



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ANÁLISIS BIOQUÍMICO-ESTRUCTURAL DE DOS QUITINASAS
RECOMBINANTES DE *Agave tequilana* CON POSIBLE APLICACIÓN
BIOTECNOLÓGICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

ARELY MARTÍNEZ TORRES

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO
[Instituto de Química, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. ROSARIO A. MUÑOZ CLARES

[Facultad de Química](#)

DR. JORGE NIETO SOTELO

[Instituto de Biología](#)

Ciudad Universitaria, Mayo, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Ismael Bustos Jaimes

VOCAL: Lilian González Segura

VOCAL: Héctor Riveros Rosas

VOCAL: Gustavo Rodríguez Alonso

SECRETARIO: Agustín López Munguía Canales

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Química de Biomacromoléculas 3

Instituto de Química, UNAM

Dra. Adela Rodríguez Romero

Asesora

Q.A. Arely Martínez Torres

Sustentante

Comité tutorial

Dra. Rosario A. Muñoz Clares

Dr. Jorge Nieto Sotelo

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que ha permitido desarrollarme profesional y personalmente. Gracias a la Universidad cumplí el sueño de seguir estudiando.

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM, que a través de las personas que lo conforman, docentes e investigadores, permiten formar individuos con alta calidad académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (No. 759604) para la realización de mis estudios de maestría.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero que aceptó ser mi tutora de maestría, por abrirme las puertas de su laboratorio e integrarme a su equipo de trabajo y permitirme trabajar en este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Rosario A. Muñoz Clares y el Dr. Jorge Nieto Sotelo, quienes me guiaron durante el desarrollo de mi proyecto.

A los miembros del jurado de examen, el Dr. Ismael Bustos Jaimes, la Dra. Lilian González Segura, el Dr. Héctor Riveros Rosas, el Dr. Gustavo Rodríguez Alonso y el Dr. Agustín López Munguía Canales, por sus valiosas aportaciones y comentarios a mi trabajo escrito.

A la Dra. Patricia Cano Sánchez por toda su ayuda en la parte de biología molecular así como su valioso aporte de ideas.

Al Dr. José Rivera Chávez por proporcionarnos los cultivos fúngicos para los experimentos de inhibición antifúngica, así como permitirme el acceso a su laboratorio para la implementación de estos.

A la Dra. Annia Rodríguez Hernández por su incansable apoyo y asesoría en el laboratorio.

Al Instituto de Química (IQ) de la UNAM, sitio donde desarrolle mi proyecto, en particular el laboratorio de Química de Biomacromoléculas 3 y el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM).

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

De nueva cuenta y de manera personal a la Dra. Adela Rodríguez Romero, por sus enseñanzas, por siempre creer en mis ideas y por todo su apoyo brindado.

Al M. en C. Jesús E. Gutiérrez, quien fue mi maestro en la parte bioinformática de mi tesis, compañero a la distancia durante el periodo de contingencia sanitaria y amigo incasable. Gracias por siempre motivarme y creer en mí. Te quiero y admiro mucho.

Al M. en C. Miguel Alejandro Ramírez, quien fue un apoyo fundamental dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio de Química de Biomacromoléculas 3: Gaby Olvera, Jessica Terrón, Areli Silva, Jessica Rubalcava, Jannet Rubalcava y Benjamín García, que aunque compartimos un breve periodo de tiempo pude aprender muchísimo de cada uno. Les agradezco sus enseñanzas, consejos y compañía.

A mi equipo de trabajo de “Espacio Químico: Radar Farmacéutico” por brindarme mi primer oportunidad laboral y que, a través de esta, me permitieron obtener nuevas herramientas, enriqueciendo así mi trabajo escrito. Agradezco al gerente de innovación Alejandro Farias y al M. en C. Guillermo Roura, por sus valiosas enseñanzas. De igual forma a mis compañeros: Karol Huerta, Brian Serrato, Fernanda Muñoz, Fernando Esquivel, Raúl Tafolla y Katy Fonseca.

A mi familia, conformado por tres hermosas mujeres que me inspiran cada día. Todo lo que he logrado es por y para ustedes.

Finalmente, a mis amigos que siempre han estado ahí para apoyarme: Daniel Sánchez, Laura Martínez, Laura García, Laura Calixto, Geovanny Mulato, Milton Novelo y Manuela Nájera.

ABREVIATURAS

1KP: 1000 plant transcriptomes

ACN: Acetonitrilo

CBD: Dominio de unión a quitina

CEM: Cromatografía de exclusión molecular

CL: Proteína tipo quitinasa (chitinase-like)

CDS: Secuencia codificante (Coding Sequence)

CNGB: Banco Nacional de Genes de China (China National GeneBank)

DNS: Ácido dinitro salicílico

DO₆₀₀: Densidad óptica a longitud de onda de 600 nm

DRYAD: Repositorio digital Dryad (Dryad digital repository)

DS: Desviación estándar (Deviation estándar)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ESS: Tamaño de muestra efectiva (Effective sample size)

GH: Glicosilhidrolasa

IB: Inferencia Bayesiana

IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

kDa: Kilo dalton

LB: Luria-Bertani

MALDI: Desorción/ionización láser asistida por matriz (Matrix-assisted laser desorption/ionization)

Mbp: Mega pares de bases

MM: Masa molecular

ML: Máxima Verosimilitud

MSA: Alineamiento múltiple de secuencia (Multiple sequence alignment)

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)

pI: Punto isoelectrico

PMSF: Fluoruro de fenilmetanosulfonilo

PR: Relacionada con la patogénesis

PSRF: Factor de reducción de escala potencial (Potential scale reduction factor)

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa (Reverse transcription - polymerase chain reaction)

SENASICA: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria

SDS: Dodecil sulfato de sodio

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TFA: Ácido trifluoroacético

TOF: Tiempo de vuelo (Time-of-flight)

