos.

A mi esposo Cesar por su amor y comprensión, y por haberme alentado y apoyado.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
<u>CAPÍTULO I. " AGAVE COMO MODELO DE ESTUDIO MOLECULAR PARA OBTENCIÓN DE MARCADORES TIPO SCAR"</u>	
I. Antecedentes	3
1.1 Marcadores moleculares	3
1.2 Técnicas de marcadores moleculares	4
1.2.1 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	4
1.2.2 ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)	4
1.2.3 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)	5
1.2.4 Amplificación de regiones de secuencia caracterizada (SCAR)	5
1.3 Desarrollo de marcadores moleculares para identificación vegetal	9
1.4 Agave	11
1.5 <i>Agave tequilana</i> Weber variedad Azul	13
1.6 Denominación de origen del tequila y la variedad Azul de la especie <i>A. tequilana</i>	14
II. Justificación	15
III. Objetivos	16
IV. Estrategia experimental	17
V. Referencias	18

CAPÍTULO II. "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN MARCADOR TIPO SCAR"

I.	Introducción	25
II.	Materiales y métodos	26
	2.1 Aislamiento y caracterización de los fragmentos AFLP	27
	2.1.1 Corte y elusión de la banda del gel de poliacrilamida	27
	2.1.2 Reamplificación y clonación de fragmentos de AFLP	28
	2.1.3 Caracterización de fragmentos reamplificados	29
III.	Resultados	30
	3.1 Identificación de bandas específicas a especies y variedades de <i>Agave</i>	30
	3.2 Aislamiento de fragmentos de AFLP	35
	3.3 Caracterización de marcadores AFLP	39
	3.4 Diseño y validación de marcadores tipo SCAR	42
	3.4.1 Iniciadores específicos diseñados	42
	3.4.2 Validación de iniciadores específicos como marcadores SCAR	45
IV.	Discusión	49
V.	Conclusiones	55
VI.	Referencias	56

CAPÍTULO III. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

I.	Discusión general	63
II.	Conclusiones generales	64
III.	Perspectivas	65
IV.	Referencias	66

ANEXOS	69
--------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

1.	Perfiles de AFLP que identifican polimorfismo a nivel varietal en la especie <i>A. tequilana</i> Weber.	32
2.	Reamplificación de fragmentos de AFLP de <i>A. tequilana</i> Weber recuperados del gel de poliacrilamida.	35
3.	Liberación de insertos de plásmidos recombinantes por PCR y por digestión con <i>EcoRI</i> .	38
4.	Alineamiento de verificación como Fragmento de AFLP del marcador G299-Sg240 específico a la variedad Sigüin.	41
5.	Validación del par de iniciadores específicos SCR_03 diseñados para el fragmento G5108-Ch224-7.	45
6.	Validación de iniciadores específicos SCR_01 y SCR_04, diseñados para los fragmentos: G5140-Mñ251-7/8 y G5106-Mñ178-8 respectivamente.	46
7.	Validación de iniciadores específicos SCR_05 y SCR_06 diseñados de la secuencia común entre 7 clonas de fragmentos de AFLP recuperados del marcador G299-Sg240 aislado de la variedad Sigüin.	48

Índice de Figuras

1. Caracterización de ARPs que identifican poliovirus a nivel viral en la
 2000 en el sistema de agua.

2. Caracterización de fragmentos de ARPs de A. rotavirus Water
 2000 en el sistema de agua de poliovirus.

3. Liberación de fragmentos de ARPs recombinantes por PCR y por
 2000 digestión con EcoRI.

4. Análisis de verificación como fragmento de ARPs del
 2000 genotipo G255-2540 específico a la variedad 8191.

5. Caracterización del pat de iniciadores específicos PCR de
 2000 con el fragmento G255-2540-ORF1.

6. Validación de iniciadores específicos BCR_01 y BCR_02
 2000 diseñados para los fragmentos G255-2540-75 y G255-2540-117
 2000 y respectivamente.

7. Validación de iniciadores específicos BCR_03 y BCR_04
 2000 diseñados en la secuencia común entre 7 clones de fragmentos
 2000 de ARPs recuperados del manantial G255-2540 situado de la
 2000 variedad 8191.

INDICE DE CUADROS

1.	Aplicaciones de los marcadores SCAR.	8
2.	Marcadores AFLP específicos a nivel varietal y a nivel especie en <i>Agave</i> identificados en diferentes perfiles de poliacrilamida.	34
3.	Fragmentos de AFLP clonados exitosamente por <i>E. coli</i> en pGEM-T para su aislamiento.	37
4.	Secuencias de AFLP caracterizadas específicas a las variedades Sigüin, Azul, Chato y Moraleño en la especie <i>Agave tequilana</i> Weber y secuencias utilizadas como templado para el diseño de iniciadores.	42
5.	Iniciadores diseñados específicos a las secuencias de AFLP caracterizadas en la especie <i>Agave tequilana</i> Weber, los cuales fueron seleccionados para su síntesis.	44

INDICE DE ANEXOS

1. **ANEXO A. Análisis de los Perfiles de AFLP en diferentes especies de *Agave* y en diferentes variedades de *Agave tequilana*. 69**
2. **ANEXO B. Fragmentos de AFLP caracterizados en *Agave tequilana* variedad Moraleño. 74**
3. **ANEXO C. Fragmentos de AFLP caracterizados en *Agave tequilana* variedad Chato. 76**

RESUMEN

La caracterización de una secuencia específica a algún determinado genotipo la cual es identificada en un perfil de AFLP (*polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados*, por sus siglas en inglés) ó que se presenta únicamente en alguna especie ó variedad vegetal, se considera como un marcador potencial que puede ser utilizado en identificación vegetal. A este respecto, el caracterizar y convertir una secuencia AFLP en un marcador de secuencia específica SCAR (*Amplificación de Regiones de Secuencia Caracterizada*, por sus siglas en inglés) permite desarrollar una estrategia para la evaluación de cada loci polimórfico AFLP de manera individual en el genoma de cada variedad.

En el presente trabajo se analizó el potencial de formación de SCAR a partir de 6 bandas de AFLP específicas provenientes de 4 variedades (Azul, Sigüin, Moraleño y Chato) de la especie *Agave tequilana* Weber. Nuestros resultados permiten proponer 2 fragmentos encontrados: el G5140-Mñ251 y el G299-Sg240, como marcadores SCARs para el desarrollo de marcadores moleculares en identificación vegetal para tales variedades de *Agave*.

A partir de nuestros resultados, es posible discutir que el empleo de la técnica de AFLP como método de análisis genómico diferencial en su mayoría se limita únicamente a la detección de mutaciones en los sitios de restricción reconocibles por las endonucleasas (*EcoRI* y *MseI*, en el presente trabajo) en el genoma entre las especies y variedades ensayadas. No se encontraron secuencias internas propias a alguna variedad en los fragmentos AFLP polimórficos evaluados. De aquí el bajo porcentaje obtenido de SCARs generados a partir de bandas AFLP con polimorfismo a nivel de variedad. Fueron utilizados geles de poliacrilamida preparados desde el 2005 para la recuperación de sus fragmentos AFLP.

ABSTRACT

The characterization of a specific sequence at a given genotype which is identified in a profile of AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) or that occurs only in some species or plant variety is regarded as a potential marker that can be used in plant identification. In this regard, and convert a sequence characterized AFLP marker in a specific sequence SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) can develop a strategy for the evaluation of each polymorphic AFLP loci individually in the genome of each variety.

In this study we examined the potential formation of SCAR from 6 specific AFLP bands from 4 varieties (Azul, Sigüin, Moraleño and Chato) of the species tequilana Weber Agave. Our results suggest 2 fragments: the G5140 and G299-Mñ251-Sg240, SCARs markers for the development of molecular markers in plant identification for that varieties of Agave.

From our results, it is possible to argue that the use of AFLP technique as a method of differential genomic analysis are mostly limited to the detection of mutations at sites recognized by restriction endonucleases (*EcoRI* and *MseI*, used in this work) in the genome between species and varieties tested. There were no internal sequences specific to a variety of polymorphic AFLP fragments tested. Hence the low percentage obtained from SCARs generated from AFLP bands with polymorphism at the level of variety. Polyacrylamide gels were used prepared since 2005 for the recovery of AFLP fragments.

CAPÍTULO I. “AGAVE COMO MODELO DE ESTUDIO MOLECULAR PARA OBTENCIÓN DE MARCADORES TIPO SCAR”

I. ANTECEDENTES

1.1 MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares se basan en el polimorfismo que naturalmente se presenta en las secuencias de ADN de los diferentes organismos, tales como inserción de pares de bases, sustitución de pares de bases y deleciones de pares de bases. Un marcador molecular es definido como un segmento particular de ADN. Representativo de diferencias a nivel del genoma y que puede ó no, estar relacionado con la expresión fenotípica de algún rasgo específico (Agarwal *et al.*, 2008). Los marcadores moleculares ofrecen numerosas ventajas sobre otros marcadores como los bioquímicos y/o morfológicos, en especial por que al estar basados en la molécula de ADN son más estables y detectables independientemente del estado de desarrollo y del crecimiento del organismo. Además, no son afectados por el ambiente ni por los efectos pleiotrópicos en los cuales un mismo gen no alelo está relacionado con varias características fenotípicas; tampoco son afectados por efectos epistáticos los cuales son característicos en genes cuya expresión impide la manifestación de otro gen no alelo (Agarwal *et al.*, 2008).

Un marcador molecular se denomina monomórfico, cuando este es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en su tamaño (medido como longitud en pares de bases), en su actividad enzimática (isoenzimas), en su estructura ó en sus sitios de restricción, se dice que es polimórfico (Hernández *et al.*, 2002).

Existen diferentes tipos de marcadores moleculares, algunos utilizan técnicas de hibridación como son los marcadores RFLP (*polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción*), otros utilizan la tecnología de la PCR (*Reacción en Cadena de la Polimerasa*) desarrollada por Mullis y Faloona (1987). Ésta última herramienta molecular ha permitido desarrollar técnicas de marcadores moleculares de una manera más práctica

y altamente específica como son los marcadores RAPD (*ADN polimórfico amplificado al azar*) y los marcadores AFLP (*polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados*) entre otros (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

1.2 TÉCNICAS DE MARCADORES MOLECULARES

1.2.1. POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

En esta técnica, el polimorfismo en el ADN es detectado mediante *Southern blot*, por la hibridación de una sonda marcada con el ADN digerido por endonucleasas de restricción, resultando en un perfil diferencial de fragmentos de ADN (Botstein *et al.*, 1980).

Los marcadores RFLP son de un alto grado de polimorfismo, una herencia codominante y una alta reproducibilidad; sin embargo, la técnica es laboriosa, además de que requiere una gran cantidad de ADN genómico de alta calidad y requiere de información previa de la secuencia para la generación de la sonda (Agarwal *et al.*, 2008).

1.2.2. ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR (RAPD)

En esta técnica el polimorfismo del ADN es producido por los cambios en secuencia entre los sitios de alineamiento de los oligonucleótidos en el genoma de dos organismos. Esta técnica utiliza iniciadores cortos de secuencia al azar, por lo que no requiere del conocimiento previo de la secuencia del genoma (Williams *et al.*, 1991). El perfil es dependiente de las condiciones de reacción y puede fácilmente variar entre laboratorios. Generalmente, esta técnica sólo permite el desarrollo de marcadores dominantes, ya que el perfil resultante no distingue entre individuos heterocigos y homocigos (Bardakci *et al.*, 2001).

1.2.3. POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

La técnica de AFLP está basada en la amplificación selectiva por PCR de fragmentos de restricción de una subpoblación del ADN genómico digerido. La técnica involucra tres pasos: la restricción del ADN genómico con una posterior ligación de adaptadores oligonucleotídicos a los fragmentos obtenidos, la amplificación selectiva de un conjunto de fragmentos de restricción y el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida de los fragmentos amplificados (Vos *et al.*, 1995).

La técnica de AFLP genera perfiles de cualquier ADN, sin necesidad del conocimiento previo de la secuencia de su genoma y puede ser utilizada para diferenciar entre individuos estrechamente relacionados a nivel sub-especie ó variedad (Althoff *et al.*, 2007).

1.2.4. AMPLIFICACION DE REGIONES DE SECUENCIA CARACTERIZADA (SCAR)

Los marcadores SCAR (*Amplificación de Regiones de Secuencia Caracterizada*, por sus siglas en inglés) son marcadores basados en PCR y se fundamentan en la amplificación de fragmentos de ADN genómico de un loci definido genéticamente mediante el diseño de iniciadores de secuencia específica (Parán y Michelmore, 1993). Estos autores identificaron un locus específico a partir de la utilización de técnicas de marcadores moleculares como: RAPD, AFLP, RFLP, entre otras; las cuales generan un perfil diferencial genómico (Agarwal *et al.*, 2008).

La generación de los marcadores tipo SCAR involucra la clonación y secuenciación de fragmentos de ADN aislados a partir de técnicas que desdoblan un perfil diferencial genómico, para los cuales son diseñados iniciadores específicos (Agarwal *et al.*, 2008). Tales iniciadores diseñados para una secuencia polimórfica permitirán la identificación de nuevos locus en el genoma de la especie de donde originalmente fueron aislados; de ésta

manera es posible encontrar otros alelos que varían en tamaño debido a inserciones y deleciones (Noguera *et al.*, 2005; Yuste-Lisbona *et al.*, 2011). Esta característica también permite obtener marcadores codominantes a partir de marcadores AFLP que en su mayoría son marcadores dominantes (Wong *et al.*, 2001; Negi *et al.*, 2000; Noguera *et al.*, 2005). Sin embargo, no siempre es así; Parán y Michelmore en 1993 reportaron que algunos marcadores SCAR se pueden mantener como marcadores dominantes y solo algunos resultaron en marcadores codominantes durante su proceso de validación. Se considera que los marcadores SCAR codominantes son informativos en la generación de mapas de ligamiento genético para la identificación de híbridos en la progenie que resulta de un cruce interespecífico.

Las aplicaciones de los marcadores SCAR varían de acuerdo al interés del estudio y sus usos incluyen desde un análisis de genética de poblaciones (Hernández *et al.*, 1999; Hussein *et al.*, 2003); hasta la identificación de genes específicos (Zhang & Stommel, 2001; Noguera *et al.*, 2005). La metodología de los marcadores SCAR fue originalmente empleada en la elaboración de mapas de ligamiento genético en variedades de lechuga (*Latuca sativa*), para la identificación de individuos resistentes al hongo mildú (Downy mildew), donde los marcadores SCAR fueron reportados originalmente a partir de fragmentos polimórficos detectados en un perfil diferencial RAPD y fueron utilizados para diferenciar entre líneas isogenéticas resultantes de un cruce interespecífico entre una variedad dominante y otra variedad recesiva (Parán y Michelmore, 1993).

El Cuadro 1 muestra algunas de las aplicaciones de los marcadores SCAR encontrados en la literatura clasificados en tres grupos: a) Identificación de individuos con resistencia a patógenos, b) Identificación de genes que están relacionadas con su elevada calidad y c) Identificación de germoplasma a nivel especie, variedad ó cultivar. Dentro del primer grupo encontramos SCAR utilizados como marcadores de ligamiento a genes de resistencia ante patógenos en diferentes especies vegetales: *Nicotiana tabacum* L. (Julio *et al.*, 2006), *Zea mays* (Agrama *et al.*, 2002), *Malus floribunda* (Xu *et al.*, 2001) y *Vigna unguiculata* L. (Boukar *et al.*, 2004).

Un segundo grupo es el uso de los marcadores SCAR en la identificación de individuos relacionados con una elevada calidad del cultivo: como es la presencia de un metabolito medicinal en *Carthamus tinctorius* (Zhang *et al.*, 2009), un alto contenido nutrimental en *Brassica juncea* (Negi *et al.*, 2000), autocompatibilidad en melón *Cucumis melo* L. (Noguera *et al.*, 2005), alto contenido de fibra ó presencia de β -carotenos (Guo *et al.*, 2003; Zhang y Stommel 2001), entre otros.

En cuanto al tercer grupo tenemos aquellos marcadores SCAR cuya aplicación es la identificación de germoplasma entre diferentes variedades vegetales: *Olea europea* L., *C. lanatus* Thumb y *O. sativa* (Busconi *et al.*, 2006; Che *et al.*, 2003 y Shirasawa *et al.*, 2004; respectivamente), entre diferentes cultivares (Mariniello *et al.*, 2002; Vidal *et al.*, 2000); ó entre especies vegetales (Devaiah *et al.*, 2008; Qian *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2005).

Para el desarrollo de marcadores SCAR previamente se requiere de una técnica de marcadores moleculares que nos permitan visualizar un perfil diferencial genómico, el cual puede ser de tipo RAPD ó AFLP, entre otros. Una desventaja de la técnica de marcadores RAPD para el desarrollo de marcadores SCAR, es que esta técnica sólo genera en promedio de 5-10 bandas por cada amplificación al azar, mientras que la técnica de marcadores AFLP podría generar de 50-100 bandas por cada reacción, lo cual aumenta la posibilidad de encontrar fragmentos polimórficos (específicos) a un determinado genotipo (Vidal *et al.*, 2000; Lamboy, 1994; Vos *et al.*, 1995). Otra ventaja del análisis AFLP en comparación con RAPD, es la mayor reproducibilidad de los polimorfismos detectados debido a que los oligos utilizados en RAPD tienen una secuencia al azar y existen reportes de una baja reproducibilidad en laboratorio (He *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1997). Finalmente, el análisis AFLP ha sido reportado como una metodología confiable, con una alta eficiencia en la detección de polimorfismo, y se ha empleado en análisis genético para identificación de cultivos en especies de *Citrullus lanatus* (Che *et al.*, 2003), y *Oryza sativa* (Shirasawa *et al.*, 2004) por mencionar algunos. En resumen, la metodología de AFLP es un método de análisis genómico que ofrece muchas características que la hacen una técnica atractiva para generar marcadores moleculares tipo SCAR.

Cuadro1. Aplicaciones de los Marcadores SCAR.

TÉCNICA	ESPECIE VEGETAL	APLICACIÓN	REFERENCIA
A) IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS CON RESISTENCIA A PATÓGENOS			
AFLP	Maíz, (<i>Zea mays</i>)	Resistencia a <i>Peronosclerospora sorghi</i>	(Agrama <i>et al.</i> , 2002)
RAPD	Canola, (<i>Brassica napus</i> L.)	Identificación del Gen enano Bzh.	(Barret <i>et al.</i> , 1998)
AFLP	Alubia, (<i>Vigna unguiculata</i> L.)	Resistencia a la hierba parasítica <i>Striga gesnerioides</i> .	(Boukar <i>et al.</i> , 2004)
RAPD	Soya, (<i>Glycine max</i> L.)	Resistencia hongo <i>Cercospora sojina</i> H.	(Filho <i>et al.</i> , 2002)
AFLP	Tabaco, (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	Resistencia a tres enfermedades del cultivo.	(Julio <i>et al.</i> , 2006)
AFLP	Manzana, (<i>Malus floribunda</i>)	Resistencia al hongo <i>Venturia inaequalis</i> .	(Xu <i>et al.</i> , 2001)
B) IDENTIFICACIÓN DE GENES QUE ESTÁN RELACIONADAS CON SU ELEVADA CALIDAD			
SSR RAPD	Algodón, (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	Selección Asistida por Marcadores de cultivares con alta fibra.	(Guo <i>et al.</i> , 2003)
AFLP	<i>Brassica juncea</i>	Contenido proteico y de aceite elevado.	(Negi <i>et al.</i> , 2000)
AFLP	Melón, (<i>Cucumis melo</i> L.)	Característica sexual de autocompatibilidad gene andromonoecious	(Noguera <i>et al.</i> , 2005)
AFLP	Flor, (<i>Carthamus tinctorius</i>)	Contenido de metabolito Hydroxysafflor yellow A	(Zhang <i>et al.</i> , 2009)
RAPD	Tomate, (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	Identificación cultivares con alto contenido β -caroteno, gen <i>Beta</i> .	(Zhang & Stommel, 2001)

C) IDENTIFICACIÓN DE GERMOPLASMA A NIVEL ESPECIE, CULTIVAR Ó VARIEDAD			
RAPD	Olivo, (<i>Olea europea</i> L.)	Identificación de cultivares	(Bautista <i>et al.</i> , 2002)
RAPD, AFLP, SAMPL	Olivo, (<i>Olea europea</i> L.)	Caracterización de germoplasma entre cultivares	(Busconi <i>et al.</i> , 2006)
AFLP	Sandía, (<i>Citrullus lanatus</i>)	Identificación de variedad Citroide	(Che <i>et al.</i> , 2003)
RAPD	Bamboo, (<i>Bambusa spp.</i>)	Identificación de especies <i>Bambusa</i> <i>balcooa</i> y <i>B. tulda</i> .	(Das <i>et al.</i> , 2005)
RAPD	Planta Medicinal India, (<i>Pueraria tuberosa.</i>)	Autenticación vegetal.	(Devaiah <i>et al.</i> , 2008)
RAPD	Trigo, (<i>Triticum aestivum.</i>)	Selección Asistida por Marcadores para trigo (<i>Hordeum chilense</i>).	(Hernández <i>et al.</i> , 1999)
RAPD	Pera, (<i>Pyrus spp.</i>)	Diferenciación entre <i>Pyrus pyrifolia</i> Pera Japonesa) y <i>P. communis</i> (Pera europea).	(Lee <i>et al.</i> , 2004)
RAPD	Durazno, (<i>Prunus armeniaca</i>)	Identificación de cultivares de <i>Prunus armeniaca</i>	(Mariniello <i>et al.</i> , 2002)
ISSR	Árbol ornamental chino, (<i>Sinocalycanthus chinensis</i>)	Autenticación a nivel especie de <i>Sinocalycanthus chinensis</i> .	(Qian <i>et al.</i> , 2006)
AFLP	Arroz, (<i>Oryza sativa</i>)	Identificación varietal	(Shirasawa <i>et al.</i> , 2004)
RAPD	Uva, (<i>Vitis vinifera</i> L.)	Identificación de cultivares de uva.	(Vidal <i>et al.</i> , 2000)

(Continuación Cuadro 1)

1.3 DESARROLLO DE MARCADORES MOLECULARES PARA IDENTIFICACIÓN VEGETAL.

Para la identificación de características agronómicas relacionadas con una mejor calidad en la amplia diversidad de cultivos y variedades existentes, la generación de herramientas

de identificación vegetal sería útil en los programas de cultivos (Phillips *et al.*, 1995; Tanksley *et al.*, 1983).

El desarrollo de estos sistemas de identificación utiliza marcadores morfológicos y marcadores moleculares (Rallo *et al.*, 2002; Azofeifa-Delgado, 2006). Estos últimos basados en la presencia de secuencias de ADN, tomaron una fuerte influencia en la década pasada para aplicaciones de identificación vegetal. Los marcadores SCAR han sido utilizados para la autenticación de especies como *Pueraria tuberosa*, la cual es confundida con otras entidades botánicas como son *Ipomoea mauritiana*, *Adenia hondala* y *Cycas circinalis* (Devaiah & Venkatasubramanian, 2008). Otro ejemplo de ésta aplicación es con la especie vegetal *Bohemeria nivea* la cual pertenecen sus variedades: Nivea y Tenacissima, en ambas variedades el análisis RAPD de cada variedad permitió el desarrollo de un marcador SCAR específico a la variedad Nivea, junto con marcadores de tipo SNP y CAPS que discriminan entre ambas variedades (Li *et al.*, 2010). Así como en los ejemplos anteriores, la técnica RAPD ha sido ampliamente utilizada para generar marcadores SCAR específicos a cultivares en especies vegetales maderables como el bamboo, la pera y el olivo (Das *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004; Busconi *et al.*, 2006; respectivamente).

Los marcadores SCAR pueden aplicarse para identificación vegetal tanto a nivel de variedad como a nivel de especie. En la literatura encontramos dos ejemplos de marcadores SCAR que discriminan a nivel especie y a continuación hablaremos de cada uno de ellos. Das *et al.* (2005) reporta que a partir de 18 especies de Bamboo seleccionaron 80 individuos por cada especie, dentro de los cuales cada cinco individuos se ubicaban en una distribución geográfica diferente. Das y colaboradores lograron desarrollar un marcador SCAR específico para la especie *B. tulda* de 609 pb y otro marcador específico a la especie *B. balcooa* de 836 pb. En otro reporte de marcadores SCAR para la autenticación de la especie *Sinocalycantus chinensis* se trabajó a partir de un fragmento de 748 pb, identificado de un perfil de secuencias inter microsatelitales ISSR (inter-simple sequence repeats). En ésta especie vegetal era importante el desarrollo de

un marcador SCAR dado que sus características morfológicas son similares a otras especies como *Chimonantus* y *Calycanthus floridus* (Ye *et al.*, 2006).

Con respecto a la utilización de los marcadores SCAR para la identificación vegetal a nivel de variedad, se ha reportado en la literatura el desarrollo de seis marcadores SCAR codominantes, entre los variedades Nipponbare y Koshihikari, y ocho marcadores SCAR dominantes, de *Oryza sativa*, todos ellos desarrollados a partir de fragmentos polimórficos de AFLP (Shirasawa *et al.*, 2004). Adicionalmente, los SCAR también han sido utilizados para la identificación entre variedades de la especie *Citrullus lanatus*, donde se caracterizó un fragmento AFLP de 250 pb útil para la identificación de la variedad Citroides, una variedad silvestre de importancia agronómica por su resistencia a *Fusarium wilt*. El polimorfismo específico a esta variedad fue conservado en uno de los marcadores SCAR desarrollados, ésto permitió la identificación de dicha variedad silvestre Citroides de la variedad silvestre denominada Egusi y de otros 28 cultivares comerciales diferentes pertenecientes a la variedad Lanatus (Che *et al.*, 2003).

Todo lo mencionado anteriormente muestra la versatilidad de los marcadores moleculares para la identificación de variedades vegetales. Sin embargo, los marcadores SCAR con propósitos de identificación vegetal a nivel varietal no han sido probados en especies de *Agave*. La especie *Agave tequilana* Weber es una especie de importancia económica y la identificación de sus variedades mediante un ensayo práctico, confiable y sencillo como pudiera ser un simple test por PCR, podría ser posible mediante el estudio de esta clase de marcadores de secuencia específica denominado SCAR en especies de *Agave*.

1.4 *Agave*

Los Agaves pertenecen al género con mayor diversidad de la familia *Agavaceae*, la cual posee más de 200 especies, de las cuales 150 se encuentran en México (Good-Ávila *et al.*, 2006). Las Agaváceas son una familia distribuida a lo largo del Continente Americano, con una extensión que ocupa desde el sur de Norteamérica hasta el norte de Sudamérica. México tiene el mayor nivel de riqueza en diversidad de esta familia. Las especies de

Agave crecen en diversos ecosistemas aunque preferentemente se encuentra en zonas áridas y semiáridas como la península de Baja California, Sonora, el Altiplano Mexicano: Chihuahua, Guanajuato, Querétaro, la Planicie Tamaulipeca y el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (García-Mendoza, 2007).

Los Agaves son plantas xerófitas, que crecen en condiciones de alta sequía y temperaturas extremas, poseen hojas suculentas y un sistema de raíces superficial, así el agua almacenada durante las breves temporadas de lluvias les permiten mantenerse durante los largos periodos de sequía (Pimienta *et al.*, 2005). Las especies de *Agave* con mayor importancia económica en México incluyen a: *A. americana*, *A. fourcroydes*, *A. lechuguilla* y *A. tequilana* (García-Mendoza, 2007), entre otras.

Los Agaves son plantas semélparas ya que una vez que florecen, mueren (Colunga-García y Zizumbo-Villareal, 2007). Adicionalmente, estas plantas son muy complejas en cuanto a sus mecanismos de reproducción, los cuales pueden ser sexuales por medio de semillas, ó asexuales por medio de hijuelos ó bulbillos (Valenzuela-Zapata, 2007).

La variabilidad genética del *Agave* se ha reducido a causa de los sistemas de reproducción utilizados en condiciones comerciales (Gil-Vega *et al.*, 2001; Colunga-García & Zizumbo-Villareal, 2007). Para el caso de *A. fourcroydes*, mediante estudios moleculares realizados a cultivares de henequén propagados clonalmente a través de rizomas se demostró diferencias en el perfil de fragmentos AFLP, indicando una diferencia genética introducida durante la propagación clonal en dicha especie (Infante *et al.*, 2006).

La variabilidad genética asexual (clonal) también ha sido reportada en la especie *A. tequilana* Weber a partir de análisis en perfiles de marcadores AFLP (Gil-Vega *et al.*, 2006). Adicionalmente, en este reporte se estudió la diversidad entre diferentes variedades pertenecientes a una misma especie y se logró demostrar la capacidad discriminatoria de tal técnica para identificar organismos estrechamente relacionados de *Agave* (Gil-Vega *et al.*, 2006). Sin embargo, utilizando el análisis RAPD no se logró demostrar variabilidad genética (Gil-Vega *et al.* 2001). La diferencia de tales hallazgos

puede ser explicada por el hecho de que los tipos de marcadores RAPD y AFLP utilizados, exploraron regiones diferentes del genoma en *A. tequilana* Weber (Infante *et al.*, 2006).

1.5 *Agave tequilana* Weber variedad Azul

El *A. tequilana* Weber variedad Azul es una especie ampliamente cultivada en campo en los estados de Jalisco, Nayarit, Guanajuato, Tamaulipas y Michoacán, ya que es fuente de carbohidratos como la inulina y de metabolitos secundarios que son esenciales para la fermentación del tequila, una bebida de alta demanda internacional, convirtiéndola en una especie protegida y valiosa económicamente (García-Mendoza, 1995; Diario Oficial, 2006; Colunga-García & Zizumbo-Villareal, 2007).

La reproducción de la variedad Azul del *Agave tequilana* Weber se puede dar por semilla o bulbillo; sin embargo, en campos comerciales el método que se emplea consiste en trasplantar los hijuelos que brotan de la raíz de la planta madre a una nueva región productora (Valenzuela *et al.*, 2006). El *Agave* Azul florece entre los 7-9 años en condiciones de producción, sin embargo la inflorescencia es cortada cuando alcanza 1m de altura, seis meses después la piña madura es cosechada para su uso en la producción del tequila (Gil-Vega *et al.*, 2001).

La variedad Azul del *Agave tequilana* Weber se ha reportado más cercanamente relacionada con las variedades "Sigüin", "Manso", "Azul Listado" y "Moraleño", pertenecientes a la especie *A. tequilana* Weber, en comparación con las variedades "Bermejo", "Chato", "Hoja Delgada" y "Pata de Mula" también pertenecientes a la misma especie (Gil-Vega *et al.*, 2006).

A excepción de las variedades "Azul listado" y "Manso", en la especie *A. tequilana* Weber, las otras variedades son fenotípicamente similares y es difícil de distinguirlas en campo, especialmente cuando no existe estructura floral (Gil-Vega *et al.*, 2006). Las variedades fenotípicamente similares a la variedad Azul frecuentemente son extraídas en campos

tequileros tan pronto como se identifican debido a que regulaciones federales prohíben su uso para la elaboración del tequila (Gil-Vega *et al.*, 2001).

La variedad "Sigüin" es considerada como la variedad de *A. tequilana* Weber con mayor grado de similitud morfológica a la variedad Azul (Gentry, 1982; Valenzuela, 1997). Esas similitudes morfológicas dificultan su identificación en campo, haciendo factible el desarrollo de marcadores que permitan su identificación. La variedad "Sigüin" de acuerdo a un análisis de AFLP presentó un 6.2% de fragmentos polimórficos con la variedad Azul, así como una distancia genética de 0.06 con dicha variedad, en comparación con otras variedades cuyos valores estuvieron entre 12.3% a 15.4% de fragmentos polimórficos diferentes de la variedad Azul (Gil-Vega *et al.*, 2001).

1.6 DENOMINACIÓN DE ORIGEN DEL TEQUILA Y LA VARIEDAD AZUL DE LA ESPECIE *A. tequilana* Weber

En la actualidad existen Normas Oficiales Mexicanas como la NOM-006-SCFI-2005, la cual establece que el *Agave* que se utilice como materia prima para la elaboración de Tequila debe ser de la especie *Agave tequilana* Weber y ser variedad Azul, haber sido cultivado en el territorio comprendido en la declaración de origen, cumpliendo con las especificaciones técnicas y requisitos jurídicos para proteger el origen del "Tequila" de conformidad con la Declaración General de Protección a la Denominación de Origen de Tequila (DOT) vigente, la Ley de la Propiedad Industrial, la Ley Federal de Protección al Consumidor y demás disposiciones legales relacionadas (Diario Oficial, 2006).

La Denominación de Origen del Tequila, incluye a la región de Tequila, situada cerca de la ciudad de Guadalajara en el estado de Jalisco, junto con algunas regiones de los estados de Nayarit, Guanajuato, Tamaulipas y Michoacán (Valenzuela-Zapata, 2007).

Mediante la generación de herramientas biotecnológicas que permitan un ensayo práctico y confiable, se podría contribuir en la identificación de germoplasma protegido por la legislación, como es la variedad Azul de la especie *A. tequilana* Weber, mediante el

desarrollo de marcadores que permitan la identificación de sus diferentes variedades como son: Moraleño, Sigüin y Chato, las cuales son frecuentemente confundidas con la variedad Azul.

Con el desarrollo de los marcadores SCAR donde una secuencia polimórfica es caracterizada para diseñar iniciadores específicos obtendríamos una amplificación reproducible de un loci simple y analizaríamos su presencia en otras regiones del ADN genómico entre diferentes genotipos de *Agave*. Lo anterior contribuiría al desarrollo de marcadores basados en PCR, los cuales son más prácticos para su uso a escala al analizar un gran número de muestras de *Agave* en identificación varietal en comparación con el uso de técnicas de marcadores moleculares de perfil diferencial tal como son los AFLPs los cuales generan un patrón genético complejo multilocus.

II. JUSTIFICACIÓN

Existe un alto poder de detección de polimorfismo en la técnica AFLP, aún entre especies y variedades del género *Agave*, sin embargo para fines de uso recurrente en la selección e identificación de variedades, resulta un procedimiento muy laborioso y altamente costoso. En la actualidad, a través del empleo de esta técnica se han obtenido diversos marcadores moleculares con los que es posible aplicar la tecnología de los SCAR, los cuales constituyen un procedimiento mucho más práctico que puede ser aplicado en la identificación de especies y variedades de *Agave* para una selección rápida.

Así, con base en todo lo anterior, convertir un fragmento de AFLP a un marcador de secuencia caracterizada de tipo SCAR mediante el diseño de iniciadores específicos podría ser una metodología viable para la identificación de variedades de *Agave*.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar marcadores tipo SCAR para la identificación de variedades dentro de la especie *Agave tequilana* Weber, a partir de fragmentos de AFLP.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar perfiles de AFLP y seleccionar bandas polimórficas de *A. tequilana* Weber a nivel variedad.
- Extraer, recuperar y secuenciar los fragmentos AFLP específicos para alguna variedad de *A. tequilana* Weber.
- Diseñar iniciadores específicos para la región SCAR caracterizada, que permita amplificar los fragmentos aislados específicos de la variedad de interés.
- Validar los iniciadores específicos desarrollados con una reacción de PCR utilizando como templado ADN genómico de cada variedad.

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Selección de Marcadores AFLP

Análisis de polimorfismos en perfiles de AFLP de *Agave*.



Identificación de una banda específica a una especie o variedad de *Agave*.

Desarrollo de Marcadores SCAR



Aislamiento de Fragmentos AFLP de la poliacrilamida.



Clonación de Fragmentos de AFLP reamplificados.



Secuenciación de Fragmentos de AFLP clonados.



Diseño de Primers Específicos a la Secuencia Caracterizada.

Validación de Marcadores SCAR



Validación como marcadores SCAR

V. REFERENCIAS

- AGARWAL, M., N. SHRIVASTAVA Y H. PADH (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 27:617–631.
- AGRAMA, H.A., S.F. HOUSSIN Y M.A. TAREK (2002). Cloning of AFLP markers linked to resistance to *Peronosclerospora sorghi* en maíz. *Mol Genet Genomics.* 267:814-819.
- ALTHOFF, D.M., M.A. GITZENDANNER, K.A. SEGRAVES (2007). The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. *Syst Biol.* 56:477–484.
- AZOFEIFA-DELGADO, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agron Mesoam.* 17: 221-242.
- BARRET, P., R. DELOURME, N. FOISSET, M. RENARD (1998). Development of a SCAR (sequence characterised amplified region) marker for molecular tagging of the dwarf BREIZH (Bzh) gene in *Brassica napus* L.. *Theor Appl Genet.* 97: 828-833.
- BAUTISTA, R., R. CRESPILO, F.M. CANOVAS Y M. GONZALO- CLAROS (2002). Identification of olive-tree cultivars with SCAR markers. *Euphytica.* 129:33–41.
- BARDAKCI, F. (2001). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turk J Biol.* 25:185–196.
- BOTSTEIN, D., R.L. WHITE, M. SKOLNICK, R.W. DAVIS (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32:314–333.
- BOUKAR, O., L.KONG, B. SINGH, L. MURDOCK Y H. OHM (2004). AFLP and AFLP-derived SCAR markers associated with *Striga gesnerioides* resistance in cowpea. *Crop Sci.* 44:1259-1264.

- BUSCONI, M., L. SEBASTIANI Y C. FOGHER (2006). Development of SCAR markers for germoplasma characterization in olive tree (*Olea europea* L.). *Mol Breeding*. 17:59-68.
- CHE, K.P., Y. XU, C.Y. LLANG, G.Y. GONG, M.L. WENG, H.Y. ZHANG, D.M. JIN Y B. WANG (2003). AFLP fingerprint and SCAR marker of watermelon core collection. *Acta Bot Sinica*. 45:731-735.
- COLUNGA-GARCÍA, M.P. Y ZIZUMBO-VILLARREAL, D. (2007). Tequila and other *Agave* spirits from west-central Mexico: current germplasm diversity, conservation and origin. *Biodivers Conserv*. 16:1653–1667.
- DAS, M.,S. BHATTACHARYA YA. PAL (2005). Generation and characterization of SCAR by cloning and sequencing of RAPD products: a strategy for species-specific marker development in bamboo. *Ann Bot*. 95:835-841.
- DEVAIAH, K.M. Y VENKATASUBRAMANIAN, P. (2008). Development of SCAR marker for authentication of *Pueraria tuberosa* (Roxb. Ex. Willd.) DC. *Curr Sci*.94:1305-1309.
- DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN (2006) Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005. Bebidas Alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Publicado en el Diario Oficial de la Federación, el 6 de enero del 2006.
- FERREIRA, M.,Y GRATTAPAGLIA, D. (1998). Libro: *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. Ed. Embrapa. Brasília-Brasil. 221pp.
- FILHO, S.M., C. SIGUEYUKI-SEDIYAMA, M. ALVES-MOREIRA Y E. GONZALES DE BARROS (2002). RAPD and SCAR markers linked to resistance to frog-eye leaf spot in soybean. *Genet Mol Biol*. 25: 317-321.