TSA: Transcriptome Shotgun Assembly

V: Volts

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
El género <i>Agave</i> : Importancia, taxonomía, morfología, aprovechamiento y situación fitosanitaria.....	2
Quitinasas, como proteínas relacionadas con la patogénesis en plantas	7
Quitinasas en plantas: Clasificación, estructura y familia de proteínas.....	10
III. ANTECEDENTES	14
IV. JUSTIFICACIÓN.....	15
V. HIPÓTESIS.....	16
VI. OBJETIVOS.....	16
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
1. Presencia de los genes <i>AtChi1</i> y <i>AtChi2</i> en las construcciones pET32a modificado y pMCSG7	17
2. Producción de las proteínas recombinantes <i>AtChi1</i> y <i>AtChi2</i> de <i>Agave tequilana</i> var. azul.....	21
3. Purificación y caracterización de r <i>AtChi1</i> y r <i>AtChi2</i>	23
4. Purificación de β -1,3 glucanasa y heveína nativas de <i>Hevea brasiliensis</i>	25
5. Pruebas <i>in vitro</i> de actividad antifúngica de r <i>AtChi1</i> y r <i>AtChi2</i> en presencia de proteínas relacionadas con la patogénesis de <i>Hevea brasiliensis</i>	27
6. Condiciones de estabilidad para las quitinasas r <i>AtChi1</i> y r <i>AtChi2</i>	28
7. Predicción <i>in silico</i> de la estructura tridimensional de las quitinasas recombinantes <i>AtChi1</i> y <i>AtChi2</i> de <i>A. tequilana</i> var. azul.....	29
8. Filogenia de quitinasas de <i>A. tequilana</i> var. azul y diferentes especies del género <i>Agave</i>	31
VIII. RESULTADOS.....	35
1. Presencia de los genes <i>AtChi1</i> y <i>AtChi2</i> en las construcciones pET32a modificado y pMCSG7	35
2. Producción de las proteínas recombinantes	37
3. Purificación de r <i>AtChi1</i> y r <i>AtChi2</i> de <i>Agave tequilana</i> var. azul.....	37
4. Purificación de β -1,3 glucanasa y heveína nativas de <i>Hevea brasiliensis</i>	43
5. Ensayos de inhibición del crecimiento fúngico en placa por r <i>AtChi1</i> y r <i>AtChi2</i> en presencia de proteínas relacionadas con la patogénesis de <i>Hevea brasiliensis</i>	46
6. Condiciones de estabilidad para las quitinasas recombinantes <i>AtChi1</i> y <i>AtChi2</i>	49

7. Predicción <i>in silico</i> de la estructura tridimensional de las quitinasas rAtChi1 y rAtChi2 de <i>A. tequilana</i> var. azul.....	51
8. Filogenia de quitinasas de <i>Agave tequilana</i> var. azul y otras especies del género <i>Agave</i>	54
IX. DISCUSIÓN	57
X. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	68
XI. REFERENCIAS	69
XII. ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica de los géneros <i>Agave</i> y <i>Yucca</i> .	2
Figura 2. Morfología de la especie <i>A. tequilana</i> var. azul.	3
Figura 3. Síntomas de la marchitez vascular y pudrición seca del cogollo causados por <i>F. oxysporum</i> en <i>Agave tequilana</i> var. azul.	6
Figura 4. Estructura del polímero de quitina, formado por monómeros de N-acetil glucosamina (GlcNAc).	8
Figura 6. Mecanismo hidrolítico de inversión propuesto para las quitinasas de la familia GH-19.	12
Figura 7. Alineamiento de las secuencia de aminoácidos de AtChi1 y AtChi2.	14
Figura 8. Esquema vector pET32a modificado.	17
Figura 9. Esquema del vector pMCSG7.	18
Figura 10. Análisis electroforético de las construcciones pET32a/AtChi1 y pMSCG7/AtChi2.	36
Figura 11. Cinética de inducción de las proteínas recombinantes AtChi1 y AtChi2.	37
Figura 12. Primer paso de purificación de las quitinasas rAtChi1 y rAtChi2 a través de cromatografía de afinidad a níquel.	39
Figura 13. Monitoreo del segundo paso de purificación de las quitinasas recombinantes por medio de cromatografía de afinidad.	39
Figura 14. Purificación rAtChi1 y rAtChi2 mediante CEM.	40
Figura 15. Purificación de rAtChi2, mediante cromatografía de intercambio aniónico.	41
Figura 16. Espectrometría de masas MALDI-TOF de las quitinasas recombinantes de <i>A. tequilana</i> var. azul.	42
Figura 17. Actividad de β -1,3 glucanasa de las isoformas purificadas de <i>H. brasiliensis</i> .	44
Figura 18. Primer ensayo de inhibición del crecimiento de fúngico.	47
Figura 19. Segundo ensayo de inhibición del crecimiento de fúngico.	48
Figura 20. Ensayo de desplazamiento térmico de la quitinasa rAtChi1.	50
Figura 21. Superposición de la estructura terciaria de las quitinasas de clase I.	52
Figura 22. Reconstrucción filogenética de secuencias de quitinasas y proteínas tipo quitinasas de <i>A. tequilana</i> var. azul y otras especies dentro del género <i>Agave</i> y <i>Yucca</i> .	56
Figura 23. Representación esquemática de las secuencias de proteína identificadas en el transcriptomas de <i>novo</i> de <i>A. tequilana</i> var. azul.	67
Figura A1. Métricas de confiabilidad de los modelos de AtChi1 y AtChi2.	81
Figura A2. Alineamiento de los tres transcritos utilizados para generar la secuencia consenso de la proteínas tipo quitinasa de clase II de <i>Agave tequilana</i> var. azul (AteqCLII_01).	86
Figura A3. Alineamiento de los tres transcritos utilizados para generar la secuencia consenso de la proteínas tipo quitinasa de clase II de <i>Agave tequilana</i> var. azul (AteqCLII_01).	87
Figura A4. Reconstrucción filogenética de secuencias de quitinasas y proteínas tipo quitinasas de <i>A. tequilana</i> var. azul y otras especies dentro del género <i>Agave</i> y <i>Yucca</i> . Árbol obtenido por el método de Máxima Verosimilitud con el programa PhyML 3.0.	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Plagas que ocasionan daños y enfermedades en <i>Agave tequilana</i> var. azul....	5
Tabla 2.	Familia de proteínas relacionadas con la patogénesis.	7
Tabla 3.	Funciones que desempeñan las diferentes clases de quitinasas en diferentes especies de plantas.	11
Tabla 4.	Pasos de purificación de isoformas de β -1,3 glucanasa <i>Hevea brasiliensis</i> l.	43
Tabla 5.	Pasos de purificación de heveína <i>Hevea brasiliensis</i>	45
Tabla 6.	Secuencias curadas de quitinasas y proteínas tipo quitinasas de cuatro especies de <i>Agave</i> y dos especies de <i>Yucca</i> a partir de datos transcriptómicos.	55
Tabla A1.	Componentes del ensayo de doble digestión con enzimas de restricción..	77
Tabla A2.	Composición del medio LB con antibióticos utilizados para las cepas de <i>E. coli</i> Rosetta-gami y SHuffle.	77
Tabla A3.	Composición gel de poliacrilamida (12%).....	77
Tabla A4.	Mezclas de reacción de ensayos de actividad de beta-1,3 glucanasa.....	78
Tabla A5.	Mezclas de reacción de ensayos de actividad de quitinasa.....	78
Tabla A6.	Condiciones empleadas para ensayos de termofluorescencia. Aditivos HR2-428 (Hamptom Research).....	79
Tabla A7.	Evaluación de calidad estructural de los modelos de AtChi1 y AtChi2 de <i>A. tequilana</i> var. azul obtenidos a través de dos métodos computacionales.	81
Tabla A8.	Características de las secuencias curadas de quitinasas y proteínas tipo quitinasas a partir del transcriptoma <i>Agave tequilana</i> var. azul.....	82
Tabla A9.	Características de las secuencias curadas de quitinasas y proteínas tipo quitinasas a partir del transcriptoma <i>Agave deserti</i>	82
Tabla A10.	Características de las secuencias curadas de quitinasas y proteínas tipo quitinasas a partir del transcriptoma <i>Agave americana</i>	83
Tabla A11.	Características de las secuencias curadas de quitinasas y proteínas tipo quitinasas a partir del transcriptoma <i>Agave sisalana</i>	84
Tabla A12.	Características de las secuencias curadas de quitinasas y proteínas tipo quitinasas a partir del transcriptoma <i>Yucca gloriosa</i>	84
Tabla A13.	Características de las secuencias curadas de quitinasas y proteínas tipo quitinasas a partir del transcriptoma <i>Yucca filamentosa</i>	84
Tabla A14.	Resumen del alineamiento de nucleótidos de las 53 secuencias de quitinasas y proteínas tipo quitinasa en las especies del género <i>Agave</i> y <i>Yucca</i>	89
Tabla A15.	Criterios de selección del modelo de sustitución	89
Tabla A16.	Valores de la reconstrucción filogenética usados para los análisis de inferencia Bayesiana.....	89
Tabla A17.	Estimaciones de reconstrucción implementadas en los análisis de inferencia Bayesiana.....	90

I. RESUMEN

El género *Agave* consiste en un amplio grupo de plantas monocotiledóneas, en el que más de la mitad de las 210 especies registradas se encuentran en México. *Agave tequilana* var. azul tiene una enorme importancia económica pues la producción de tequila ocurre a partir de esta planta. En décadas recientes su cultivo se ha visto afectado por enfermedades causadas por hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*.

Las plantas presentan diferentes mecanismo de defensa contra estrés biótico, siendo uno de ellos la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Las proteínas PR antifúngicas son consideradas de gran interés biotecnológico, ya que incrementan la resistencia de la planta al ataque de hongos fitopatógenos. Nuestro grupo demostró que las quitinasas recombinantes AtChi1 y AtChi2 de *Agave tequilana* var. azul son capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus* sp.; sin embargo, el efecto inhibitorio es menor en comparación con quitinasas de distintas especies de plantas.

En el presente trabajo el efecto de la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus* sp. se estudió con la combinación de AtChi1 y AtChi2 con proteínas PR antifúngicas como β -1,3 glucanasas y proteínas de unión a quitina (heveína) de *Hevea brasiliensis*. Si bien, la cantidad de proteína utilizada en las pruebas resultó menor que en ensayos previos, se lo logró observar cierto incremento de la inhibición con la combinación AtChi1 y β -1,3 glucanasas.

Por otra parte, originalmente se planteó elucidar la estructura tridimensional de las quitinasas AtChi1 y AtChi2 a través de cristalografía de rayos X. Dado que no fue posible obtener las estructuras 3D de las quitinasas usando métodos experimentales, estas fueron estimadas por predicciones *in silico*, demostrando la relación entre los dominios catalíticos y de unión a quitina.

Finalmente, en esta tesis se logró identificar a partir de datos transcriptómicos a la familia de quitinasas GH-19 de *A. tequilana* var. azul así como de otras especies de la subfamilia Agavoideae. La familia está conformada por quitinasas de clase I, II IV y proteínas tipo quitinasa clase II. Además, se logró indicar el parentesco de las diferentes clases de quitinasas de *A. tequilana* var. azul así como con las quitinasas de diferentes especies de la subfamilia Agavoideae a través de análisis filogenéticos.

II. INTRODUCCIÓN

El género *Agave*: Importancia, taxonomía, morfología, aprovechamiento y situación fitosanitaria

El género *Agave* consiste en un amplio grupo de plantas monocotiledóneas que comprende aproximadamente 210 especies, en el que 159 se sitúan en México y 129 son endémicas del país (García-Mendoza et al., 2019). Más de la mitad de todas las especies del género *Agave* se encuentran en México, por lo que se considera que nuestro país es el centro de su origen.

El género *Agave* forma parte de la subfamilia Agavoideae y este a su vez pertenece a la familia Asparagaceae (Angiosperm Phylogeny Group III and IV; APG III, 2009 y APG IV, 2016). La subfamilia Agavoideae está conformada por 18 géneros, siendo el género *Agave* L. el más diverso de esta subfamilia (Chase et al., 2009). La clasificación taxonómica de dos miembros de la subfamilia Agavoideae se muestra en la Figura 1.



Figura 1. Clasificación taxonómica de los géneros *Agave* y *Yucca*. Elaboración propia.

Los agaves son descritos por García-Mendoza (2007) como plantas perennes (es decir, que requieren varios años para madurar y florecer) de hojas dispuestas en forma de espiral, arregladas en roseta en el ápice de un tallo, conocido también como piña. Las hojas o pencas de los agaves son suculentas, de tejido fibroso y de formas distintas (linear a lanceolada u ovalada); la inflorescencia que surge del meristemo apical, conocido como cogollo, es de mayor tamaño que la planta de apariencia paniculada con racimos laterales, y por último, el sistema de raíces es superficial. A continuación se muestra la morfología de la especie *A. tequilana* var. azul (Figura 2).

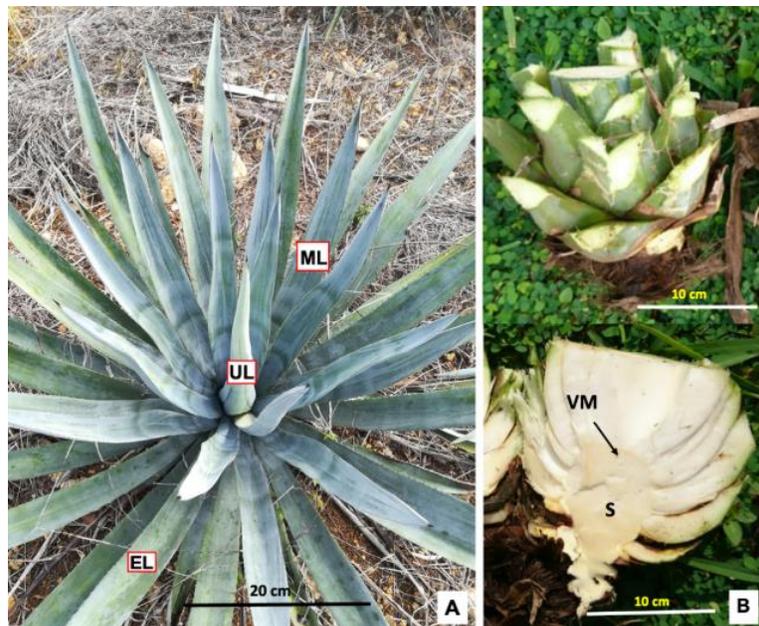


Figura 2. Morfología de la especie *A. tequilana* var. azul. **A.** Ejemplar de planta, se señala meristemo apical (cogollo) que contiene hojas sin desplegar en proceso de desarrollo (UL), hojas desplegadas (pencas) de la región intermedia (ML), hojas desplegadas de la región externa de la roseta (EL). **B.** Tallo (piña en desarrollo) (arriba), y corte longitudinal (abajo), se muestra el tejido de almacenamiento (S) y meristemático (VM). Tomado de Villegas-Camas et al. (2022).