- GARCIA-MENDOZA, A.J. (1995). Riqueza y endemismo de la familia Agavaceae en México. En: E. Linares, P. Dávila, F. Chiang, R. Bye y T. Elias [Edit]. Conservación de plantas en peligro de extincion. Diferentes enfoques. UNAM, México, 51-75.
- GARCIA-MENDOZA, A.J. (2007). Los agaves de México. Revista Ciencias- UNAM, ISSN 018763-76. México. 14-23 pp.
- GENTRY, H.S., (1982). *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. Tucson, AZ.
- GIL-VEGA, K., M. GONZÁLEZ , O. MARTÍNEZ, J. SIMPSON Y G. VANDEMARK (2001). Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica*. 119: 335–341.
- GIL-VEGA, K., C. DÍAZ, A. NAVA-CEDILLO, J. SIMPSON (2006). AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Sci*. 170:904–909.
- GOOD-AVILA, S.V., V. SOUZA, B. GAUT, Y L. EGUIARTE (2006). Timing and rate of speciation in *Agave* (*Agavaceae*). *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:9124–9129.
- GUO, WANGZHEN, T. ZHANG, X. SHEN, J.Z. YU, Y R.J. KOHEL (2003). Development of SCAR Marker Linked to a Major QTL for High Fiber Strength and Its Usage in Molecular-Marker Assisted Selection in Upland Cotton. *Crop Sci*. 43:2252–2256.
- HE, Q., M.K. VILJANEN Y J. MERTSOLA (1994). Effects of thermocyclers and primers on the reproducibility of banding patterns in randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Mol. Cell. Probes* 8:155–160.
- HERNÁNDEZ, P., A. MARTIN YG. DORADO (1999). Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products: a practical tool for the introgression and marker-assisted selection of wheat. *Mol Breeding*. 5: 245–253.
- HERNANDEZ, M.T.(2002). *Marcadores moleculares, nuevos horizontes en la genética y selección de las plantas*. Editorial La Habana.456pp.

- HUSSEIN, E.H., S.M.M. ABD-ALLA, N.A. AWAD Y M.S. HUSSEIN (2003). Assessment of genetic variability and genotyping of some *Citrus* accessions using molecular markers. Arab J. Biotech.7:23-36.
- INFANTE, D., S. MOLINA, J. DEMEY Y E. GÁMEZ (2006). Asexual Genetic Variability in *Agavaceae* Determined with Inverse Sequence-Tagged Repeat and Amplification Fragment Length Polymorphism Analysis. Plant Mol Biol Rep. 24: 205–217.
- JONES, C.J., K.J. EDWARDS, S. CASTAGLIONE, M.O. WINFIELD, F. SALA, C. VAN DE WIEL, G. BREDEMEIJER, B. VOSMAN, M. MATTHES, A. DALY R. BRETTSCHEIDER, P. BETTINI, M. BUIATTI, E. MAESTRI, A. MALCEVSCHI, N. MARMIROLI, R. AERT, G. VOLCKAERT, J. RUEDA, R. LINACERO, A. VAZQUEZ, Y K. KARP (1997). A: Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Mol. Breeding. 3: 381–390.
- JULIO, E., J.L. VERRIER, F. DORLHAC DE BORNE (2006). Development of SCAR markers linked to three disease resistances based on AFLP within *Nicotiana tabacum* L. Theor Appl Genet. 112: 335–346.
- LAMBOY, W.F. (1994) Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: the effects of PCR artifacts. PCR Methods Appl. 4:31–37.
- LEE, P.G., C.H. LEE Y C.S KIM (2004). Molecular markers derived from RAPD, SCAR and the conserved 18S rDNA sequences for classification and identification in *Pyrus pyrifolia* and *P. communis*. Theor Appl Genet. 108:1487-1491.
- LI, CHUAN-I, C. SHU-JIAU, T. TENG-SOUNG, L. CHENG-YU, L. LAIN-TZE, C. CHING-MING (2010). Development and validation of molecular markers for characterization of *Boehmeria nivea* var. Nivea and var. Tenacissima. BMC Chin Med. 5:40.
- MARINIELLO, L., M.G. SOMMELLA, A. SORRENTINO, M. FORLANI Y R. PORTA (2002). Identification of *Prunus armeniaca* cultivars by RAPD and SCAR markers. Biotechnol Lett. 24: 749–755.

- MULLIS K.B., Y F.A. FALOONA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335–350.
- NEGI, M.S., M. DEVIC, M. DELSEN Y M. LAKSHMIKUMARAN (2000). Identification of AFLP fragments linked to seed coat color in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. *Theor Appl Genet.* 101:146-152.
- NOGUERA, F.J., J. CAPEL, J.I. ALVAREZ Y R. LOZANO (2005). Development and mapping of codominant SCAR marker linked to the *andomoecious* gene of melon. *Theor Appl Genet.* 110:714-720.
- PARAN, I., & MICHELMORE, R.W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet.* 85: 985-993.
- PIMIENTA, E., J. ZAÑUDO, P. NOBEL Y GARCÍA-GALINDO (2005). Respuesta fisiológica a factores ambientales del agave azul (*Agave tequilana* Weber). *Scientia Cuba.* 7:85-97.
- PHILLIPS, W.,H. RODRÍGUEZ, P. FRITZ, (1995). Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico # 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 p.
- QIAN Y., Q. YING-XIONG, Q. YAN-QI, C. JIAN-XIN, Y. SHU-ZHEN, Z. MING-SHUI, F. CHENG-XIN (2006). Species-specific SCAR markers for authentication of *Sinocalycanthus chinensis*. *J Zhejiang Univ-Sci B.* 7: 868-872.
- RALLO, P.; BELAJ, A.; DE LA ROSA, R.; TRUJILLO, I. (2002). Marcadores moleculares. Córdoba, España. Disponible en: http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio_2000/almazara/almazara1.htm
- SHIRASAWA, K., S. KISHITANI Y T. NISHIO (2004). Conversion of AFLP markers to sequence-specific markers for closely related lines in rice by use of the rice genome sequence. *Mol Breeding.* 14:283-292.

- TANKSLEY, S. (1983). Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol Biol Rep.* 1:3-8.
- VALENZUELA, A.G., (1997). *El agave tequilero: su cultivo e industria.* 2nd. Ed. Monsanto Press, St. Louis.
- VALENZUELA, K., R. JUAREZ, A. CRUZ, V. OLALDE, M. VALVERDE YO. PAREDES(2006). Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol.* —*Plant.* 42: 336–340.
- VALENZUELA-ZAPATA, A.G. (2007). Las denominaciones de origen Tequila y Mezcal y la biodiversidad en el género *Agave*. Universidad de Guadalajara, Departamento de Salud Pública.
- VIDAL, J.R., P. DELAVault, M. COARER Y A. DEFONTAINE (2000). Design of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivar-specific SCAR primers for PCR fingerprinting. *Theor Appl Genet.* 101: 1194–1201.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER Y M. ZABEAU (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407–4414.
- WILLIAMS, J.G.K., A.R. KUBELIK, K.L. LIVAK, J.A. RAFALSKI, S.V. TINGEY (1991). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531–6535.
- WONG, A., M.R. FORBES Y M.L. SMITH (2001). Characterization of AFLP markers in damselflies: prevalence of codominant markers and implications for population genetic applications. *Genome.* 44: 677-684.
- XU, M., E. HUARACHA Y S. KORBAN (2001). Development of sequence-characterized amplified regions (SCAR) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple. *Genome.* 44: 63-70.

- YE, Q., Q. YING-XIONG, Q. YAN-QI, C. JIAN-XIN, Y. SHU-ZHEN, Z. MING-SHUI Y F. CHENG-XIN (2006). Species-Specific SCAR marker for authentication of *Sinocalycanthus chinensis*. J Zhejiang Univ-Sci B. 7: 868-872.
- YUSTE-LISBONA, F.J., C. CAPEL, M.L. GOMEZ-GUILLAMON, J. CAPEL, A.I. LÓPEZ-SESÉ, R. LOZANO (2011). Codominant PCR-based markers and candidate genes for powdery mildew resistance in melon (*Cucumis melo* L.). Theor Appl Genet. 122: 747–758.
- ZHANG, Z., M. GUO Y J. ZHANG (2009). Identification of AFLP fragments linked to hydroxysafflor yellow A in *Flos Carthami* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. Mol Breeding. 23: 229-237.
- ZHANG, Y., Y STOMMEL J. R. (2001). Development of SCAR and CAPS Markers Linked to the *Beta* Gene in Tomato. Crop Sci. 41: 1602–1608.

CAPÍTULO II. “AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN MARCADOR TIPO SCAR”

I. INTRODUCCIÓN

Los marcadores SCAR (*Regiones Amplificadas de Secuencia Caracterizada*, por sus siglas en inglés), son marcadores basados en PCR que se desarrollan a partir de la caracterización de una secuencia de interés obtenida de técnicas de marcadores moleculares como RAPD, AFLP, ISSR (Agarwal *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2006). Los marcadores SCAR por lo general presentan una banda única intensa que corresponde a un loci simple que es identificado por la amplificación directa del ADN genómico, utilizando iniciadores específicos desarrollados para la secuencia aislada. En ocasiones la secuencia caracterizada SCAR puede encontrarse en un alto número de copias y encontrarse alelos diferentes durante su validación. Los marcadores SCAR identifican secuencias genómicas dispersas dentro de la región amplificada. Es posible que se manifiesten en la resolución de los productos de amplificación, durante la validación de tales iniciadores específicos diseñados, bandas de tamaños diferentes como alelos alternativos de la secuencia caracterizada, los cuales pueden contener inserciones, deleciones ó sustituciones de pares de bases (Parán & Michelmore, 1993). Los SCAR son en su mayoría marcadores codominantes de gran utilidad para la identificación de individuos de cultivares homocigos dominantes y recesivos de los individuos heterocigos (Parán & Michelmore, 1993).

La metodología de SCAR ha sido ampliamente utilizada para la identificación de cultivares de importancia económica, tales como los frutales: durazno y pera; alimenticios como: olivo, canola, alubia, trigo y soya; entre cultivos de otros usos como: algodón, árboles ornamentales, bambú y plantas medicinales (Mariniello *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Bautista *et al.*, 2002; Barret *et al.*, 1998; Boukar *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 1999; Filho *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2005; Devaiah & Venkatasubramanian, 2008).

Existe una amplia variedad de técnicas moleculares como son RAPD, AFLP, ISSR hasta SAMPL (*Amplificación Selectiva de un Loci Microsatélite Polimórfico*, por sus siglas en inglés) para la generación de perfiles de bandas a partir del cual se pueden desarrollar marcadores SCAR (Shirasawa *et al.*, 2004; Basha & Sujatha, 2007; Busconi *et al.*, 2006).

Caracterizar una secuencia específica relacionada con algún rasgo de interés, ó con alguna variedad, es posible a partir de perfiles de AFLP (Lamboy, 1994; Vidal *et al.* 2000). Adicionalmente, la técnica de AFLP ha sido exitosamente aplicada en especies de *Agave* (Infante *et al.*, 2003; González *et al.*, 2003; Demey *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2006; Gil-Vega *et al.*, 2006) por lo cual se abre la posibilidad de desarrollar marcadores SCAR con propósitos de identificación a nivel varietal en *Agave*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se utilizaron perfiles de AFLP de *Agave* elaborados en el laboratorio de Marcadores Moleculares y Genómica Funcional del CICY. Se eligieron los siguientes perfiles etiquetados como Gel 1, Gel 2, Gel 4, Gel 5 y Gel 6, elaborados por Alejandra Barraza Morales en el 2005, Informe Final Proyecto Tequila Herradura (Confidencial) en el cual para su elaboración se utilizó la metodología de AFLP (Vos *et al.*, 1995) y el método de tinción con nitrato de plata tomado de Bassam *et al.*, 1991 con mínimas adaptaciones. En tales geles el material vegetal fue tomado para el caso de las diferentes variedades de la especie *A. tequilana* de plantaciones comerciales del estado de Jalisco, y para las otras especies de *Agave* el material vegetal fue tomado del jardín botánico del CICY.

Los 5 geles fueron utilizados para la identificación de polimorfismos a nivel varietal con el objetivo de aislar y caracterizar fragmentos AFLP específicos a alguna especie ó variedad de *Agave* en el presente trabajo. Las especies de *Agave* utilizadas para la evaluación de polimorfismos con la técnica de AFLP en estos perfiles están dispuestos del carril izquierdo al carril derecho de la siguiente manera: *A. tequilana* var. Azul (T), *A. angustifolia* (A), *A. sisalana* (S), *A. marginata* (M), *A. fourcroydes* (F), *A. tequilana* var. Sigüin (10 individuos Sg), *A. tequilana* var. Moraleño (10 individuos Mñ), *A. tequilana* var.

Chato (10 individuos Ch). El marcador molecular utilizado para cada perfil de AFLP fué el DNA Ladder (Invitrogen) de 100 pb.

2.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AFLP

Para la identificación de los marcadores AFLP en los cinco perfiles seleccionados, a cada banda específica se le asignó una clave (por ejemplo **G299-Sg240**): identificando primero el número del Gel del cual fueron aislados (**G2**) el cual es de un solo dígito precedido de una G en todos los casos, el número asignado a cada banda de AFLP durante su análisis (**#99**) de dos a tres dígitos, dos letras consonantes del nombre de la variedad (**Sg**) y por último el tamaño relativo presentado por su desplazamiento en el gel de poliacrilamida del cual fue aislado (**240 pb**). Siguiendo una clave para cada variedad a la cual son específicos: Sigüin (**Sg**), Moraleño (**Mñ**), Azul (**Az**) y Chato (**Ch**).

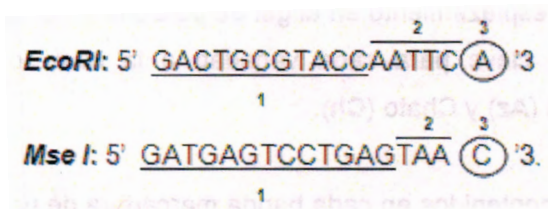
Para el aislamiento de los fragmentos AFLP contenidos en cada banda marcadora de una variedad de *A tequilana* se procedió después de su elusión a una reamplificación con los iniciadores AFLP **EcoRI**: 5'GACTGCGTACCAATTCA'3 y **MseI**: 5'GATGAGTCCTGAGTAAC'3 utilizados en la preamplificación al generar los perfiles AFLP, y posteriormente los fragmentos recuperados fueron clonados y caracterizados.

2.1.1. CORTE Y ELUSIÓN DE LA BANDA DEL GEL DE POLIACRILAMIDA

La elusión de los fragmentos se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ke-Liping (2004) con algunas modificaciones. Primero se limpió la superficie del gel de poliacrilamida con etanol (95%), a la banda seleccionada se le agregaron 7uL de agua y posteriormente se cortó y se colocó en un tubo de 1.5ml estéril. La banda se trituró en el tubo utilizando una punta de pipeta. Después se dejó incubar en 30µl de amortiguador TE (10mM Tris HCl, 1mM EDTA pH 8) durante 48 hrs a temperatura ambiente. Por último, la muestra se calentó a 95°C durante siete minutos y se centrifugó a 13,400g por dos minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se almacenó a 4°C hasta su uso.

2.1.2. REAMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE AFLP.

Se utilizó 5µl del sobrenadante previamente eluido del gel de poliacrilamida como templado para la reamplificación de los fragmentos de AFLP por PCR. El volumen final de la reacción fue de 20µl. La reacción consistió de 4µl de amortiguador TaqMango 5x (Bioline), 1.5mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP, 1.0 pmol de iniciador *Eco* RI y *Mse* I y 0.5U de la enzima *Taq* Polimerasa. Los iniciadores utilizados para reamplificación de los eluidos fueron los mismos utilizados en la etapa de la preamplificación al generar los perfiles de AFLP y constan de la secuencia adaptadora (1), secuencia restrictiva remanente (2) y un nucleótido selectivo (3) de acuerdo a lo siguiente:



Las condiciones de amplificación fueron de 94°C (30 s) de desnaturalización, 56°C (60 s) de alineamiento y 72°C (60 s) de elongación. La desnaturalización inicial fue de 94°C (5 min) y una elongación final de 72°C (7 min) en un total de 20 ciclos. Finalmente, los productos de amplificación obtenidos se analizaron en un gel de agarosa al 1 ó 2%.

Los fragmentos seleccionados fueron ligados a un vector de clonación T/A, el vector pGEM-T Easy Vector Systems utilizando el kit de clonación (Promega), entonces los plásmidos recombinantes fueron transformados en *E. coli* cepa JM109 (Promega) por el método de choque térmico a 42°C por 48 segundos. Las células fueron dispersadas en un medio de selección semi-sólido de Luria-Bertani-Agar (LB Agar) conteniendo ampicilina (250 µg/ml), IPTG (52 µg/ml), y X-gal (65 µg/ml), luego incubado a 37°C por 16 horas. La purificación del ADN plasmídico de las colonias positivas fue utilizando el método de lisis alcalina de Birnboim & Doly (1979). La verificación de los insertos correctos clonados en el plásmido se realizó mediante su digestión con la enzima de restricción *Eco*RI, de acuerdo a las condiciones de reacción del fabricante (Biolabs).

2.1.3. CARACTERIZACIÓN DE FRAGMENTOS REAMPLIFICADOS

Los fragmentos clonados se enviaron a secuenciar a MACROGEN, en Soeul, Corea. Los alineamientos para editar la secuencia del plásmido pGEM-T fueron realizados con el programa BioEdit (Hall, 1999). Este programa también fue utilizado para ubicar las secuencias de los adaptadores y de los nucleótidos selectivos utilizados para la generación de cada perfil de poliacrilamida del cual fueron extraídos en conjunto con el programa CLC DNA Workbench (disponible en la página de internet: www.clcbio.com).

Durante el análisis de las secuencias como marcadores AFLP se comprobó la permanencia de los tres nucleótidos selectivos en ambos extremos 5' y 3' de cada secuencia: 1) E-ACA en su extremo 5' y M-GTG en su extremo 3' (ó M-CAC en 5' y E-TGT en 3'), correspondiente a la combinación del Gel 5 de poliacrilamida del cual fueron extraídos; y 2) E-ACG en su extremo 5' y M-GTG en su extremo 3' (ó M-CAC en 5' y E-TGC en 3'), correspondiente a la combinación del Gel 2 de poliacrilamida.

A partir de las secuencias caracterizadas de AFLP, se utilizó el programa FastPCR (Kalendar *et al.*, 2009; disponible en la página de internet: <http://primerdigital.com/fastpcr.html>) para el diseño de iniciadores SCAR específicos a cada fragmento AFLP caracterizado. Este programa fue utilizado también en la determinación de las características tales como la temperatura de fusión, el número de pares de bases y el %GC del fragmento de *Agave* caracterizado. Por otra parte se utilizó el programa Primer3 (Untergasser *et al.*, 2007; disponible en la página de internet: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) en conjunto con el programa FastPCR, ambos sirvieron de apoyo para el diseño de los marcadores SCAR.

En general, se seleccionaron únicamente aquellas secuencias que alinearon ~100% en sus extremos flanqueantes con la secuencia de los iniciadores de preamplificación y que presentaban la combinación de nucleótidos selectivos, descartándose así las secuencias que resultaron ser concatenaciones de secuencias iniciadoras y/o adaptadoras. Las clonas seleccionadas se almacenaron a -80°C en glicerol al 20% (v/v) estéril, los plásmidos recombinantes a 1000 ng/μl fueron conservados a -20 °C, así como los eluidos directamente del gel de poliacrilamida se conservaron a 4°C.

III. RESULTADOS

3.1 IDENTIFICACIÓN DE BANDAS ESPECÍFICAS A ESPECIES Y VARIEDADES DE AGAVE

Se analizaron cinco perfiles de AFLP obtenidos con diferentes combinaciones de nucleótidos selectivos, a través de los cuales se compararon cuatro variedades de la especie *Agave tequilana* Weber. Se identificaron 15 marcadores específicos a nivel varietal distribuidos en los cinco geles de poliacrilamida. Ya que nuestro principal objetivo fue caracterizar una secuencia específica a nivel varietal, se seleccionaron aquellas bandas que se presentan en todos los individuos de una determinada variedad y se encuentran ausentes en el resto de las especies y variedades de *Agave*. (Figura 1).