Los agaves tienen una enorme importancia en la economía y cultura en México. El aprovechamiento de esta planta se remonta a los primeros pobladores de Mesoamérica y entre los beneficios obtenidos se encuentran los siguientes: ser una fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, obtención de fibras, abono, construcción de viviendas, etc. (García-Mendoza, 2007). Diversas

especies han sido aprovechadas para múltiples usos y/o en la obtención de productos, algunos ejemplos se mencionan a continuación:

- Maguey blanco (*A. americana*), comercializada con fines ornamentales.
- Henequén o sisal (*A. sisalana*), se fabrican cuerdas, sacos, tapetes y telas a partir de las fibras de sus hojas.
- Agave tequilero (*A. tequilana* var. azul), se utiliza como materia prima para la obtención de tequila.

Diferentes especies de agaves son explotadas para la producción de bebidas que tienen reconocimiento nacional e internacional, por lo que la planta de agave es pieza clave para la agroindustria (Gschalerdler et al., 2017). En particular, la especie *Agave tequilana* var. azul tiene una enorme importancia económica, ya que la producción industrial de tequila se da a partir de esta planta.

En la actualidad el cultivo de agave tequilero atraviesa diferentes problemáticas, sociales, políticas, económicas y agroecológicas (Gschalerdler et al., 2017). Sin embargo, para los fines que nos ocupan en este trabajo únicamente se menciona las limitantes causadas por enfermedades ocasionadas por fitopatógenos.

El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), implementa desde el año 2013 la campaña oficial fitosanitaria del agave en el que se reporta la situación fitosanitaria actual que atraviesa el cultivo de *A. tequilana* var. azul (SENASICA, 2020). En la Tabla 1 se presentan los agentes causales de afectaciones y enfermedades sobre cultivos de agave tequilero.

Tabla 1. Plagas que ocasionan daños y enfermedades en *Agave tequilana* var. azul.

Agente causal	Especie y género	Enfermedad
Insecto	<i>Scyphophorus acupunctatus</i>	Daños en piña, cogollo y en las hojas (pencas)
Hongo	<i>Fusarium oxysporum</i>	Marchitez y pudrición
Hongo	<i>Fusarium verticillioides</i>	
Hongo	<i>Cercospora agavicola</i>	Mancha gris o tizón foliar
Hongo	<i>Ceratocystis paradoxa</i>	Marchitez del agave
Bacteria	<i>Pectobacterium carotovora</i>	Pudrición del cogollo

La producción de agave azul (*A. tequilana* var. azul) se ha visto afectada en los últimos 20 años principalmente por marchitez y pudrición seca del cogollo, lo que constituye uno de los problemas fitosanitarios más graves que enfrenta dicha plantación (López-Bautista et al., 2020). Esta enfermedad tiene como principal agente causal al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, además se ha reportado la etiología de esta enfermedad a asociaciones de diferentes especies del género *Fusarium* sp. (Vega-Ramos et al., 2013; López-Bautista et al., 2020).

F. oxysporum puede atacar a las plantas del género *Agave* en cualquier etapa de desarrollo. La enfermedad de marchitez vascular inicia con el enrollamiento de la punta de las hojas por obstrucción y taponamiento de haces vasculares que provocan deshidratación y muerte progresiva de tejidos, posterior a un cambio de coloración de azul turquesa a verde opaco. Conforme avanza la enfermedad las plantas muestran enrollamiento foliar firme, y en la mayoría de los casos se pierde anclaje por reducción o destrucción total de la raíz. Por otro lado, plantas con pudrición seca del cogollo se caracterizan por lesiones corrugadas de color negro y amarillo-pálido que van desde la punta a la base del cogollo (Jiménez-González et al., 2017 citado en López-Bautista et al., 2020). La Figura 3 muestra los daños causados por *F. oxysporum* en plantas de *A. tequilana* var. azul.

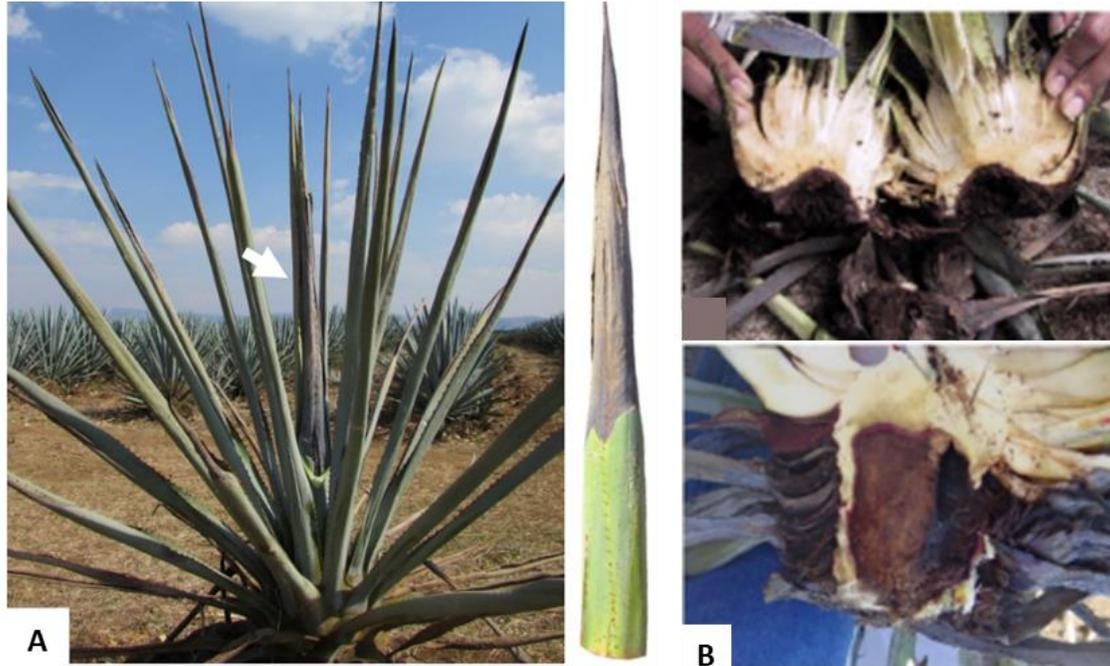


Figura 3. Síntomas de la marchitez vascular y pudrición seca del cogollo causados por *F. oxysporum* en *A. tequilana* var. azul. **A.** Planta con síntomas de pudrición seca (pencas enrolladas con coloración verde-opaco a amarillas, con lesiones color negro). Costado derecho, cogollo o meristemo apical con pudrición descendente y textura seca rígida (López-Bautista et al., 2020) **B.** Cortes transversales de la piña con necrosis en los tejidos (DGSV-CNRF, 2017).