Un ejemplo de éste tipo de polimorfismo se muestra en la Figura 1 donde se observan tres bandas distribuidas cada una en tres geles diferentes, cada banda es específica a una variedad de la especie *A. tequilana* Weber: Chato, Sigüin ó Moraleño (Figura 1 -A, -B y -C). Cada una de dichas bandas está presente únicamente en los individuos distribuidos uno por carril que conforman cada panel varietal.

Podemos observar en el Gel 1 (Figura 1A) que el marcador G177-Ch263 únicamente está presente en los individuos de la variedad Chato (señalado con una flecha blanca con 263pb) mientras que en ese mismo gel (Gel 1) observamos arriba y abajo bandas que no presentan dicha clase de polimorfismo y están presentes en todas las variedades de la especie *Agave tequilana* Weber e incluso en las otras especies (Figura 1A). El polimorfismo a nivel varietal lo observamos para otras bandas de perfiles AFLP como son la banda identificada como el marcador G299-Sg240 (Gel 2) de 240 pb y la banda identificada como el marcador G5106-Mñ178 (Gel 5) de 178 pb señalados con flechas blancas cada uno en la Figura 1 (B y C, respectivamente).

La recuperación de los fragmentos AFLP seleccionados se realizó aplicando un método de elusión con TE (TrisHCL EDTA 10:1), descrito en el apartado 2.1.1. El total de las

bandas encontradas fueron numeradas para su identificación desde la banda #64 a la banda #135, incluyendo tanto las bandas específicas a nivel varietal como aquellas específicas a nivel especie (Anexo A). El resultado de las bandas encontradas se resume en el Cuadro 2. Se ubicaron en total 15 marcadores específicos de *A. tequilana* Weber y 37 marcadores específicos para las otras diferentes especies en *Agave*. En el presente estudio únicamente se consideraron para su selección los marcadores específicos a alguna variedad en particular.

Para la variedad Sigüin únicamente se identificaron dos bandas específicas identificadas como G298-Sg603 y G299-Sg240, mientras que para la variedad Azul únicamente fue encontrada una banda específica identificada como G285-Az288. Se observó que de las cinco combinaciones de nucleótidos selectivos únicamente en la combinación E-ACG/M-CAC (Gel 2) se detectó polimorfismos a nivel de variedad identificando a las variedades Sigüin y Azul (Cuadro 2).

Por su parte, para las variedades Chato y Moraleño se identificaron una mayor cantidad de marcadores AFLP distribuidos en los cinco perfiles de AFLP analizados. Se observó que al menos en cuatro de las cinco combinaciones utilizadas en cada perfil generaron por lo menos una banda de AFLP específica a nivel de variedad que identifica a alguna de éstas dos variedades (Cuadro 2).

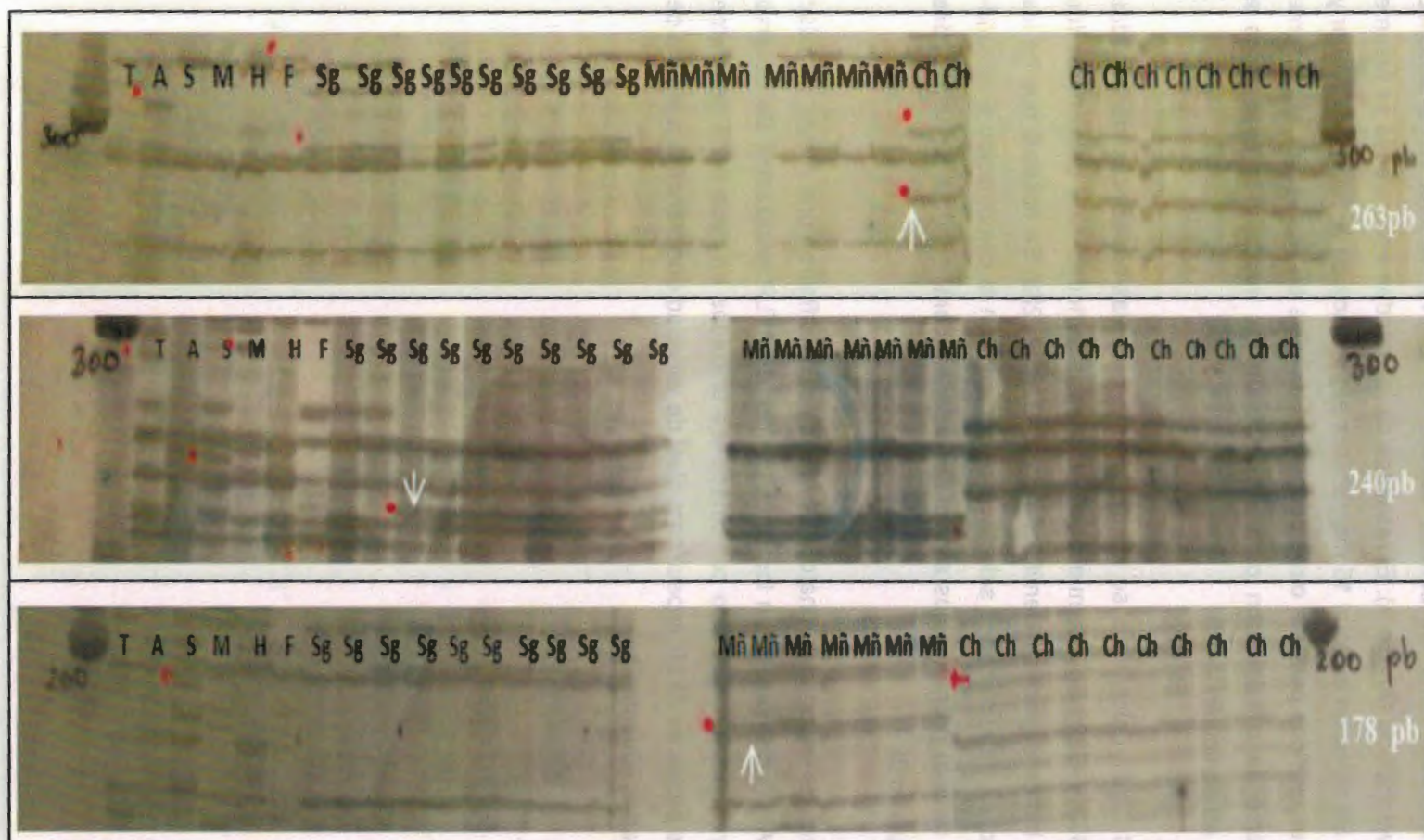


Figura 1. Perfiles de AFLP que identifican particular polimorfismo a nivel de variedades en la especie *A. tequilana* Weber. A) Gel 1 (E-ACG/M-CTT) se observa una banda específica a la variedad Chato identificada como la banda G177-Ch263. B) Gel 2 (E-ACG/M-CAC) se observa una banda específica a la variedad Sigüin identificada como la banda G299-Sg240. C) Gel 5 (E-ACA/M-CAC) se observa una banda específica a la variedad Moraleño identificada como G5106-Mñ178.

A nivel especie de *A. tequilana* Weber, se seleccionaron para su caracterización seis de los 15 marcadores de AFLP específicos a nivel varietal en *A. tequilana* Weber: G5106-Mñ178, G5140-Mñ251, G174-Mñ240, G5108-Ch224, G299-Sg240 y G285-Az288 señalados con un asterisco (*) en el Cuadro 2. Los criterios de selección de banda de AFLP fueron el tamaño (pb) presentado en el gel de poliacrilamida y las características de la banda, buscando bandas sin reflejo ó doble bandeo contiguo, nítida y no muy extendida.

Fueron elegidos los marcadores G5106-Mñ178, G5140-Mñ251 de los marcadores identificados en Agave Moraleño debido a que eran los que presentaron mayor tamaño y su recuperación fue posible junto con G174-Mñ240, sin embargo para éste último sus iniciadores diseñados no presentaron ningún producto de amplificación durante la validación.

Para la variedad Sigüin únicamente se contaba con dos marcadores detectados: G299-Sg240 y G298-Sg603, se decidió trabajar con ambos sin embargo el segundo presento dificultades técnicas al momento de su recuperación debido a su mayor tamaño se desfragmentaba presentando la reamplificación de los eluidos únicamente un barrido y ninguna banda visible en el gel de agarosa al 2%.

Cuadro 2. Marcadores de AFLP específicos a nivel variedad y a nivel especie en Agave, identificados en diferentes perfiles de poliacrilamida.

MARCADORES AFLP ESPECÍFICOS POR VARIEDAD (<i>Agave tequilana</i> W)			MARCADORES AFLP ESPECÍFICOS POR ESPECIE (<i>Agave</i>)					
NOMBRE	COMBINACIÓN	VARIEDAD	NOMBRE	COMBINACIÓN	ESPECIE	NOMBRE	COMBINACIÓN	ESPECIE
G174-Mn240*	ACG-CTT	Moraleño	G164-An320	ACG-CTT	<i>Agave angustifolia</i>	G169-Si130	ACG-CTT	<i>Agave sisalana</i>
G2100-Mn170	ACG-CAC		G287-An190	ACG-CAC		G168-Si180	ACG-CTT	
G5107-Mn135	ACA-CAC		G286-An370	ACG-CAC		G167-Si190	ACG-CTT	
G5106-Mn178*	ACA-CAC		G478-An260	ACG-CAG		G166-Si210	ACG-CTT	
G5140-Mn251*	ACA-CAC		G5101-An290	ACA-CAC		G165-Si240	ACG-CTT	
G6134-Mn117	AAC-CAG		G6122-An110	AAC-CAG		G289-Si450	ACG-CAC	
			G6121-An190	AAC-CAG		G290-Si350	ACG-CAC	
G175-Ch347	ACG-CTT	Chato			<i>Agave marginata</i>	G291-Si270	ACG-CAC	
G176-Ch295	ACG-CTT		G294-Ma300	ACG-CAC		G292-Si180	ACG-CAC	
G177-Ch263	ACG-CTT		G480-Ma650	ACG-CAG		G479-Si120	ACG-CAG	
G483-Ch96	ACG-CAG		G481-Ma380	ACG-CAG		G6123-Si210	AAC-CAG	
G5108-Ch224*	ACA-CAC		G6126-Ma250	AAC-CAG		G6124-Si130	AAC-CAG	
G6135-Ch363	AAC-CAG		G6125-Ma300	AAC-CAG				
G298-Sg603	ACG-CAC	Sigüin	G173-Fy150	ACG-CTT	<i>Agave fourcroydes</i>	G6128-Fy390	AAC-CAG	<i>Agave fourcroydes</i>
G299-Sg240*	ACG-CAC		G171-Fy350	ACG-CTT		G6129-Fy250	AAC-CAG	
			G170-Fy420	ACG-CTT		G6130-Fy260	AAC-CAG	
G285-Az288*	ACG-CAC	Azul	G295-Fy420	ACG-CAC		G6131-Fy180	AAC-CAG	
			G296-Fy110	ACG-CAC		G6132-Fy130	AAC-CAG	
			G482-Fy400	ACG-CAG		G6133-Fy115	AAC-CAG	
			G6127-Fy600	AAC-CAG				

Por último para la variedad Chato se eligió únicamente la banda G5108-Ch224 la cual era una de las que no presentaban un doble bandeo, no estaba extendida y tenía buena nitidez aunque no presentaba el mayor de los tamaños.

3.2 AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE AFLP

Los fragmentos de AFLP seleccionados fueron eluidos con el método de TE y reamplificados. Los fragmentos obtenidos por dicha reamplificación fueron del tamaño esperado: 178pb, 251pb, 224pb, 240pb y 288pb correspondientes a los tamaños de las bandas presentadas por los marcadores específicos: G5106-Mñ178, G5140-Mñ251, G5108-Ch224, G299-Sg240 y G285-Az288, respectivamente.

En la Figura 2 se observan cuatro marcadores G5106-Mñ178, G5107-Mñ135, G5108-Ch224 y G5140-Mñ251, visualizados en un gel de agarosa al 1%; sin embargo, el marcador G5107-Mñ135 no fue considerado para su caracterización por tener un tamaño muy pequeño, mientras que los otros tres marcadores presentados en la figura son parte de los 6 que fueron seleccionados.

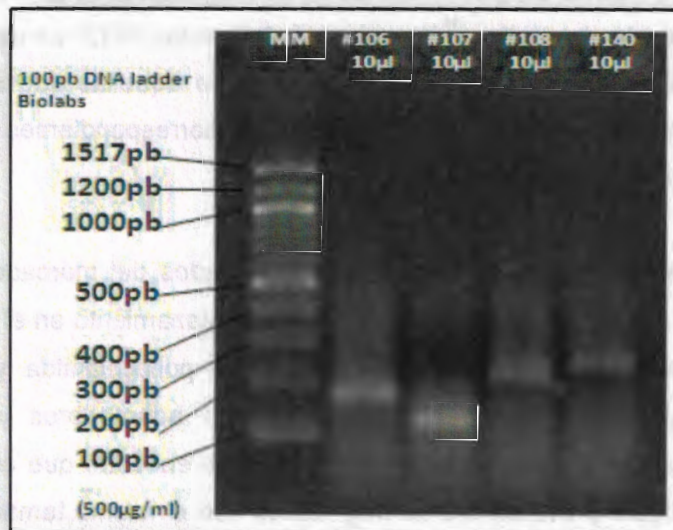


Figura 2. Reamplificación de fragmentos AFLP de *A. tequilana* Weber recuperados del gel de poliacrilamida. Se observa en gel de agarosa al 1%: G5106-Mñ178, G5107-Mñ135, G5108-Ch224 y G5140-Mñ251. MM: Marcador Molecular.

La clonación de los fragmentos recuperados en G5106-Mñ178, G5140-Mñ251, G5108-Ch224 y G285-Az288, fue realizada a partir del producto de PCR obteniéndose en promedio dos clonas con el tamaño esperado por cada una de las 10 clonas analizadas. Mientras que para los fragmentos recuperados del marcador G299-Sg240, el producto de preamplificación primeramente se purificó en gel de agarosa previo a su clonación, lo que permitió una mayor correspondencia del tamaño del fragmento clonado con respecto al tamaño esperado en un mayor número de clonas (Figura 3 B).

Al analizar algunas de las clonas, se observaron fragmentos de tamaño diferente al tamaño esperado cuando los productos de amplificación no fueron purificados (Figura 3 A), como el caso del marcador G285-Az288. Así, se eligieron únicamente los fragmentos que presentaron el tamaño esperado congruente con el tamaño presentado en el gel de poliacrilamida y fueron secuenciados para su caracterización, seleccionando para el marcador G285-Az288 por ejemplo, los fragmentos de 288 pb. El paso de la purificación permitió la exclusión de la mayoría de las clonas contaminadas con la presencia de fragmentos de AFLP de bandas vecinas resultantes del aislamiento de una banda de AFLP de un gel seco de poliacrilamida, y de los procesos de amplificación por PCR. Una contaminación severa ocurrió durante la clonación de marcadores AFLP cuando se utilizó producto de amplificación sin purificar provenientes de bandas AFLP cercanas a la banda de interés en el gel de poliacrilamida. Especialmente de aquellas que son débilmente resueltas y sustituyeron a las clonas con inserto correcto correspondientes al marcador de AFLP deseado al momento de evaluarlas.

Sin embargo, en tres de los fragmentos de AFLP clonados del marcador G285-Az288 seleccionados como clonas positivas al presentar un desplazamiento en el gel de agarosa de 288 pb congruente al desplazamiento del gel de poliacrilamida y que además presentaban congruencia en ambos de sus extremos adaptadores y con los tres nucleótidos selectivos correspondientes al perfil AFLP, se encontró que eran secuencias diferentes no homólogas, provenientes de fragmentos con el mismo tamaño en pares de bases, pero con secuencia diferente y compartiendo un mismo lugar en el desplazamiento electroforético. Adicionalmente, se encontró un microsatélite (CA)19 en la clona 85-11F. Sin embargo, debido a que no se encontró un consenso entre las tres secuencias con el

tamaño de 288 pb (85-7F, 85-10F y 85-11F) presentadas en la Figura 3 A, no se consideraron para el diseño de iniciadores específicos.

En contraste a lo anterior, cuando se purificó el fragmento encontrado en G299-Sg240 específico a la variedad Sigüin antes de la clonación, el número de clonas que presentaban el fragmento de tamaño esperado fue mayor (Figura 3 B). Adicionalmente, siete de las 10 clonas de igual tamaño mostraron la misma secuencia y debido a que todos los fragmentos presentaron congruencia en ambos de sus extremos adaptadores y la permanencia de los tres nucleótidos selectivos, se sugiere que los otros fragmentos de secuencia diferente pero que tuvieron un mismo desplazamiento en el gel de agarosa sea parte del fenómeno denominado homoplasia.

En general, para la caracterización se seleccionaron solamente aquellas clonas que mostraron el fragmento de tamaño esperado de acuerdo al marcador del cual fueron aislados en total: una clona del marcador G5106-Mñ178, dos clonas del marcador G5140-Mñ251, dos clonas del marcador G5108-Ch224, diez clonas del marcador G299-Sg240 y cuatro clonas del marcador G285-Az288 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Fragmentos de AFLP clonados exitosamente por *E. coli* en pGEM-T para su aislamiento y su posterior caracterización mediante secuenciación.

CLONAS CON EL INSERTO CORRECTO			
No. BANDA	No. CLONA	TOTAL CLONAS	VARIEDAD (<i>Agave tequilana</i> W)
#106	8	1 clona	Moraleño
#108	1,7	2 clonas	Chato
#140	7,8	2 clonas	Moraleño
# 85	1F,7F,10F,11F	4 clonas	Azul
# 99	3,10,11,20,21,27,28,29,35,38	10 clonas	Sigüin
# 74	2,6,7,8,19,20,21,22,23	10 clonas	Moraleño

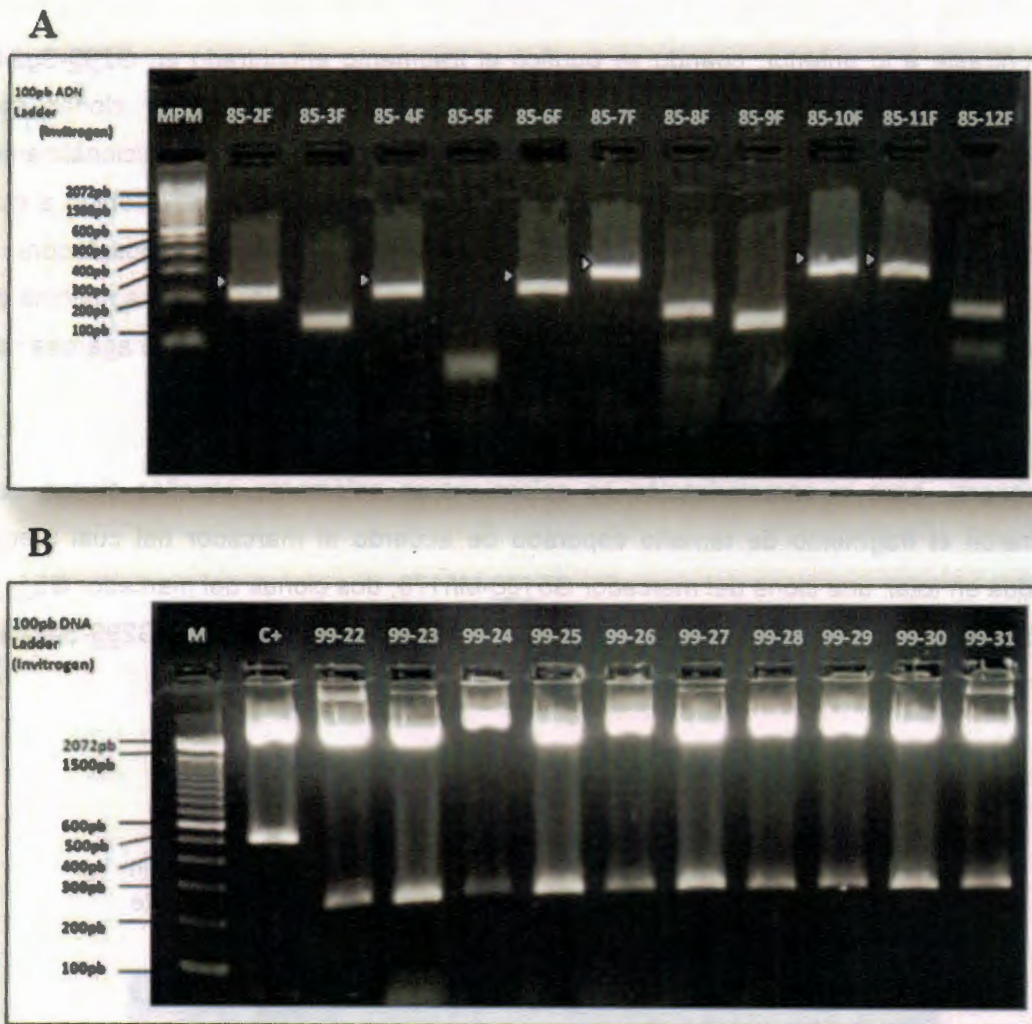


Figura 3. Liberación de insertos de plásmidos recombinantes. A) Por PCR en clonas del marcador G285-Az288, se observan diferentes insertos con ~208 pb (flecha 1, 2, y 3), ~288 pb (flecha 4, 5, y 6) de izquierda a derecha. B) Por digestión con *EcoRI* en clonas del marcador G299-Sg240, se observa en gel de agarosa al 2% que todas las clonas tienen un inserto de 240 pb. Los números superiores de cada gel significan: el número del fragmento seguido del número de clona. *MM*: Marcador molecular.