En contraparte, la pudrición blanda causada por *Cercospora agavicola*, el cogollo mantiene su textura rígida, sin colapso y no presenta olor fétido (Coria-Contreras et al., 2019). También se ha reportado como agentes causales de la pudrición blanda a *Pectobacterium* spp. (Jiménez-Hidalgo et al., 2004). De los agentes etiológicos de la pudrición de cogollo, la causada por *F. oxysporum* es la que presenta mayor incidencia (López-Bautista et al., 2020).

Quitinasas, como proteínas relacionadas con la patogénesis en plantas

Las quitinasas están implicadas en los mecanismos de defensa de las plantas y se producen cuando ha ocurrido la interacción con patógenos. A estas proteínas se les conoce con el nombre de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR, Pathogenesis Related) (Ferreira et al., 2007) y son un grupo estructuralmente diverso que tienen un papel importante en la resistencia a enfermedades causadas por patógenos (Mahendranathan et al., 2016 citado en Prasannath, 2017).

Las proteínas PR se han clasificado acorde a su función, relación serológica, secuencia de aminoácidos, peso molecular y otras propiedades. Actualmente están clasificadas 17 familias de acuerdo con sus funciones y propiedades (van Loon et al., 2006). En la Tabla 2 se muestran las familias PR-1 a PR-17.

Tabla 2. Familia de proteínas relacionadas con la patogénesis.

Familia	Actividad asociada	Masa molecular (kDa)
PR-1	Desconocida	15-17
PR-2	β -1,3 glucanasa	30-41
PR-3	Quitinasas clase I, II, IV, VI, VII	35-46
PR-4	Proteínas de unión a quitina	13-14
PR-5	Proteína tipo taumatina	16-26
PR-6	Inhibidor de proteasa	8-22
PR-7	Endoproteasa	69
PR-8	Quitinasa clase III	30-35
PR-9	Peroxidasa	50-70
PR-10	Proteína tipo ribonucleasa	18-19
PR-11	Quitinasa clase V	40
PR-12	Defensina	5
PR-13	Tioninas	5-7
PR-14	Proteína transportadora de lípidos	9
PR-15	Oxalato oxidasa	22-25
PR-16	Proteínas tipo oxalato oxidasa	100 (hexámero)
PR-17	Desconocida	Desconocida

Tomado y modificado de Ferreira et al. (2007).

Las proteínas PR antifúngicas son consideradas de gran interés biotecnológico ya que incrementan la resistencia de la planta huésped al subsecuente ataque de hongos fitopatógenos (Sexton & Howlett, 2006). Proteínas como PR-1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 13 y 14 han mostrado causar daño a la célula fúngica a través de diferentes mecanismos (Theis & Stahl, 2004; Ferreira et al., 2007). Las proteínas PR antifúngicas tienen como diana diferentes estructuras de la célula fúngica, desde la parte más externa como la pared celular fúngica, hasta la membrana celular y finalmente varios blancos intracelulares (Theis & Stahl, 2004).

En este sentido las quitinasas son capaces de conferir resistencia a la planta ante el ataque de hongos, por medio de su capacidad de hidrolizar los enlaces β -1,4 del polímero de quitina que compone la pared fúngica (Collinge et al., 1993; Kasprzewska, 2003) (Fig. 4).

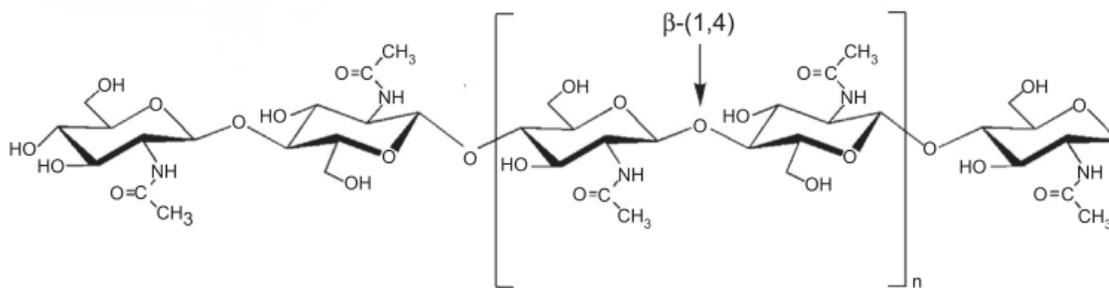


Figura 4. Estructura del polímero de quitina, formado por monómeros de N-acetil glucosamina (GlcNAc) unidos por enlaces β -1,4. Tomado de Karthik et al., 2016.

La quitina es un polímero estructuralmente muy similar a la celulosa, ambos están formados por cientos de miles de unidades de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4, la diferencia se encuentra en que la quitina tiene en la posición del carbono 2 (C-2) un grupo acetamida en lugar de hidroxilo.

La quitina constituye entre un 10 a 20% del total de componentes de la pared celular de hongos filamentosos; no obstante, la estructura microcristalina que forma mediante interacciones de puente de hidrógeno le permite tener una enorme resistencia y contribuyen significativamente a la integridad de la pared celular (Shaun & Stephen, 2006).

Por otro lado, ya que existen diversas proteínas PR que exhiben actividad antifúngica, se han realizados estudios sobre el efecto de quitinasas y β -1,3 glucanasas en el crecimiento *in vitro* de hongos en el que concluyen que la combinación de quitinasas y β -1,3 glucanasas inhibe fuertemente el crecimiento *in vitro* de hongos, afectando especialmente el ápice de las hifas (Mauch et al., 1988; Arlorio et al., 1992; Sela-Buurlage et al., 1993). Además, en tema de patentes, recientemente se han creado invenciones relacionadas con métodos para la prevención y control de daños a plantas causados por patógenos, que usan mezclas que contienen diferentes enzimas glicohidrolíticas de pared celular fúngica, entre ellas quitinasas y glucanasas, además de compuestos fungicidas (Inch et al., 2019). De modo similar, existen invenciones que mejoran la degradación de la quitina o debilitan la estructura a través de la presencia de quitinasas y proteínas de unión a quitina (Vaaje-Kolstad et al., 2007).

Tanto a través de experimentos que muestran una mayor inhibición del crecimiento *in vitro* de hongos, como por la tendencia actual a innovar en métodos para el combate de plagas en plantas, la combinación de distintas proteínas PR es sin duda una estrategia exitosa para la prevención y control de enfermedades de origen fúngico.

Quitinasas en plantas: Clasificación, estructura y familia de proteínas

Las quitinasas de la familia PR-3 (E.C 3.2.2.14) están divididas en cinco diferentes clases (I, II, IV, VI, VII) de acuerdo con su estructura primaria (Shinshi et al., 1990; Orlando et al., 2021). Todos los miembros presentan en el extremo N-terminal un péptido señal (SP, *Signal Peptide*) de alrededor de 20 aminoácidos (Fig. 5). El resto de las quitinasas difieren en la presencia o ausencia de dominios que flanquean al dominio catalítico (CatD). Por un lado, en el extremo N-terminal está el dominio de unión a quitina (CBD, *Chitin Binding Domain*), también conocido como dominio tipo heveína, que permite la unión con el polisacárido de quitina. Los dos dominios CatD y CBD están unidos por una región conectora (HR, *Hinge Region*), rica en aminoácidos como glicina y prolina, con una longitud que va desde los 5 hasta 22 residuos (Berglund et al., 1995; Sarma et al., 2012). Finalmente, en el extremo C-terminal hay un péptido de carácter hidrofóbico (CTP, *Carboxil Terminal Peptide*) que previene la excreción de la enzima y la direcciona a la vacuola (Neuhaus et al., 1991; Chrispeels et al., 1992).