3.3 CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES DE AFLP

Durante el análisis de secuencia, se encontró que por cada 10 secuencias analizadas sólo cinco secuencias en promedio resultaban ser fragmentos de AFLP y el resto fueron artefactos que resultaron ser repeticiones de las secuencias iniciadoras por hasta cinco veces a lo largo de la secuencia caracterizada (datos no mostrados). Demostrando un 50% de confianza en éste tipo de análisis posiblemente debido a la presencia de adaptadores en altas concentraciones en la reacción de AFLP y como resultado de las amplificaciones en paralelo.

La Figura 4 presenta un ejemplo de un fragmento AFLP (G299-Sg240) aislado y clonado, que resultó positivo en el análisis de secuencias. Éste fragmento presenta únicamente en sus extremos la secuencia de los iniciadores de la preamplificación correspondientes: *EcoRI*: 5'GACTGCGTACCAATTCA'3 y *Mse I*: 5'GATGAGTCCTGAGTAAC'3 (conteniendo la secuencia adaptadora y un solo nucleótido selectivo) y además presenta los otros dos nucleótidos selectivos establecidos en la amplificación selectiva correspondientes al gel de poliacrilamida del cual fue aislado el fragmento (Gel 2). Se procedió el análisis de ésta forma en todas las secuencias encontradas en cada clona caracterizada, utilizando todos los puntos anteriormente expuestos como criterios para su comprobación cómo fragmento de AFLP.

Para la banda G299-Sg240 específica a la variedad Sigüin se utilizó la secuencia de 227 pb común entre 7 de las 10 clonas caracterizadas (secuencia consenso) para el diseño de iniciadores específicos a éste marcador de AFLP (Figura 4).

Para la banda AFLP G5140-Mñ251 específica a la variedad Moraleño, fueron seleccionadas las clonas: 140-7 y 140-8 por presentar un tamaño esperado de inserto de ~251 pb, se encontró en base a los alineamientos de las dos secuencias caracterizadas de ambas clonas un alineamiento del 100% (Anexo B).

Contrariamente, para el fragmento de AFLP en la banda G5108-Ch224 específica a la variedad Chato fueron seleccionadas para secuenciación dos clonas:108-1 y 108-7, las cuales presentan un tamaño de inserto esperado de ~224 pb. Pero sus secuencias al ser alineadas resultaron ser dos secuencias diferentes a pesar que provenían de la misma banda de AFLP obteniendo un 46% de identidad entre ambas secuencias internas, así que se procedió a diseñar un par de iniciadores para cada uno de los dos fragmentos diferentes encontrados (Anexo C).

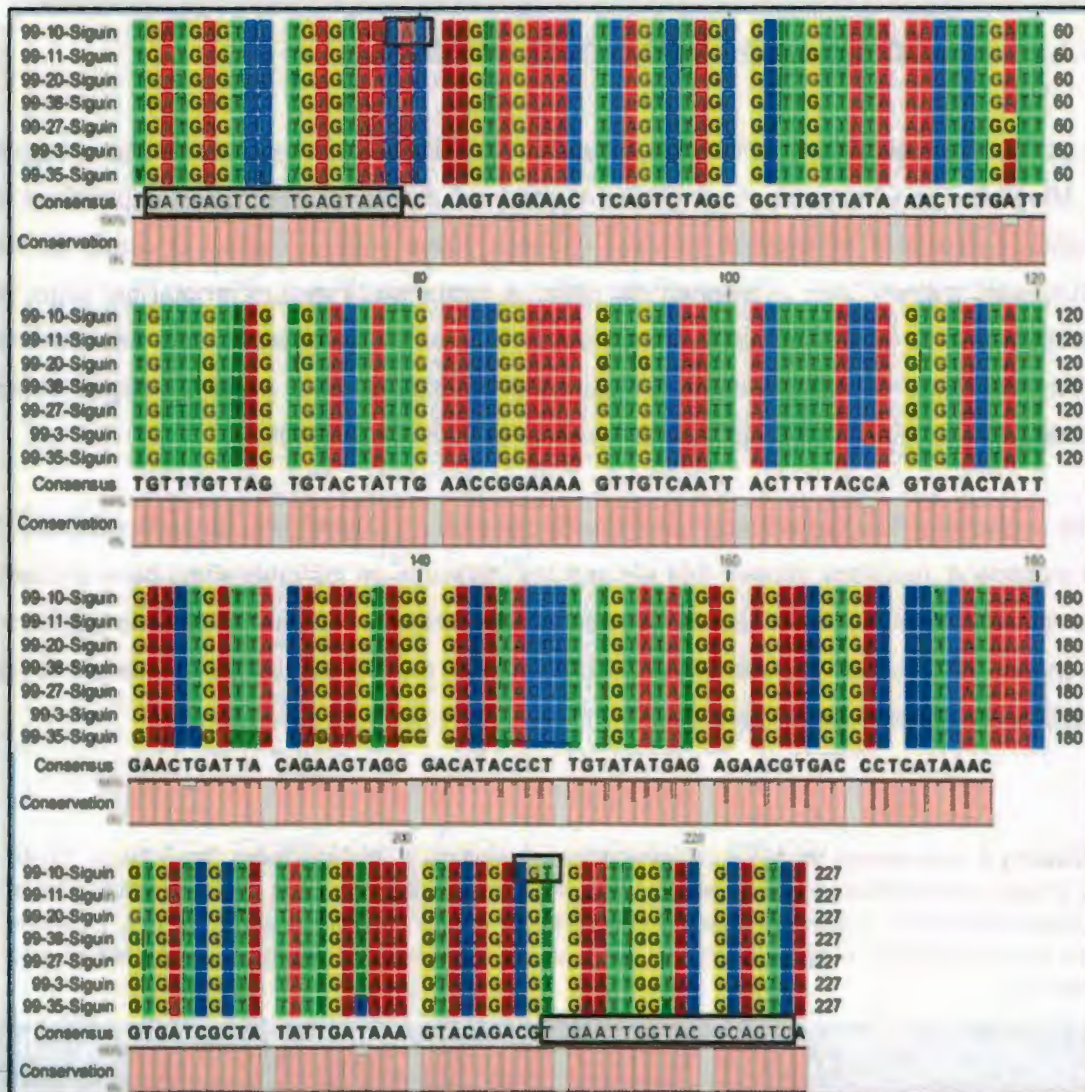


Figura 4. Alineamiento de verificación como Fragmento AFLP del marcador G299-Sg240, secuencia consenso de clonas: No.3,10,11,20,27,35,38 (~100% identidad). Se observa: *Secuencia consenso* (secuencia utilizada para diseño de marcadores SCAR), en los recuadros inferiores: *Secuencias de Iniciadores de la preamplificación*, MseI (5' GATGAGTCTGAGTAAC 3') en el extremo 5' del fragmento AFLP y EcoRI secuencia complementaria y reversa (5' TGAATTGGTACGCAGTC 3') en el extremo 3' del fragmento AFLP, en los recuadros superiores: *Combinación de los 3 nucleótidos selectivos correspondientes al Gel 2* (M-CAC v E-CGT).

3.4 DISEÑO Y VALIDACIÓN DE MARCADORES TIPO SCAR

3.4.1. INICIADORES ESPECÍFICOS DISEÑADOS

A partir de las secuencias AFLP caracterizadas específicas a las variedades Chato, Sigüin y Moraleño en la especie *A. tequilana* Weber, se diseñaron iniciadores específicos a dichas secuencias empleando diversos criterios. Tales criterios fueron el contenido de Guanina/Citosina (G/C), la longitud del oligo, la temperatura de fusión total del oligo, la temperatura de fusión del oligo en su extremo 3' con baja estabilidad y una mínima diferencia entre las temperaturas de alineamiento óptima entre pares de oligos como parámetros de diseño para los iniciadores en cada software utilizado.

Los iniciadores diseñados fueron probados a partir de ADN genómico de cada variedad de la especie *A. tequilana* Weber. Las secuencias utilizadas en los programas para el diseño de iniciadores no incluyen las secuencias adaptadoras por lo que su tamaño varía con respecto al tamaño del marcador AFLP original en 33 pb correspondientes a las secuencias adaptadoras (Cuadro 4).

Cuadro 4. Secuencias de AFLP caracterizadas específicas a las variedades Sigüin, Azul, Chato y Moraleño en la especie *Agave tequilana* Weber⁽²⁾, secuencias utilizadas como templatado para el diseño de iniciadores las cuales no incluyen 33 pb de ambas secuencias adaptadoras⁽³⁾ y tamaño en pares de bases observado en los geles de poliacrilamida de acuerdo al desplazamiento relativo⁽¹⁾.

VARIEDAD (<i>Agave tequilana</i> W)	AFLP - CLONA	TAMAÑO RELATIVO DEL MARCADOR ₁	TAMAÑO DEL INSERTO SECUENCIADO ₂	TAMAÑO DE SECUENCIA INTERNA ₃
Agave Moraleño	140-8/7	251 pb	243 pb	210 pb
Agave Moraleño	106-8	178 pb	181 pb	148 pb
Agave Chato	108-1	224 pb	223 pb	190 pb
Agave Chato	108-7	224 pb	220 pb	187 pb
Agave Azul	85-11	288 pb	247 pb	214 pb
Agave Sigüin	99-consenso	240 pb	227 pb	194 pb

En total se diseñaron siete pares de iniciadores específicos en promedio para cada uno de los marcadores de AFLP seleccionados, excepto para el #108-7 con el cual únicamente fue posible diseñar cinco pares de iniciadores debido a sus características. Sin embargo, únicamente dos pares de iniciadores por cada variedad fueron sintetizados para su validación.

Del total de los pares de iniciadores diseñados solamente un grupo fue seleccionado para su síntesis de acuerdo a los siguientes criterios: 1) la diferencia de T_m entre ambos sea la mínima 2) el %GC de cada iniciador no sea menor al del templado (sea mayor ó igual su contenido de GC) 3) la diferencia entre la T_m de cada iniciador versus con la T_m de la secuencia interna sea la mínima 4) se consideran aquellos dos pares de iniciadores con diferentes tamaño de amplicón y cuya región de hibridación en la secuencia interna sea lo más distante posible. En el Cuadro 5 se muestran los pares de iniciadores seleccionados para ser sintetizados.

Cuadro 5. Iniciadores diseñados específicos a las secuencias AFLP caracterizadas en la especie *Agave tequilana* Weber, seleccionados para su síntesis.

VARIEDAD (<i>Agave tequilana</i> W)	AFLP	NOMBRE	TAMAÑO	SECUENCIA	NOMBRE	TAMAÑO	SECUENCIA	Ta	AMPLICIÓN
FORWARD				REVERSE					
Chato	G5108-Ch224-1	SCR_02-F'	16 pb	5'ggtgaagcactgtgat'3	SCR_02-R'	15 pb	5'actcccctgcaagta'3	54°C	126 pb
Chato	G5108-Ch224-7	SCR_03-F'	20 pb	5'aggagggtcctatccttag'3	SCR_03-R'	25 pb	5'aaccttttataactcaaaaaccaa'3	60°C	160 pb
Moraleño	G5140-Mn251-7	SCR_01-F'	19 pb	5'gagtctcagtctggctt'3	SCR_01-R'	18 pb	5'cgtacaatccgcctccat'3	65°C	142 pb
Moraleño	G5106-Mn178-8	SCR_04-F'	24 pb	5'tgaacttgacaagaattggtt'3	SCR_04-R'	19 pb	5'aatactcccagcgagtg'3	63°C	100 pb
Siguin	G299-Sg240	SCR_05-F'	22 pb	5'gaaactcagtctagcctt'3	SCR_05-R'	20 pb	5'tcacgtttatgagggtcacg'3	65°C	159 pb
Siguin	G299-Sg240	SCR_06-F'	23 pb	5'agaaactcagtctagcctt'3	SCR_06-R'	21 pb	5'cacgtttatgagggtcacgt'3	65°C	159 pb

3.4.2. VALIDACIÓN DE INICIADORES ESPECÍFICOS COMO MARCADORES SCAR

Los iniciadores específicos seleccionados fueron sintetizados para ser validados directamente por amplificación de ADN genómico en las variedades: Azul, Sigüin, Chato y Moraleño de la especie *A. tequilana* Weber. En todos los casos se obtuvo el fragmento correspondiente al tamaño esperado de amplicón; sin embargo, algunos de los iniciadores específicos presentaron bandas adicionales lo que indica inespecificidad ó en su caso presencia de alelos múltiples.

El par de iniciadores específicos SCR_03 diseñado a partir de un fragmento AFLP, caracterizado en la clona 108-7 (G5108-Ch224) y específico a la variedad Chato, generó el amplicón de tamaño esperado de 160 pb entre otros fragmentos que posiblemente sean otros alelos de tal marcador de AFLP (Figura 5).

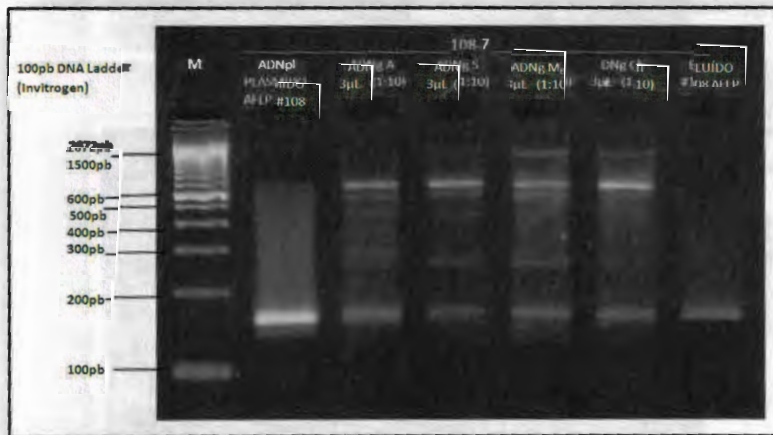


Figura 5. Validación del par de iniciadores específicos SCR_03 diseñados en gel de agarosa al 3% para el fragmento de la variedad Chato G5108-Ch224-7. M: Marcador Molecular, pl: Plásmido recombinante, A: Agave Azul, S: Agave Sigüin, Mg: Agave Moraleño, Ch: Agave Chato, Eluido: fragmentos de AFLP recuperados del marcador G5108-Ch224 del gel de poliacrilamida del cual fue aislado.

Mientras que los iniciadores específicos SCR_01 y SCR_04 diseñados a partir de fragmentos de AFLP caracterizados en marcador G5140-Mñ251 y el otro en G5106-Mñ178, ambos específicos a variedad Moraleño, generaron amplicones con el tamaño esperado de 142 pb y 100 pb, respectivamente (Figura 6). Entre ambos, únicamente el marcador de AFLP G5140-Mñ251 al ser evaluado con el SCR_01 identificó un alelo simple, mientras que se observa un patrón multialélico presentado por algunas variedades con el marcador G5106-Mñ178 al ser evaluado con el SCR_04.

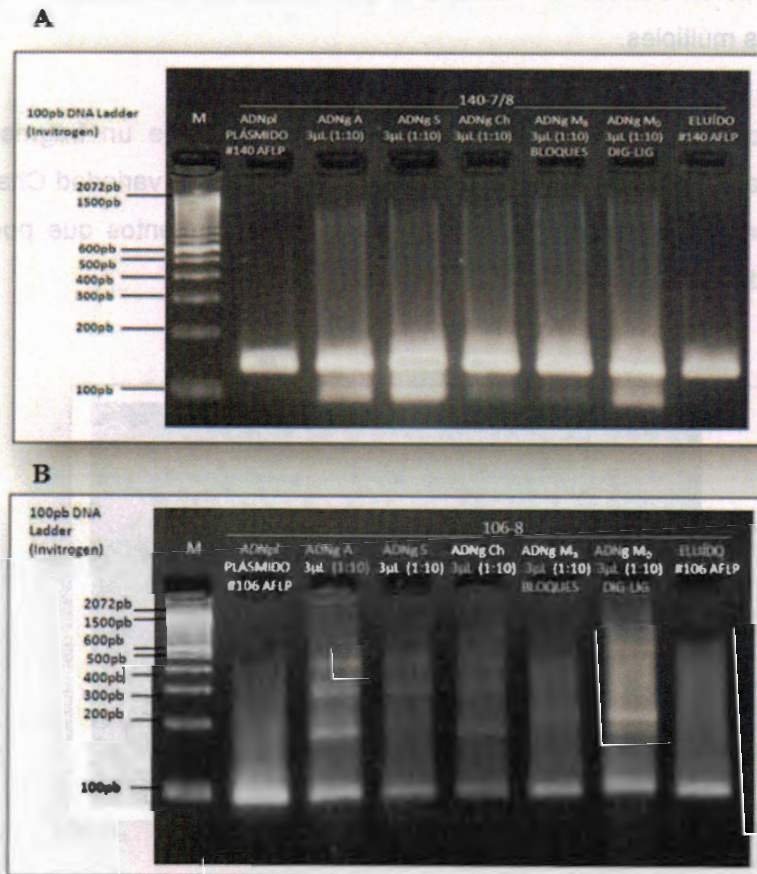


Figura 6. Validación de iniciadores específicos SCR_01 (A) y SCR_04 (B) en gel de agarosa al 3%, iniciadores diseñados para los fragmentos de la variedad Moraleño: G5140-Mñ251-7/8 y G5106-Mñ178-8, respectivamente. M: Marcador Molecular, pl: Plásmido recombinante, A: Agave Azul, S: Agave Sigüin, M_A: Agave Moraleño, Ch: Agave Chato, Eluido: fragmentos AFLP recuperados del marcador G5140-Mñ251 (A) y G5106-Mñ178 (B) del gel de poliácridamida.

Los iniciadores específicos SCR_05 y SCR_06 generaron un amplicón de 159 pb como era lo esperado, fueron diseñados a partir de la secuencia común de siete clonas (secuencia consenso) de los fragmentos encontrados en el marcador AFLP G299-Sg240 específicos a la variedad Sigüin (Figura 7). Ambos pares de iniciadores fueron diseñados para hibridar en regiones diferentes de la misma secuencia consenso AFLP caracterizada del marcador G299-Sg240 y fueron validados en ADN genómico nuevamente preparado para cada una de las diferentes variedades de la especie *A. tequilana* Weber. Adicionalmente, ambos iniciadores generaron una banda única con ausencia de productos de hibridación inespecífica al probarlos en un rango de 2°C de la temperatura de alineamiento, no fueron detectados tampoco bandas adicionales que pudieran ser alelos alternativos ó bandas inespecíficas.

Por lo tanto, el marcador G299-Sg240 no presenta un patrón multialélico en los genomas de las variedades de la especie *A. tequilana* Weber evaluadas, concluyendo de manera preliminar que este marcador y probablemente el marcador G5140-Mñ251 se encuentran en el genoma del *Agave* como un alelo simple, comprobándose que los iniciadores SCR_01, SCR_05 y SCR_06 fueron exitosamente específicos a las secuencias de AFLP caracterizadas ya que se lograron identificar en las variedades probadas como un alelo único y simple sin embargo, no se encuentran de una manera específica a una sola variedad.

Teniendo en consideración la ausencia de una base de datos para comparación de las secuencias caracterizadas de *Agave*, tenemos que los marcadores SCAR exploran regiones de secuencias caracterizadas en ADN genómico, durante la validación de los iniciadores diseñados de manera general, revelando así el comportamiento de cada loci AFLP de estudio de manera preliminar.

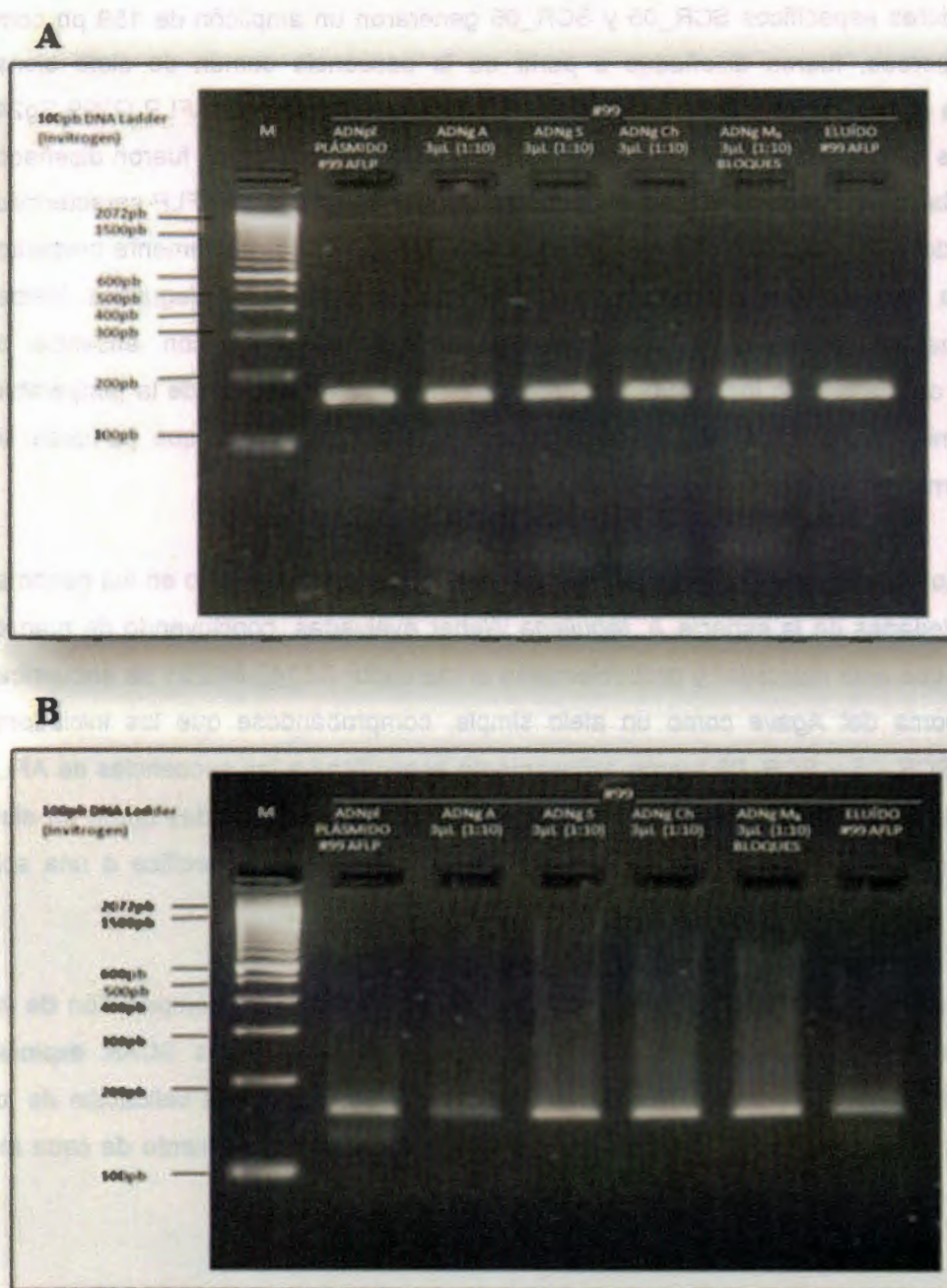


Figura 7. Validación de iniciadores específicos SCR_05 (A) y SCR_06 (B) en gel de agarosa al 3%, diseñados de la secuencia común entre 7 clonas de fragmentos AFLP recuperados de G299-Sg240 en la variedad Sigüin. Observamos M: Marcador Molecular, pl: Plásmido recombinante, A: Agave Azul, S: Agave Sigüin, M_B: Agave Moraleño, Ch: Agave Chato, Eluido: fragmentos AFLP eluidos recuperados del marcador G299-Sg240.

Para los dos fragmentos AFLP con un 46% de identidad (clona 108-1 y clona 108-7) aislados y caracterizados del marcador G5108-Ch224, únicamente presente en la variedad Chato, fueron diseñados y validados los iniciadores SCR_02 y SCR_03, respectivamente. El resultado fue que únicamente el SCR_03 generó un producto de amplificación con el tamaño esperado (Figura 5) entre otras bandas, mientras que el SCR_02 no generó ningún producto de amplificación con el tamaño esperado en ADN genómico de las variedades a pesar que sí fue amplificado en los controles del plásmido y en los eluidos (sin figura).

Únicamente el SCR_08 a pesar que amplificó en el plásmido del cual fue aislado, no amplificó en ADN genómico de ninguna de las variedades evaluadas, ni en el control de los eluidos, así que el SCR_08 se descartó por completo. En cuanto a los demás iniciadores se puede mencionar que no fueron específicos para la variedad a partir de la cual se aisló y en muchos casos además, se observó un patrón multialélico.

Lo anterior puede ser explicado mediante la posibilidad de que la variación detectada entre variedades en los perfiles de AFLPs, sea únicamente debido a mutaciones puntuales detectadas por las endonucleasas de restricción y debido a que los iniciadores SCAR fueron únicamente diseñados para la secuencia interna AFLP sin considerar tales sitios se perdió la especificidad para la variedad a partir de la cual fue aislada, pudiendo abordarse en trabajos futuros como un polimorfismo de nucleótido simple (SNP).

IV. DISCUSIÓN

La metodología aplicada en este estudio para el aislamiento de fragmentos de AFLP específicas a las variedades Chato, Sigüin y Moraleño de la especie *A. tequilana* Weber, fue adecuada para la caracterización de sus secuencias y posteriormente utilizarlas para diseñar iniciadores específicos. Existen trabajos similares para otras especies, donde se ha reportado el desarrollo de marcadores SCAR partiendo de fragmentos polimórficos aislados de un perfil genómico para identificación vegetal (Shirasawa *et al.*, 2004; Che *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2006; Vidal *et al.*, 2000).

El método de elusión probado únicamente con TE resultó adecuado y muy práctico para la recuperación por elusión de los fragmentos del gel de poliacrilamida, en algunos casos sin necesidad de utilizar un amortiguador de elusión especial ó un tratamiento por calor como reportan Zhang *et al.* 2009, Negi *et al.*, 2000, entre otros. A pesar de que los perfiles de AFLP no eran de reciente preparación, el uso únicamente de la solución de TE resulto efectivo como ha sido reportado también por Boukar *et al.*, 2004, Guo *et al.*, 2003, entre otros. Sin embargo, en la mayoría de los ensayos fue utilizado un tratamiento por calor a 94°C como reporta Guo *et al.* en el 2003. Al clonar fragmentos directamente del amplicón, se obtuvieron diversas secuencias que al parecer son homoplásias de la técnica de AFLPs.

A partir de los alineamientos de las secuencias internas encontradas en las clonas de los fragmentos de AFLP 108-1 y 108-7, se observó un 46 % de identidad entre ambas secuencias (no considerándose dentro del alineamiento las secuencias iniciadoras). Sin embargo, debido a que se encontraron en ambas un 100% de alineamiento con ambos iniciadores de preamplificación en sus extremos 5' y 3', y una combinación de E-ACA y M-GTG en los extremos de la secuencia interna 5' y 3', correspondientes al Gel 5, se sugiere la presencia de alelos homoplásicos. Durante la caracterización de ambos fragmentos de AFLP recuperados de G5108-Ch224 en la variedad Chato, se observó que la medida entre ambos fragmentos apenas distó en tres nucleótidos, lo cual no fue detectado por el gel de agarosa y fueron considerados como de igual tamaño.

La homoplasia ha sido anteriormente reportada en diversos estudios con AFLP (Bonin *et al.*, 2004; O' Hanlon y Peakall, 2000; Nikaido *et al.*, 1999 y Vekemans *et al.*, 2002). El bajo porcentaje de identidad entre ambas secuencias sugirió que son dos fragmentos de AFLP diferentes, eluidos de la misma banda polimórfica a la variedad Chato. Sin embargo, solamente uno de los dos fragmentos caracterizados fueron detectados durante su validación en el ADN genómico de las variedades de *A. tequilana* Weber con los iniciadores específicos diseñados.

Contrariamente a lo esperado, en aquellas bandas identificadas en los perfiles de AFLP como específicas a las variedades Chato, Moraleño y Sigüin, no se encontraron

fragmentos de ADN con secuencias internas exclusivas a dichas variedades. Los resultados indican que tales secuencias internas se encuentran en los genomas de las otras variedades evaluadas de la especie *A. tequilana* Weber y sugiere que únicamente mutaciones puntuales pudieron generar ganancia ó pérdida de nuevos sitios de restricción que caracterizan a una determinada variedad, permitiendo visualizar el polimorfismo en los perfiles de AFLP; pero sin variar la secuencia interna a la cual flanquean tales sitios de restricción.

Sin embargo, a pesar de que únicamente fueron utilizados los iniciadores de la preamplificación con un solo nucleótido selectivo, durante la reamplificación de los fragmentos AFLP recuperados, fue posible identificar en las secuencias caracterizadas los tres nucleótidos selectivos correspondientes a la amplificación selectiva a pesar de que los iniciadores de la amplificación selectiva no fueron utilizados en los eluidos. Lo anterior es una evidencia de que los insertos presentes en las clonas son los fragmentos de AFLP que presentaron el polimorfismo a nivel varietal en la especie *A. tequilana* Weber, identificados en los perfiles de AFLP. Con el criterio anterior fueron descartadas las secuencias con la posibilidad de que fueran artefactos y/ó repeticiones de secuencias adaptadoras.

Los polimorfismos a nivel de variedad de los sitios de restricción reconocidos por las enzimas *EcoRI* y *MseI* fueron específicos a una determinada variedad en los locus de AFLP analizados. En particular para los marcadores de AFLP G5140-Mñ251 (Moraleño) y G299-Sg240 (Sigüin), se encontraron como alelos simples en todas las variedades cuando sus iniciadores correspondientes SCR_01, SCR_05 y SCR_06 fueron validados cada uno en un rango de temperatura de 2°C presentando la misma banda simple. Debido a que ambos marcadores no presentaron un patrón multialelo son susceptibles para ser utilizados como marcadores AFLP a nivel de variedad mediante un rediseño de los iniciadores SCAR. Incluyendo en dicho rediseño de iniciadores los sitios de restricción que generaron su polimorfismo inicialmente en el perfil AFLP, los tres nucleótidos selectivos y aprovechando ahora el conocimiento de la secuencia interna completa de ambos marcadores proporcionado por el trabajo de caracterización de cada marcador AFLP.

El uso de RAPD para desarrollar marcadores específicos como son los marcadores SCAR ha sido ampliamente reportado incluso por la publicación original de Parán & Michelmore (1993). Así, en diversos estudios el éxito en el desarrollo de marcadores específicos para identificación vegetal es debida a una extensión de los iniciadores originalmente utilizados al generar el perfil genómico para no perder el polimorfismo inicialmente detectado y volverlos más específicos (Das *et al.*, 2005; Zhang y Stommel, 2001; Vidal *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004).

Sin embargo, la extensión de tales iniciadores únicamente es reportado en marcadores SCAR derivados de RAPD, al generar marcadores SCAR derivados de AFLP, es importante considerar que una extensión de iniciadores inespecíficos de la preamplificación, no es viable ya que contienen secuencias adaptadoras (artificiales) ajenas al genoma estudiado. Entonces, se optaría por únicamente incluir el sitio de restricción completo, así como los tres nucleótidos selectivos en ambos extremos flanqueantes de cada fragmento de AFLP caracterizado y tomar de 15-20 pb de la secuencia interna caracterizada como lo reportan Xu *et al.*, 2001. Incluyendo así, la secuencia completa de los sitios de restricción en los extremos flanqueantes de cada marcador AFLP en los iniciadores específicos rediseñados.

La probabilidad de encontrar un marcador de AFLP cuya secuencia interna también sea polimórfica es muy baja, Shirasawa *et al.* (2004) reportaron que a pesar de que identificaron 84 marcadores de AFLP polimórficos entre dos variedades de *Oryza sativa*, únicamente 14 fueron exitosamente convertidos a marcadores SCAR y siete marcadores de AFLP no fueron convertidos a marcadores de secuencia específica debido a que las secuencias que cubren dichos marcadores de AFLP (secuencias internas) fueron las mismas para ambas variedades. En el estudio anterior se sugiere que la mayoría de los polimorfismos identificados son debidos a mutaciones puntuales en los sitios de restricción, ya sea en los extremos flanqueantes del marcador AFLP ó en su secuencia interna y que la consideración de otras técnicas que incluyan ésta clase de polimorfismos mejorarían el proceso de conversión de marcadores de AFLP a marcadores de secuencia específica.

El resultado obtenido durante la validación de los iniciadores SCAR en *A. tequilana* Weber sugiere que el polimorfismo a nivel de variedad evidenciado en los perfiles de AFLP fue originado por la presencia de sitios de restricción conservados para una determinada variedad pero diferentes en comparación con el resto de las variedades. Posiblemente sea del tipo de mutación puntual, coincidente con lo reportado por Shirasawa *et al.* (2004). Sin embargo, es importante también recalcar que en general se observaron homoplásias en los fragmentos de AFLP caracterizados en *Agave*.

Finalmente, debido a que dicho polimorfismo en los marcadores de AFLP fue presentado en todo el bloque genético formado por 10 individuos diferentes de cada variedad, se sugiere que tal polimorfismo presente en todos los individuos analizados uno por uno, se encuentra también presente en cada determinada variedad. Probablemente, el polimorfismo evidenciado que provocara la evasión de las endonucleasas en los sitios de restricción para cada variedad sean causadas por mutaciones también conservadas a nivel de variedad que fueran acumuladas y fijadas en cada una de las variedades de la especie *A tequilana* Weber.

De acuerdo a la teoría neutralista de la evolución molecular formulada por Motoo Kimura (1968), a nivel del ADN, un factor importante para explicar la evolución (especiación) es la tasa de mutación y la deriva genética. Las mutaciones que sufren los individuos en una población suelen ser, según la teoría neutralista, neutras ó deletéreas. Si son deletéreas, son eliminadas rápidamente de la población, pero si son mutaciones neutras, es decir, si los individuos que las tienen funcionan tan bien como los que no la tienen (mutaciones puntuales en ADN redundante), entonces su éxito en la población depende del azar, y de la deriva genética. Según Kimura, la variación genética y el polimorfismo de las poblaciones es un estado transitorio en el proceso de fijación de alelos neutros (Ohta, 2002; Ohta y Gillespie, 1996; Ohta, 1992; Kimura, 1986; Kimura, 1983; Ohta, 1973; Kimura, 1968).

En base a lo anterior y desde el punto de vista biológico, se sugiere que dicha evasión de las endonucleasas provocada por una posible mutación puntual, no sólo sea una mutación individual sino que sea uno de tantos cambios que ocurrieron en el genoma

durante la divergencia genética que originó otras variedades en la especie *Agave tequilana* Weber. En adición a lo anterior, se han propuesto dos modelos ó mecanismos de especiación, el modelo de especiación ecológica y el modelo de especiación por mutación de orden (Nosil y Flaxman, 2011; Schluter, 2009). El segundo modelo, nos brinda una idea de cómo pudiera suceder la divergencia genética que origina nuevas especies por medio de aislamiento reproductivo y mediante la condición de que dicha mutación brinde una aptitud ventajosa en algún momento de presión selectiva donde la mutación azarosa arrastrada ó barrida mediante deriva génica entre generaciones pueda tomar importancia ante alguna presión selectiva ó bien solamente ser un rezago neutro en el genoma (Nosil y Flaxman, 2011; Schluter, 2009; Bengtsson y Christiansen, 1983).

Finalmente y en base a nuestros resultados, concluimos que para poder caracterizar mediante marcadores simples la identidad genética entre variedades de la especie *A. tequilana* Weber se sugiere por un lado, caracterizar un mayor número de bandas de AFLP específicas a nivel de variedad hasta encontrar aquella que tenga algún polimorfismo en su secuencia interna, probar otras combinaciones de nucleótidos selectivos y desarrollar nuevos geles de poliacrilamida para su estudio. De acuerdo a la literatura, se prueban entre 100 y 300 combinaciones de nucleótidos selectivos para encontrar un polimorfismo adecuado que resulte en un marcador SCAR (Shirasawa *et al.*, 2004; Busconi *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2001) sin embargo lo anterior se mantenía fuera de nuestro alcance en cuanto a tiempo y recursos. Por otro lado, es posible aprovechar la mutación puntual que originó la aparición o pérdida del sitio de restricción responsable del polimorfismo y utilizarlo para generar mapas de SNPs para diferenciar entre variedades.

Los polimorfismos detectados por los sitios de restricción debieran ser utilizados en un rediseño de iniciadores específicos considerando las secuencias internas caracterizadas de los fragmentos de AFLP en conjunto con los tres nucleótidos selectivos y la secuencia restrictiva. Así, debieran ser incluidos en la secuencia de los iniciadores específicos dichos elementos como una alternativa para así conservar el polimorfismo originalmente detectado, pero confiriéndole más especificidad al loci AFLP originalmente detectado presente en una determinada variedad de *A. tequilana* Weber de entre las otras variedades ensayadas.

V. CONCLUSIONES

Se caracterizaron varios fragmentos de AFLP contenidos en bandas específicas a las variedades Chato, Sigüin y Moraleño en la especie *A. tequilana* Weber. Adicionalmente, cada banda caracterizada se encontró ausente en los bloques genéticos de las especies: *A. fourcroydes*, *A. sisalana* y *A. angustifolia*.

Considerando seis pares de iniciadores diseñados específicos a dichos marcadores de AFLP, los cuales fueron validados en ADN genómico de cada variedad de *A. tequilana* Weber, únicamente tres pares de iniciadores específicos detectaron un alelo simple y no desplegaron un patrón multialélico.