Las quitinasas que presentan un CBD son clasificadas como I, IV y VI. Las quitinasas de clase IV está cercanamente relacionada con la clase I (35-50% identidad; Beintema, 1994), pero son más pequeñas debido a una delección en el CBD y tres delecciones en el dominio catalítico. Las quitinasas clase VII están cercanamente relacionadas con la clase IV ya que exhiben las misma tres delecciones en el CatD, pero carecen del CBD. La clase II comparte una alta identidad (60-65%; Jalil et al., 2015) con el CatD de la clase I, pero carece del CBD. La clase VI presenta 4 de las 8 cisteínas bien conservadas en el CBD y una región conectora inusualmente larga y rica en prolinas (Berglund et al., 1995) (Fig. 5).

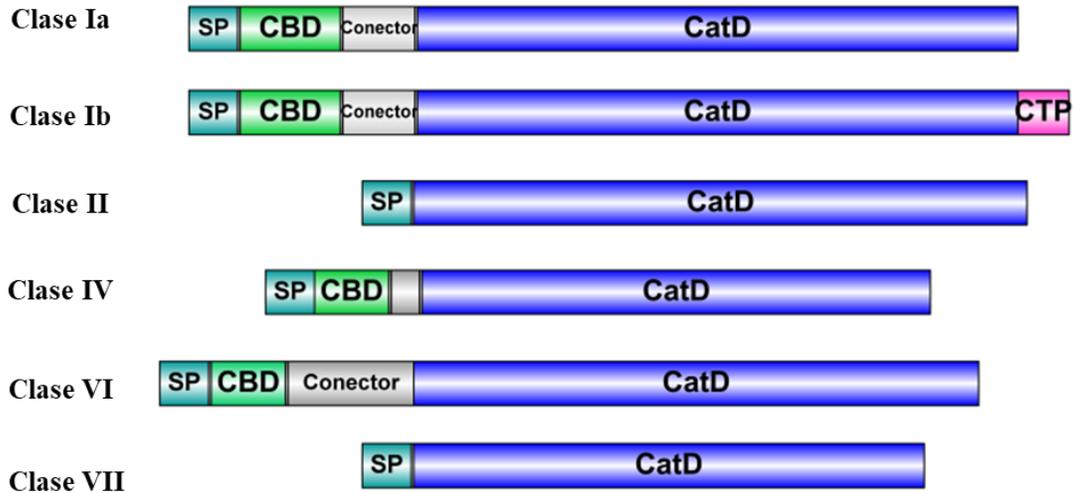


Figura 5. Representación esquemática de las diferentes clases de quitinasas de la familia GH-19. En azul claro el péptido señal (SP); en verde el dominio de unión a quitina (CBD); en gris la región conectora (HR); en azul las diferentes formas en que se presenta el dominio catalítico (CatD) dentro de las diferentes clases y el péptido carboxilo terminal (CTP) en rosa. Imagen hecha con IBS (Wenzhong, 2015).

La Tabla 3 muestra las funciones en las que están implicadas las diferentes clases de quitinasas en plantas, además de su bien conocido papel como proteínas de defensa (Kasprzewska, 2003).

Tabla 3. Funciones que desempeñan las diferentes clases de quitinasas en diferentes especies de plantas.

Proceso/función	Clase	Ejemplos de especies
Patogénesis	IV	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Vitis vinifera</i>
	I, II y IV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Procesos de crecimiento	Proteínas tipo quitinasas (relacionadas a la clase II)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Embriogénesis	IV	<i>Daucus carota</i> , <i>Picea glauca</i>
		Resistencia al frío/congelación

La quitinasas de la familia PR-3 de plantas son clasificadas a su vez dentro de las glicosilhidrolasa 19 (GH-19). La estructura tridimensional del dominio catalítico de las quitinasas GH-19 está compuesto por dos lóbulos ricos en alfa hélices, esta estructura bilobulada forma un surco amplio en el que se coloca el sustrato, a los extremos de ambos lóbulos se localizan estructuras de tipo asa (Ohuma et al., 2012). Los residuos catalíticos, así como tres puentes disulfuro, se encuentran bien conservados en el dominio catalítico de la familia de quitinasa GH-19 de plantas (Ubhayasekera et al., 2011). Los residuos catalíticos son dos ácidos glutámicos (Glu) separados por una distancia aproximada de 9 Å, que da lugar al mecanismo llamado de inversión en el que ocurre la configuración anomérica del carbono 1 (C-1) del producto resultante. El mecanismo de inversión requiere que uno de los residuos actúe como ácido-base donando un protón y que el otro actúe como nucleófilo activando una molécula de agua, concertando así un ataque nucleofílico al C-1. El mecanismo de hidrólisis propuesto para la familia GH-19 involucra la formación de un intermediario de carácter ion oxocarbenión, como se muestra en la Figura 6 (Brameld & Goddard, 1998)

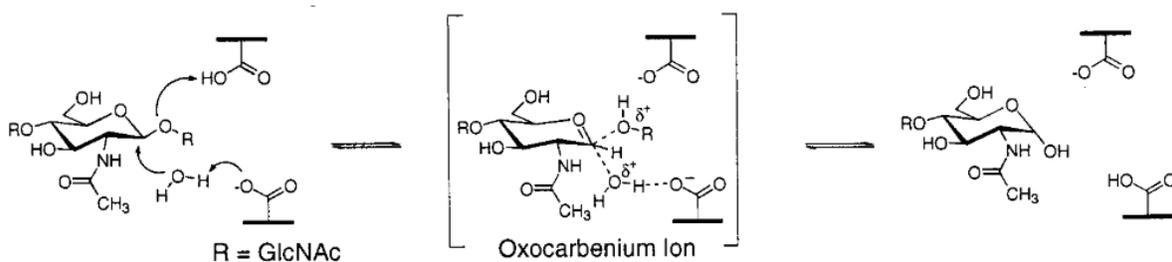


Figura 6. Mecanismo hidrolítico de inversión propuesto para las quitinasas de la familia GH-19. Imagen tomada de Brameld & Goddard, (1998).

Por otra parte, el dominio de unión a quitina o tipo heveína, es un módulo de entre 30-43 aminoácidos con varias cisteínas y glicinas bien conservadas. Los residuos de cisteína forman puentes disulfuro que mantienen la estabilidad estructural del dominio (Ubhayasekera et al., 2011). El plegamiento es predominantemente de tipo aleatorio o “*random coil*”; sin embargo, presenta dos pequeñas hojas β y una pequeña región de hélice alfa (Rodríguez-Romero et al., 1991).