VI. REFERENCIAS

- AGARWAL, M., N. SHRIVASTAVA Y H. PADH (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 27: 617–631.
- BARRET, P., R. DELOURME, N. FOISSET, M. RENARD (1998). Development of a SCAR (sequence characterized amplified region) marker for molecular tagging of the dwarf BREIZH (Bzh) gene in *Brassica napus* L. *Theor Appl Genet.* 97: 828-833.
- BASHA, S.D. & SUJATHA (2007). Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica.* 156: 375-386.
- BASSAM, B.J., G. CAETANO-ANOLLÉS & P.M. GRESSHOFF (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal biochem.* 196: 80-83.
- BAUTISTA, R., R. CRESPILO, F.M. CANOVAS Y M. GONZALO- CLAROS (2002). Identification of olive-tree cultivars with SCAR markers. *Euphytica.* 129: 33–41.
- BENGTSSON, B.O., F.B. CHRISTIANSEN (1983). A two-locus mutation—Selection model and some of its evolutionary implications. *Theor Popul Biol.* 24: 59-77.
- BIRNBOIM, H.C. Y DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- BONIN, A., E.BELLEMAIN, P.BRONKEN EIDSEN, F.POMPANON, C. BROCHMANN YP. TABERLET (2004). How to track and assess genotyping errors in population genetic studies. *Mol. Ecol.* 13: 3261-3273.
- BOUKAR, O., L. KONG, B. SINGH, L. MURDOCK Y H. OHM (2004). AFLP and AFLP-derived SCAR markers associated with *Striga gesnerioides* resistance in cowpea. *Crop Sci.* 44: 1259-1264.
- BUSCONI, M., L. SEBASTIANI Y C. FOGHER (2006). Development of SCAR markers for germoplasma characterization in olive tree (*Olea europea* L.). *Mol Breeding.* 17: 59-68.

- CHE, K.P., Y. XU, C.Y. LLANG, G.Y. GONG, M.L. WENG, H.Y. ZHANG, D.M. JIN Y B. WANG (2003). AFLP fingerprint and SCAR marker of watermelon core collection. *Acta bot sin.* 45: 731-735.
- DAS, M., S. BHATTACHARYA Y A. PAL (2005). Generation and characterization of SCAR by cloning and sequencing of RAPD products: a strategy for species-specific marker development in bamboo. *Ann Bot.* 95: 835-841.
- DEVAIAH, K.M. Y VENKATASUBRAMANIAN, P. (2008). Development of SCAR marker for authentication of *Pueraria tuberosa* (Roxb.ex.Willd). *Curr Sci.* 94: 1306-1309.
- DEMEY, J.R., E. GAMEZ, S.MOLINA Y D. INFANTE (2004). Comparative study of the discriminating capacity of AFLP and ISTR markers for genetic analysis of *Agave fourcroydes*. *Plant Mol Biol Rep.* 22: 29-35.
- FILHO, S.M., C. SIGUEYUKI-SEDIYAMA, M. ALVES-MOREIRA Y E. GONZALES DE BARROS (2002). RAPD and SCAR markers linked to resistance to frog-eye leaf spot in soybean. *Genet Mol Biol.* 25: 317-321.
- GIL-VEGA, K., C. DÍAZ, A. NAVA-CEDILLO, J. SIMPSON (2006). AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Sci.* 170: 904–909.
- GONZÁLEZ, G., S. ALEMÁN Y D. INFANTE (2003). Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in clonally propagated population. *Plant Sci.* 165: 595-601.
- GUO, WANGZHEN, T. ZHANG, X. SHEN, J.Z. YUYR. J. KOHEL (2003). Development of SCAR Marker Linked to a Major QTL for High Fiber Strength and Its Usage in Molecular-Marker Assisted Selection in Upland Cotton. *Crop Sci.* 43: 2252–2256.
- HALL, T.A., (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- HERNÁNDEZ, P., A. MARTIN & G. DORADO (1999). Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products: a practical tool for the introgression and marker-assisted selection of wheat. *Mol Breeding.* 5: 245–253.

- INFANTE, D., G. GONZÁLEZ, L. PERAZA-ECHEVERRÍA, Y.M. KEB-LLANES (2003). Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Sci.* 164: 223-230.
- INFANTE, D., S. MOLINA, J. DEMEY Y E. GÁMEZ (2006). Asexual Genetic Variability in *Agavaceae* Determined with Inverse Sequence-Tagged Repeat and Amplification Fragment Length Polymorphism Analysis. *Plant Mol Biol Rep.* 24: 205–217.
- KALENDAR, R., D. LEE, Y A.H. SCHULMAN (2009). Fast PCR Software for PCR Primer and Probe Design & Repeat Search. *Genes Genome Genomics.* 3: 1-14.
- KE-LIPING, S. YUQIANG, L. PINGWU & Y. GUANG SHENG (2004). Identification of AFLP fragments linked to one recessive genic male sterility (RGMS) in rapeseed (*Brassica napus* L.) and conversion to SCAR markers for marker-aided selection. *Euphytica.* 138: 163–168.
- KIMURA, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature.* 217: 624–626.
- KIMURA, M. (1983). *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- KIMURA, M. (1986). DNA and the Neutral Theory. *Philos Trans R Soc London [Biol].* 312: 343–354.
- LAMBOY, W.F. (1994). Computing genetic similarity coefficients from RAPD data; the effects of PCR artifacts. *PCR Methods Appl.* 4: 31-37.
- LEE, P.G., C.H. LEE Y.C.S. KIM (2004). Molecular markers derived from RAPD, SCAR and the conserved 18S rDNA sequences for classification and identification in *Pyrus pyrifolia* and *P.communis*. *Theor Appl Gent.* 108: 1487-1491.
- MARINIELLO, L., M.G. SOMMELLA, A. SORRENTINO, M. FORLANIY R. PORTA (2002). Identification of *Prunus armeniaca* cultivars by RAPD and SCAR markers. *Biotechnol Lett.* 24: 749–755.

- NEGI, M.S., M. DEVIC, M. DELSEN Y M. LAKSHMIKUMARAN (2000). Identification of AFLP fragments linked to seed coat color in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. *Theor Appl Genet.* 101: 146-152.
- NIKAIDO, A., H.YOSHIMURA, Y.TSUMURA, Y.SUYAMA, M.MURAI Y K.NAGASAKA (1999). Segregation distortion for AFLP markers in *Cryptomeria japonica*. *Genes Genet. Syst.* 74: 55-59.
- NOSIL, P., Y S.M. FLAXMAN (2011). Conditions for mutation-order speciation. *Proc R Soc B.* 278: 399-407.
- O'HANLON P.C. Y PEAKALL R. (2000). A simple method for the detection of size homoplasy among amplified fragment length polymorphism fragments. *Mol Ecol.* 9: 815-816.
- OHTA, T. (1973). Slightly deleterious mutant substitutions in evolution. *Nature.* 246: 96–98.
- OHTA, T. (1992). The nearly neutral theory of molecular evolution. *Annu Rev Ecol Syst.* 23: 263–286.
- OHTA, T., Y J.H. GILLESPIE (1996). Development of Neutral and Nearly Neutral Theories. *Theor Popul Biol.* 49: 128–142.
- OHTA, T. (2002). Near-neutrality in evolution of genes and gene regulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 16134–16137.
- PARAN, I., & MICHELMORE, R.W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet.* 85: 985-993.
- SCHLUTER, D. (2009). Evidence for Ecological Speciation and Its Alternative. *Science.* 323: 737-741.
- SHIRASAWA, K., S. KISHITANI Y T. NISHIO (2004). Conversion of AFLP markers to sequence-specific markers for closely related lines in rice by use of the rice genome sequence. *Mol Breeding.* 14: 283-292.

- UNTERGASSER, A., H. NIJVEEN, X. RAO, T. BISSELING, R. GEURTS, Y.J.A.M. LEUNISSEN (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 35: W71-W74 (suppl 2).
- VEKEMANS, X., T.BEAUWENS, M.LEMAIRE & I.ROLDÁN-RUIZ (2002). Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasmy and of a relationship between degree of homoplasmy and fragment size. *Mol Ecol.* 11: 139-151.
- VIDAL, J.R., P. DELAVAUULT, M. COARER, Y A. DEFONTAINE (2000). Design of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivar-specific SCAR primers for PCR fingerprinting. *Theor Appl Genet.* 101: 1194–1201.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER Y M. ZABEAU (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407–4414.
- WONG, A., M.R. FORBES Y M.L. SMITH (2001). Characterization of AFLP markers in damselflies: prevalence of codominant markers and implications for population genetic applications. *Genome.* 44: 677-684.
- XU, M., E. HUARACHA Y S.S. KORBAN (2001). Development sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the Vf gene in apple. *Genome.* 44: 63-70.
- YE Q., Q. YING-XIONG, Q. YAN-QI, C. JIAN-XIN, Y. SHU-ZHEN, Z. MING-SHUI Y F. CHENG-XIN (2006). Species-Specific SCAR marker for authentication of *Sinocalycanthus chinensis*. *J Zhejiang Univ-Sci B.* 7(11):868-872.
- ZHANG, Z., M. GUO Y J. ZHANG (2009). Identification of AFLP fragments linked to hydroxysafflor yellow A in *Flos Carthami* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. *Mol Breeding.* 23: 229-237.

ZHANG, Y., Y STOMMEL J. R. (2001). Development of SCAR and CAPS Markers Linked to the *Beta* Gene in Tomato. *Crop Sci.* 41: 1602–1608.

CAPITULO III. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

I. DISCUSIÓN GENERAL

En estudios de identidad vegetal el encontrar fragmentos del mismo tamaño y diferente secuencia de sus bases (homoplásicos) en una misma banda polimórfica puede aumentar la posibilidad de descubrir una secuencia de utilidad que sea específica a alguna especie vegetal ó rasgo varietal. La implicación más grave del fenómeno de la homoplasia en estudios poblacionales ó de evolución es que puede ser una fuente de error (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005; Tautz y Schlotterer, 1994). Éste es un tipo de polimorfismo detectable únicamente por secuenciación puede pasar inadvertido en caso de analizar individuos mediante amplificación por PCR y electroforesis para asignar tamaños. Esta fuente de imprecisión en la genotipificación con marcadores AFLP raramente es tomada en cuenta, sin embargo trabajos recientes señalan la comigración de fragmentos no homólogos como causa potencial de error en estudios de este tipo (O'Hanlon y Peakall, 2000; Vekemans *et al.*, 2002; Bonin *et al.*, 2004).

La técnica de AFLP permite el análisis genómico diferencial mediante la identificación de polimorfismos originados por mutaciones en los sitios de restricción. Si el polimorfismo en las variedades Chato, Sigüin y Moraleño evidenciado en los perfiles AFLP es por dicha causa la aplicación de otras técnicas como SSCP (*polimorfismo conformacional de hebra simple* por sus siglas en inglés), ó SSCP-SNP permitiría evaluar mutaciones puntuales de tipo SNP, como ya ha sido ampliamente reportado en diferentes estudios (Bertin *et al.* 2005; Castelblanco y Fregene, 2006). En cualquier caso la identificación de secuencias relacionadas con cambios en el genoma que hayan contribuido a la especiación en las diferentes variedades de *A. tequilana* Weber como las mutaciones en los sitios de restricción ó bien algún otro cambio en el genoma que haya provocado la evasión de las endonucleasas, serían relevante para el desarrollo de marcadores para identificación vegetal en especies de *Agave*.

La conversión de los fragmentos AFLP a SCAR permite trabajar a mayor escala y sus aplicaciones a nivel locus específico expanden de manera considerable el potencial de la

técnica, ello es particularmente importante para la identificación de las diferentes variantes de las especies de *Agave* donde se reconocen citotipos diversos (Palomino *et. al.*, 2003; Moreno-Salazar *et. al.*, 2007; Palomino *et. al.*, 2008). En base a nuestros resultados obtenidos con los SCAR diseñados y considerando únicamente la secuencia interna de los fragmentos AFLP caracterizados observamos que se perdió la especificidad varietal de las bandas estudiadas. Esto, debido a que las secuencias internas de los fragmentos AFLP caracterizados estuvieron presentes en todas las variedades evaluadas de la especie *A tequilana*. Así, el único polimorfismo detectado para identificar cada variedad con el método de AFLP se encuentra en los sitios de restricción y no en su secuencia interna ó a lo largo de ella. De acuerdo a todo lo anterior, es conveniente realizar el rediseño de iniciadores SCAR los cuales deberán contener las secuencias de los sitios de restricción encontrada entre las variedades de *A tequilana* estudiadas, donde tales secuencias restrictivas son propias de una determinada variedad.

II. CONCLUSIONES GENERALES

La caracterización de las secuencias internas de los marcadores AFLP es de utilidad para el estudio de regiones del genoma en *Agave* donde se evidenciaron polimorfismos a nivel varietal.

El conocimiento de secuencias de entre ~100 pb y ~250 pb, fue suficiente para amplificar de una manera específica el locus marcador en las variedades de la especie de *A tequilana* Weber en comparación con los iniciadores utilizados que generaron un perfil complejo de AFLP.

Durante la validación del total de los iniciadores específicos, únicamente los iniciadores SCR_05 y SCR_06, diseñados mediante la secuencia consenso para varios fragmentos encontrados en el marcador G299-Sg240 específico de la variedad Sigüin, amplificaron una banda única presente en cada una de las cuatro variedades evaluadas de la especie *A tequilana* Weber, con ausencia de productos de amplificación inespecíficos y/o alelos alternativos.

III. PERSPECTIVAS

Las secuencias internas de AFLP caracterizadas pueden ser de utilidad para el estudio de regiones del genoma donde se evidenciaron polimorfismos a nivel de variedad. Mediante la aplicación de otras técnicas como la PCR inversa (Bensch *et al.*, 2002), PCR anclaje-Genome Walking (Brugmans *et al.*, 2003), se puede rediseñar pares de iniciadores que tengan sus secuencias en regiones externas a las secuencias caracterizadas. Inclusive, se ha reportado que el uso de otras técnicas para diseñar pares de iniciadores en secuencias externas a las encontradas en las bandas AFLP incrementan grandemente la eficiencia de conversión de éstos marcadores a marcadores de secuencia específica como lo son los marcadores SCAR y CAPS (Shirasawa *et al.*, 2004).

En futuros trabajos se recomienda considerar los sitios de restricción en las secuencias de los iniciadores específicos para no perder la especificidad originalmente detectada de los polimorfismos entre variedades durante el desarrollo de marcadores SCAR cuando se parte de un despliegue genómico con AFLP.

IV. REFERENCIAS

- ARANGUREN-MÉNDEZ J. A., R. ROMÁN-BRAVO, W. ISEA, Y. VILLASMIL, Y J. JORDANA (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Arch Latinoam Prod Anim. 2005. 13: 30-42.
- BENSCH S., S. AKESSON Y D.E. IRWIN (2002). The use of AFLP to find an informative SNP: genetic differences across a migratory divide in willow warblers. Mol Ecol. 11: 2359–2366.
- BRUGMANS B., R.G.M. VAN-DER-HULST, R.G.F. VISSER, P. LINDHOUT Y H.J. VAN-ECK (2003). A new and versatile method for the successful conversion of AFLP markers into simple single locus marker. Nucleic Acid Res. 31: 1-9 (e55).
- BERTIN I., J. H. ZHU, M. D. GALE (2005). SSCP-SNP in pearl millet a new marker system for comparative genetics. Theor Appl Genet. 110: 1467–1472.
- BONIN A., E. BELLEMAIN, E.P. BRONKEN, F. POMPANON, C. BROCHMANN Y P. TABERLET (2004). How to track and assess genotyping errors in population genetic studies. Mol Ecol. 13: 3261-3273.
- CASTELBLANCO W. Y M. FREGENE (2006). SSCP-SNP-based conserved orthólogo set COS Markers for comparative genomics in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Plant Mol Biol Rep. 24: 229-236.
- MORENO-SALAZAR S.F., M. ESQUEDA, J. MARTÍNEZ Y G. PALOMINO (2007). Tamaño del genoma y cariotipo en *Agave angustifolia* y *A. rhodacantha* de sonora, México. Rev. Fitotec. Mex. 30: 13 – 23.
- O' HANLON P.C. Y R. PEAKALL (2000). A simple method for the detection of size homoplasy among amplified fragment length polymorphism fragments. Mol Ecol. 9: 815-816.
- PALOMINO, G., J. DOLEZEL, I. MÉNDEZ Y A. RUBLUO (2003). Nuclear genome size analysis of *Agave tequilana* Weber. Caryología. 56: 37-46.
-

PALOMINO, G., J. MARTÍNEZ Y I. MÉNDEZ (2008). Karyotype studies in cultivars of *Agave tequilana* Weber. *Caryología*. 61: 144-153.

SHIRASAWA, K., S. KISHITANI Y T. NISHIO (2004). Conversion of AFLP markers to sequence-specific markers for closely related lines in rice by use of the rice genome sequence. *Mol Breeding*.14:283-292.


TAUTZ, D. Y C. SCHLOTTERER (1994). Simple sequences. *Curr. Opinion Genet Develop.* 4: 832-837.

VEKEMANS X., BEAUWENS T., LEMAIRE M. Y ROLDAN-RUIZ I. (2002). Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Mol Ecol.* 11: 139-151.

ANEXO A. Análisis de los Perfiles de AFLP en diferentes especies de *Agave* y en diferentes variedades de *Agave tequilana*.

GEL 01


BANDAS ESPECÍFICAS		PRIMER ESCANEADO DE BANDAS DE AFLP		CARACTERÍSTICAS DE IDENTIFICACION				<i>A. tequilana</i>		<i>Agave spp.</i>	
MARCADOR SCAR	No. BANDA	PERFIL AFLP PROCEDENTE	TAMAÑO (pb)	Azul	Siaguá	Moraleño	Chato	<i>A. angustifolia</i>	<i>A. sisalana</i>	<i>A. marginata</i>	<i>A. fourcroydes</i>
PF01-064	64	FERFIL_01_ACG/CTT	320 pb					+			
PF01-073	73	FERFIL_01_ACG/CTT	150 pb								+
PF01-071	71	FERFIL_01_ACG/CTT	350 pb								+
PF01-070	70	FERFIL_01_ACG/CTT	420 pb								+
PF01-074	74	FERFIL_01_ACG/CTT	250 pb			+					
PF01-077	77	FERFIL_01_ACG/CTT	280 pb				+				
PF01-076	76	FERFIL_01_ACG/CTT	300 pb				+				
PF01-075	75	FERFIL_01_ACG/CTT	350 pb				+				
PF01-069	69	FERFIL_01_ACG/CTT	130 pb							+	
PF01-068	68	FERFIL_01_ACG/CTT	180 pb							+	
PF01-067	67	FERFIL_01_ACG/CTT	190 pb							+	
PF01-066	66	FERFIL_01_ACG/CTT	210 pb							+	
PF01-065	65	FERFIL_01_ACG/CTT	240 pb							+	


 BANDAS DE NO PRIORIDAD.
(Descartadas para el escaneo de selección de bandas AFLP)

 SIGNIFICA PRESENCIA DE UNA BANDA EN PARTICULAR.