Hasta la fecha se tienen depositadas en el banco de datos de proteínas (Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/>) 26 estructuras de quitinasas de la familia GH-19, procedentes de 15 especies distintas de plantas. De este total solo dos estructuras de quitinasas de clase I han sido dilucidadas de manera parcialmente completa y completa, una de arroz (*Oryza sativa*; PDB: 2DKV) y la segunda del árbol caducifolio *Simarouba glauca* (PDB: 6LNR), respectivamente. Lo anterior es debido a la falta de densidad electrónica en los mapas obtenidos mediante técnicas de difracción de rayos X, en la región flexible que corresponde al péptido conector. La gran flexibilidad que tiene dicho péptido conector, que puede ser muy largo y presentar aminoácidos pequeños e hidrofílicos, permite que los dominios se orienten en la forma correcta para desempeñar su función (Ubhayasekera et al., 2011; Chen et al., 2013).

En los organismos complejos como las plantas existen grupos de genes que codifican para la síntesis de un conjunto de proteínas muy relacionadas. Se sabe que las quitinasas PR-3 son codificadas como familias multigénicas y el tamaño de estas familias se conoce en diferentes especies de plantas como *A. thaliana* (21 quitinasas), arroz (17 quitinasas), álamo (16 quitinasas) y yuca (22 quitinasas) de las clases I, II, IV, VI y VII (Irigoyen et al., 2020). La redundancia funcional causada por dichas familias multigénicas se puede considerar un aspecto importante de estudio dada las funciones críticas desempeñadas por las quitinasas PR-3.

Ahora bien, la producción de quitinasas por *A. tequilana* var. azul se sabe ocurre como respuesta a la interacción con *F. oxysporum* (Rincón-Enríquez et al., 2013), por lo que la identificación de quitinasas de la familia PR-3 puede aportar información importante relacionada con el control de enfermedades en *A. tequilana* var. azul, que es un cultivo económicamente importante.

III. ANTECEDENTES

En nuestro grupo de investigación se obtuvieron las primeras quitinasas de clase I de *A. tequilana* var. *azul* (AtChi1 y AtChi2) producidas de manera heteróloga en células de *E. coli* (Sierra et al., 2019).

La secuencia primaria de AtChi1 y AtChi2 se muestra en la Figura 7 a través de un alineamiento. Aquí se presentan, bajo barras de diferente color, los dominios funcionales de las quitinasas recombinantes de *A. tequilana* var. *azul*. Además, se indica por medio de flechas de color rojo las diferencias entre estas quitinasas, las cuales residen únicamente en el dominio catalítico.

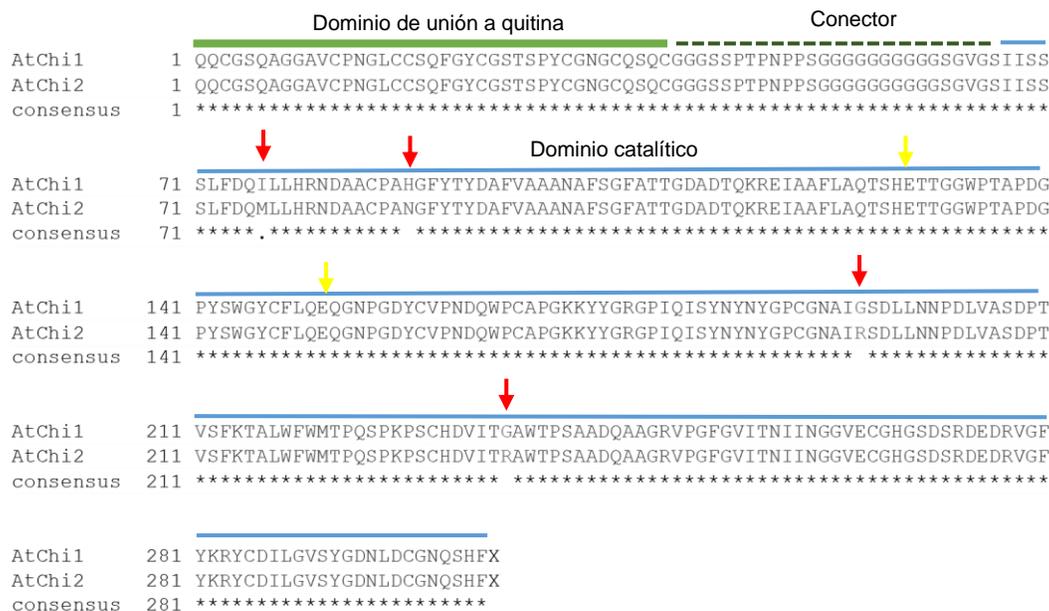


Figura 7. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de AtChi1 y AtChi2. En este se indican las regiones que comprenden cada dominio. Las diferencias en estas isoformas se muestran en flechas rojas I/M76, H/N88, G/R195, G/R236 y en amarillo los residuos catalíticos.

Las quitinasas recombinantes de *A. tequilana* var. *azul* fueron usadas en ensayos de inhibición antifúngica frente a *Aspergillus* sp. La inhibición del crecimiento del hongo fue examinada en cajas Petri con medio PDA, en el que se exhibió un menor

desarrollo de las hifas alrededor de discos que contenían a AtChi1 y AtChi2, con lo que se determinó la actividad antifúngica de las quitinasas.

Las quitinasas recombinantes de *A. tequilana* var. azul son consideradas como proteínas relacionadas con la patogénesis dada su actividad antifúngica, aunado a que la isoforma AtChi2 fue un transcrito encontrado en hojas infectadas por *F. oxysporum* y dado que AtChi2 comparte una gran identidad con AtChi1, también se le consideró como proteína PR.

La actividad antifúngica que mostraron AtChi1 y AtChi2 contra *Aspergillus* sp. resulta ser menor comparada con la de enzimas de otras fuentes vegetales, como por ejemplo, la quitinasa de semilla de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) (Younas et al., 2016) que mostró un efecto inhibitorio en el crecimiento de diferentes hongos fitopatógenos, como *Aspergillus* sp., con una menor cantidad de enzima.

IV. JUSTIFICACIÓN

- El presente trabajo pretende explorar el efecto de la presencia de las quitinasas recombinantes de *A. tequilana* var. azul en ensayos *in vitro* de actividad antifúngica en combinación con otras proteínas relacionadas con la patogénesis, como heveína y β -1,3 glucanasas endógenas de *Hevea brasiliensis*, puesto que se han estudiado en el grupo de trabajo.
- A la fecha solo existe un reporte sobre la estructura tridimensional completa de una quitinasa de clase I. El estudio sobre el plegamiento de estas proteínas es relevante para comprender la relación funcional entre dominios de estas enzimas y su modo de unión a la quitina.
- Finalmente, dado que las quitinasas presentes en *A. tequilana* var. azul y en otras especies del género *Agave* han sido poco estudiadas en dicho género taxonómico, se busca proporcionar información de la presencia y análisis de las relaciones filogenéticas que mantienen estas glicosilhidrolasas.