ANEXO A. Continuación.**GEL 02**


BANDAS ESPECIFICAS		PRIMER ESCANEADO DE BANDAS DE AFLP		CARACTERISTICAS DE IDENTIFICACION				<i>A. tequilana</i>			
MARCADOR SCAR	No. BANDA	PERFIL AFLP PROCEDENTE	TAMAÑO (pb)	Azul	Siguin	Moreleño	Chato	<i>A. angustifolia</i>	<i>A. sisalana</i>	<i>A. marginata</i>	<i>A. fourcroydes</i>
PF02-085	85	PERFIL_02_ACG/CAC	290 pb	+							
PF02-084	84	PERFIL_02_ACG/CAC	500 pb	+							
PF02-087	87	PERFIL_02_ACG/CAC	190 pb					+			
PF02-086	86	PERFIL_02_ACG/CAC	370 pb					+			
PF02-089	89	PERFIL_03_ACG/CAC	450 pb						+		
PF02-090	90	PERFIL_02_ACG/CAC	350 pb						+		
PF02-091	91	PERFIL_02_ACG/CAC	270 pb						+		
PF02-092	92	PERFIL_02_ACG/CAC	180 pb						+		
PF02-094	94	PERFIL_02_ACG/CAC	300 pb							+	
PF02-095	95	PERFIL_02_ACG/CAC	420 pb								+
PF02-096	96	PERFIL_02_ACG/CAC	110 pb								+
PF02-098	98	PERFIL_02_ACG/CAC	600 pb		+						
PF02-099	99	PERFIL_02_ACG/CAC	250 pb		+						
PF02-097	97	PERFIL_02_ACG/CAC	500 pb		+						
PF02-100	100	PERFIL_02_ACG/CAC	190 pb			+					

 BANDAS DE NO PRIORIDAD.
(Descartadas para el escaneo de selección de bandas AFLP)

 SIGNIFICA PRESENCIA DE UNA BANDA EN PARTICULAR.

ANEXO A. Continuación.**GEL 04**


BANDAS ESPECIFICAS		PRIMER ESCANEEO DE BANDAS DE AFLP		CARACTERISTICAS DE IDENTIFICACION				<i>A. tequilana</i>				<i>Agave spp.</i>			
MARCADOR SCAR	No. BANDA	PERFIL AFLP PROCEDENTE	TAMAÑO (pb)	Azul	Siaguin	Moraleño	Chato	<i>A. angustifolia</i>	<i>A. sisalana</i>	<i>A. marginata</i>	<i>A. fourcroydes</i>				
PF04-78	78	PERFIL_04_ACG/CAG	260 pb					+							
PF04-79	79	PERFIL_04_ACG/CAG	120 pb						+						
PF04-80	80	PERFIL_04_ACG/CAG	650 pb							+					
PF04-81	81	PERFIL_04_ACG/CAG	380 pb							+					
PF04-82	82	PERFIL_04_ACG/CAG	400 pb												+
PF04-83	83	PERFIL_04_ACG/CAG	110 pb				+								


 BANDAS DE NO PRIORIDAD.
(Descartadas para el escaneo de selección de bandas AFLP)

 SIGNIFICA PRESENCIA DE UNA BANDA EN PARTICULAR.

ANEXO A. Continuación.**GEL 05**


BANDAS ESPECIFICAS		PRIMER ESCANEADO DE BANDAS DE AFLP		CARACTERÍSTICAS DE IDENTIFICACION				<i>A. tequilana</i>				<i>Agave spp.</i>			
MARCADOR SCAR	No. BANDA	PERFIL AFLP PROCEDENTE	TAMAÑO (pb)	Azul	Siaguir	Moraleño	Chato	<i>A. angustifolia</i>	<i>A. sisalana</i>	<i>A. marginata</i>	<i>A. fourcroydes</i>				
PF05-101	101	PERFIL_05_ACA/CAC	290 pb					+							
FF05-102/120	102/120	PERFIL_05_ACA/CAC	150 pb				+	+							
FF05-103/109	103/109	PERFIL_05_ACA/CAC	240 pb				+		+						
FF05-104/110	104/110	PERFIL_05_ACA/CAC	190 pb				+		+						
PF05-107	107	PERFIL_05_ACA/CAC	150 pb			+									
PF05-106	106	PERFIL_05_ACA/CAC	190 pb			+									
PF05-108	108	PERFIL_05_ACA/CAC	250 pb				+								
PF05-140 (negro)	/N(negro)	PERFIL_05_ACA/CAC	280 pb			+									

 BANDAS DE NO PRIORIDAD.
(Descartadas para el escaneo de selección de bandas AFLP)

 SIGNIFICA PRESENCIA DE UNA BANDA EN PARTICULAR.

ANEXO A. Continuación.**GEL 06**

BANDAS ESPECIFICAS		PRIMER ESCANEO DE BANDAS DE AFLP		CARACTERISTICAS DE IDENTIFICACION				<i>A. tequilana</i>			
MARCADOR SCAR	No. BANDA	PERFIL AFLP PROCEDENTE	TAMAÑO (pb)	Azul	Siguin	Moraieño	Chato	<i>Agave spp.</i>			
								<i>A. angustifolia</i>	<i>A. sisakana</i>	<i>A. marginata</i>	<i>A. fourcroydes</i>
PF06-122	122	PERFIL_06_AAC/CAG	110 pb					+			
PF06-121	121	PERFIL_06_AAC/CAG	190 pb					+			
PF06-123	123	PERFIL_06_AAC/CAG	210 pb						+		
PF06-124	124	PERFIL_06_AAC/CAG	130 pb						+		
PF06-126	126	PERFIL_06_AAC/CAG	250 pb							+	
PF06-125	125	PERFIL_06_AAC/CAG	300 pb							+	
PF06-127	127	PERFIL_06_AAC/CAG	600 pb								+
PF06-128	128	PERFIL_06_AAC/CAG	390 pb								+
PF06-129	129	PERFIL_06_AAC/CAG	250 pb								+
PF06-130	130	PERFIL_06_AAC/CAG	260 pb								+
PF06-131	131	PERFIL_06_AAC/CAG	180 pb								+
PF06-132	132	PERFIL_06_AAC/CAG	130 pb								+
PF06-133	133	PERFIL_06_AAC/CAG	113 pb								+
PF06-134	134	PERFIL_06_AAC/CAG	140 pb			+					
PF06-135	135	PERFIL_06_AAC/CAG	398 pb				+				

 BANDAS DE NO PRIORIDAD.
(Descartadas para el escaneo de selección de bandas AFLP)

 SIGNIFICA PRESENCIA DE UNA BANDA EN PARTICULAR.

ANEXO B. Fragmentos de AFLP caracterizados en *Agave tequilana* variedad Moraleño.

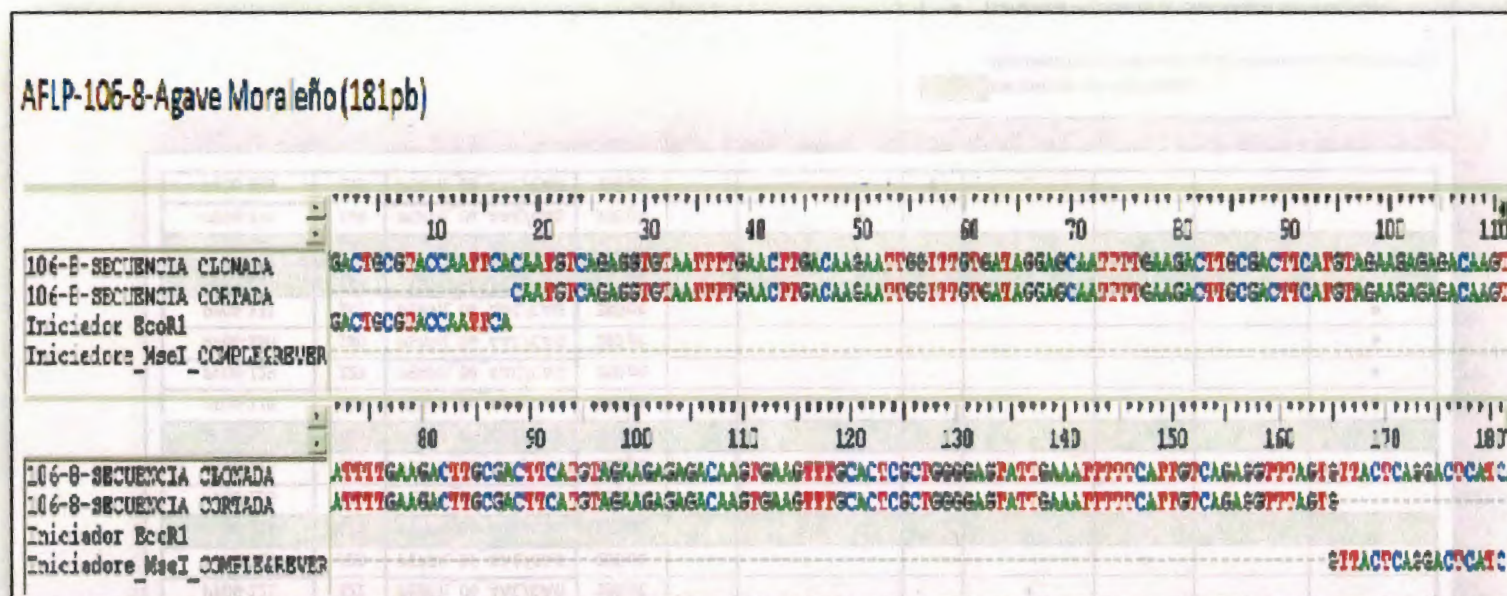


Figura 8. Alineamiento de verificación como Fragmento de AFLP-106, clona No. 8. *Secuencia clonada* (secuencia sin extremos izquierdo y derecho del plásmido pGEM-T), *Secuencia cortada* (secuencia utilizada para diseño de marcadores SCAR), *Preamplificación* (secuencia de iniciadores de la preamplificación); para el iniciador *MseI* la secuencia complementaria y reversa fue utilizada (BioEdit).

ANEXO B. Continuación.

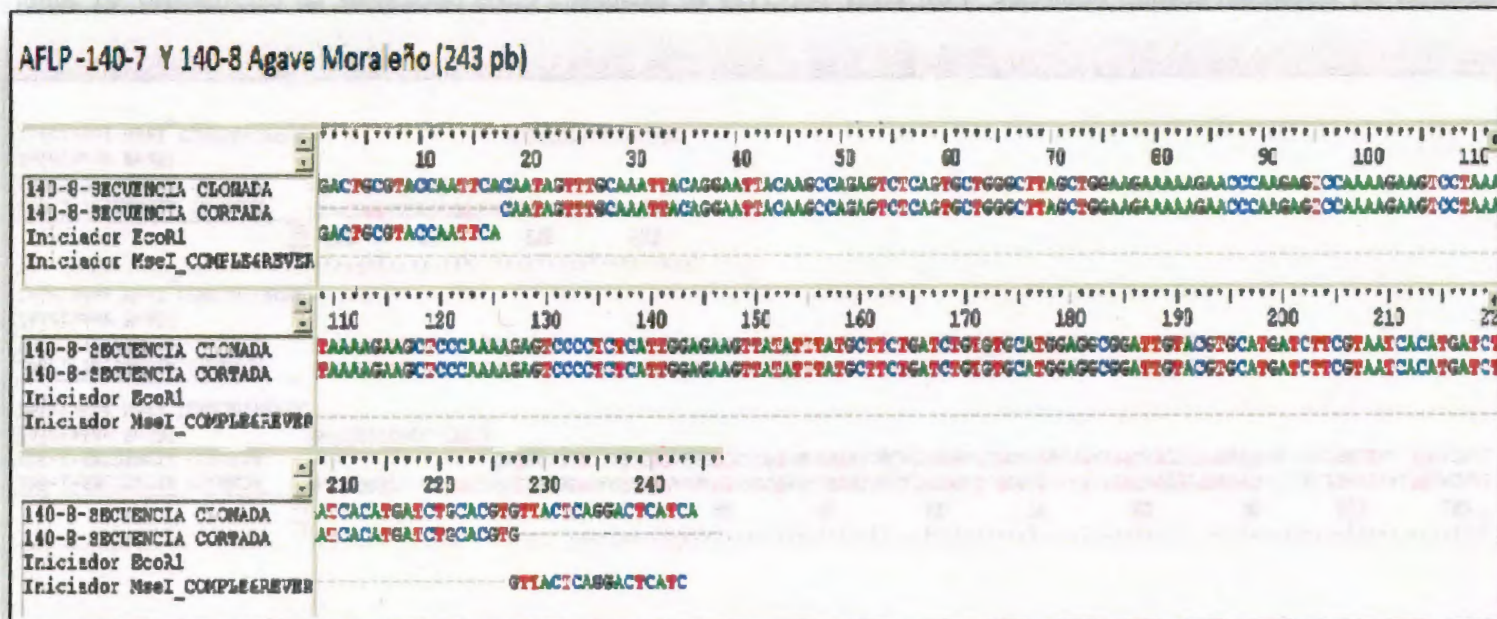


Figura 9. Alineamiento de verificación como Fragmento de AFLP- 140 (Moraleño), secuencia encontrada en clona No. 7 y 8. *Secuencia clonada* (secuencia sin extremos izquierdo y derecho del plásmido pGEM-T), *Secuencia cortada* (secuencia utilizada para diseño de marcadores SCAR), *Preamplificación* (secuencia de iniciadores de la preamplificación); para el iniciador MseI la secuencia complementaria y reversa fue utilizada (BioEdit).

ANEXO C. Fragmentos de AFLP caracterizados en *Agave tequilana* variedad Chato.

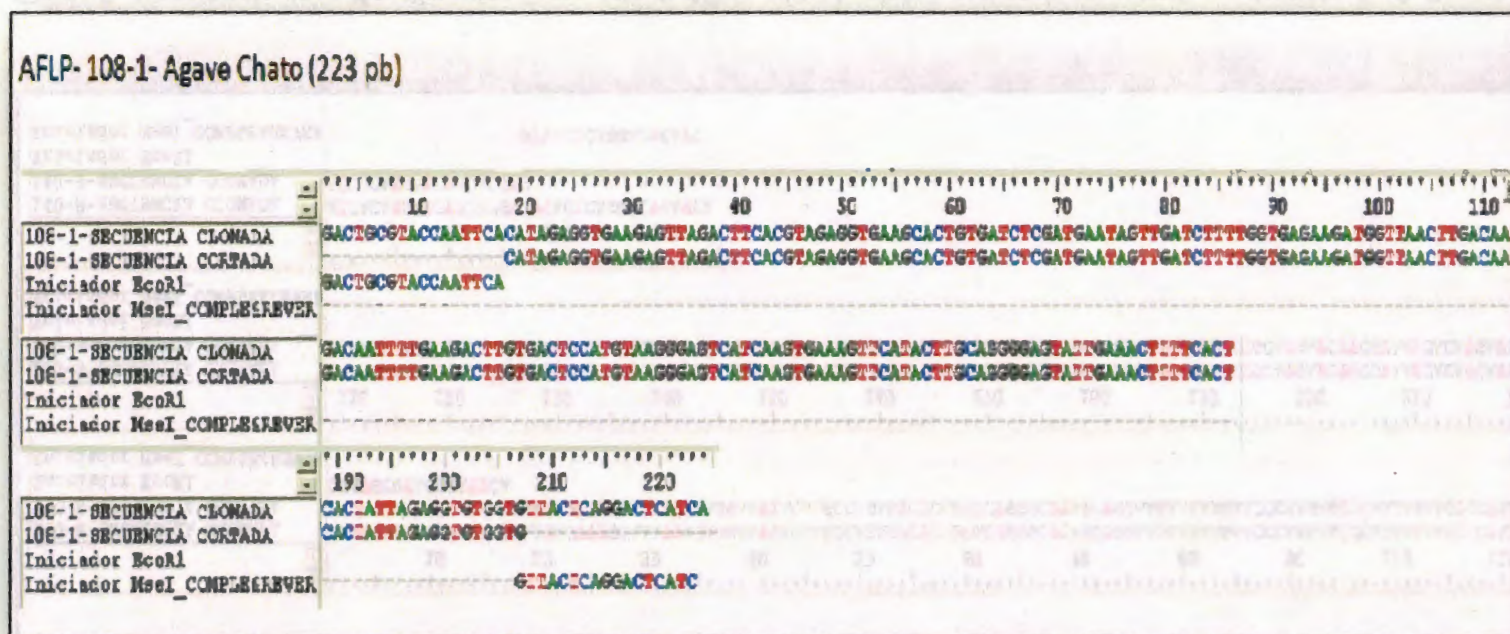


Figura 10. Alineamiento de verificación como Fragmento de AFLP-108, clona No.1. *Secuencia clonada* (secuencia sin extremos izquierdo y derecho del plásmido pGEM-T), *Secuencia cortada* (secuencia utilizada para diseño de marcadores SCAR), *Preamplificación* (secuencia de iniciadores de la preamplificación); para el iniciador *MseI* la secuencia complementaria y reversa fue utilizada (BioEdit).

ANEXO C. Continuación.

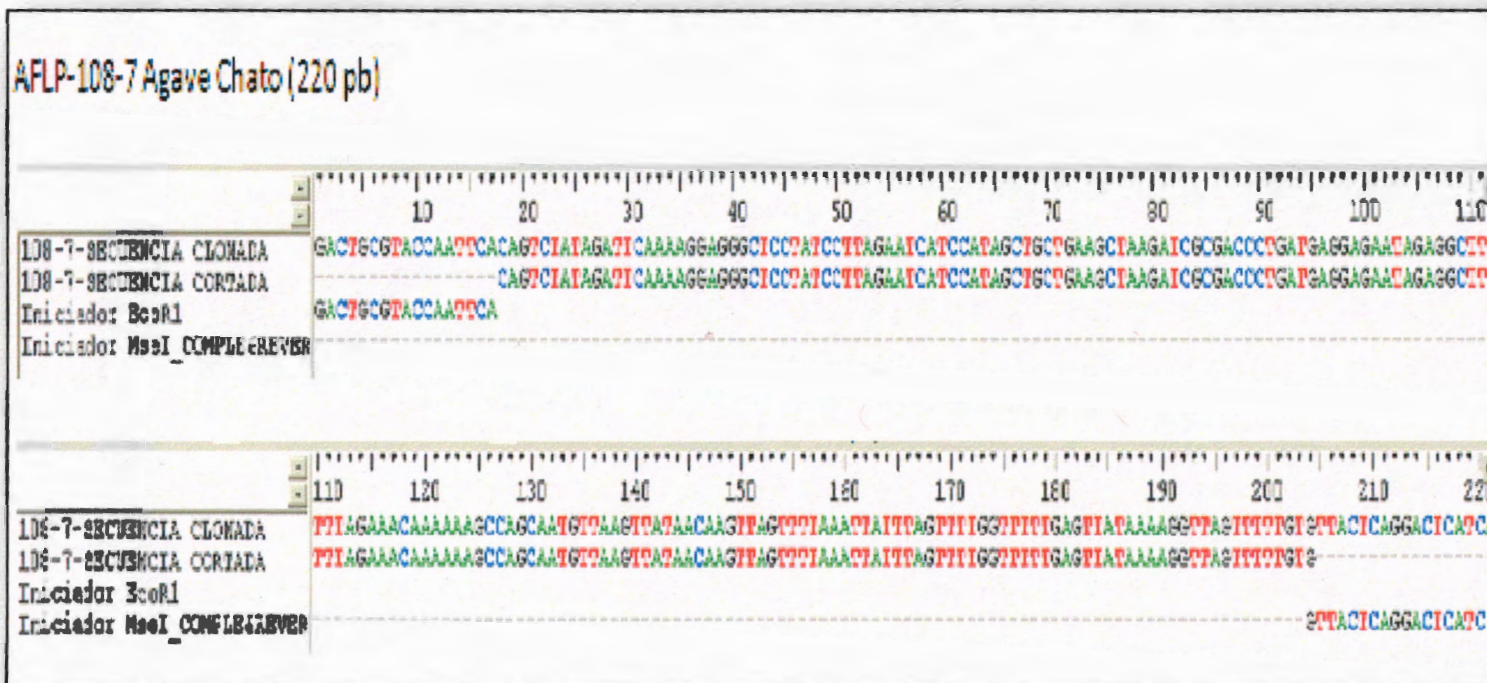


Figura 11. Alineamiento de verificación como Fragmento de AFLP-108, clona No.7. *Secuencia clonada* (secuencia sin extremos izquierdo y derecho del plásmido pGEM-T), *Secuencia cortada* (secuencia utilizada para diseño de marcadores SCAR), *Preamplificación* (secuencia de iniciadores de la preamplificación); para el iniciador *MseI* la secuencia complementaria y reversa fue utilizada (BioEdit).