V. HIPÓTESIS

- Las quitinasas recombinantes de *A. tequilana* var. azul (AtChi1 y AtChi2), en presencia de proteínas relacionadas con la patogénesis como β -1,3 glucanasas y heveína inhiben de manera sinérgica el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos.
- Las quitinasas de la familia GH-19 se encuentran presentes de manera endógena en plantas de agave de diferente especie.

VI. OBJETIVOS

Objetivo general:

Realizar el estudio bioquímico-estructural de las quitinasas recombinantes AtChi1 y AtChi2 de *A. tequilana* var. azul como proteínas de defensa e identificar quitinasas, en general, en el transcriptoma de diferentes miembros de la subfamilia Agavoideae.

Objetivos particulares:

1. Evaluar la actividad antifúngica de las quitinasas recombinantes AtChi1 y AtChi2 de *A. tequilana* var. azul en combinación con proteínas antifúngicas de *Hevea brasiliensis* como β -1,3 glucanasas y una proteína de unión a quitina (heveína), sobre el crecimiento *in vitro* hongos fitopatógenos
2. Determinar las condiciones de mayor estabilidad rAtChi1 y rAtChi2 de *A. tequilana* var. azul mediante ensayos de fluorimetría diferencial de barrido.
3. Predecir *in silico* la estructura tridimensional de las quitinasas AtChi1 y AtChi2 de *A. tequilana* var. azul.
4. Identificar en el transcriptoma de *A. tequilana* var. azul, así como en el de otros miembros de la subfamilia Agavoideae, a quitinasas con posible interés biotecnológico.
5. Describir las relaciones filogenéticas de la familia de quitinasas encontradas en el transcriptoma de *A. tequilana* var. azul, así como de los transcritos encontrados en otros miembros de la subfamilia Agavoideae.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Presencia de los genes *AtChi1* y *AtChi2* en las construcciones pET32a modificado y pMCSG7

Vectores de expresión

El gen que codifica para *AtChi1* fue clonado en el vector pET32a. En la Figura 8 se muestran las características del vector, que consisten en regiones que codifican para la proteína Tiorredoxina (TrxA), la etiqueta de histidinas (6xHis), sitio de corte por la proteasa TEV (TEV site) y contienen un gen de resistencia a ampicilina. La expresión del inserto es regulada por medio del operador de lactosa (*lacO*).

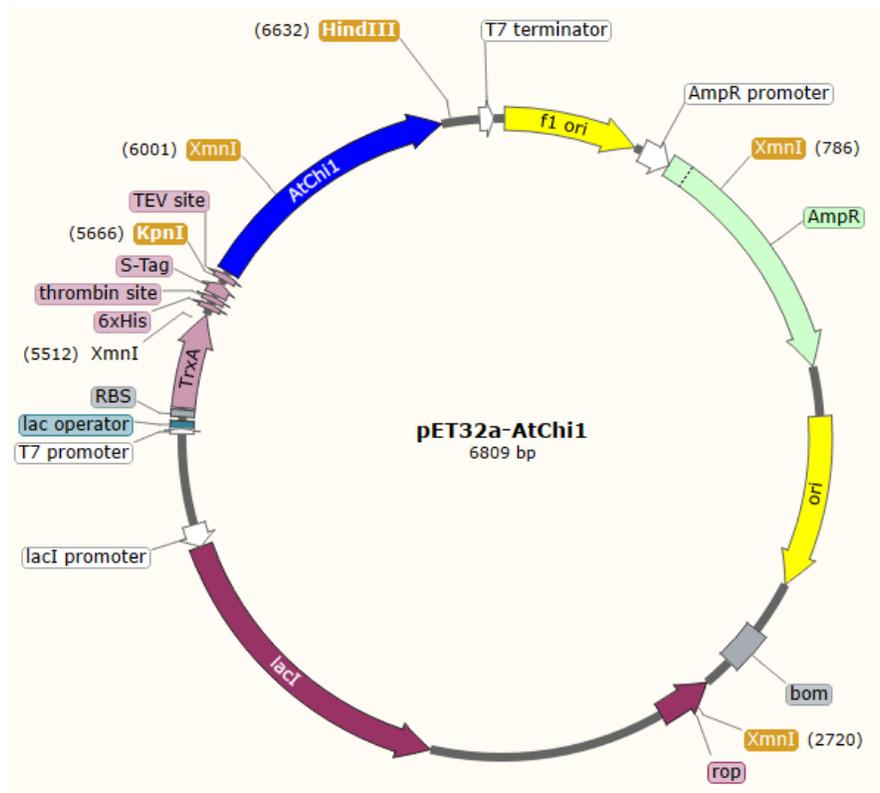


Figura 8. Esquema vector pET32a modificado. Los módulos funcionales, indicados por flechas de color son, TrxA: Tiorredoxina, 6xHis: Seis histidinas (tag de purificación), TEV site: sitio de reconocimiento por la TEV proteasa.

- a) En hielo se descongelaron alícuotas de células competentes de *E. coli* DH5 α en CaCl₂ 0.1 M, almacenadas a -70 °C y se adicionó a cada tubo con células, 50 ng de cada vector con el inserto.
- b) Se mezcló con mucho cuidado utilizando la punta de micropipeta y se dejó incubar por 30 min en hielo.
- c) Se aplicó un choque térmico elevando la temperatura a 44 °C por 45 s y se incubó en hielo durante 2 min.
- d) Una vez transcurrido el tiempo se adicionaron 200 μ L de medio SOC (160 μ L de LB y 40 μ L de glucosa 0.1 M) a la mezcla de transformación.
- e) Las células se incubaron por 2 h a 37 °C.
- f) Se adicionaron 80 μ L de las células a una placa de agar LB suplementado con ampicilina (100 μ g/mL) y se dispersó por toda la placa permitiendo que el líquido se absorbiera, se invirtieron las cajas y se incubó durante toda la noche a 37 °C.

Se tomaron asadas por cada colonia obtenida y se inoculó en medio LB suplementado con ampicilina (100 μ g/mL), incubándose durante toda la noche a 37 °C.

Aislamiento del vector

El DNA plasmídico se extrajo y purificó a partir de los cultivos de *E. coli* DH5 α . Se concentró la biomasa mediante sucesivas centrifugaciones (14 500 rpm por 1 min) y se desechó el sobrenadante. Una vez obtenida la biomasa se utilizó el kit QIAprep Spin Miniprep, que se basa en la lisis alcalina de la célula bacteriana, seguida por la adsorción y elución del plásmido purificado.

El paquete celular se resuspendió en una solución de NaOH y SDS, que además contenía RNasa. Estas condiciones propician la ruptura de la membrana celular y permiten la liberación de los componentes intracelulares. A continuación, se neutralizó el lisado con acetato de potasio y cloruro de guanidina. Estos permiten que el DNA cromosomal pase a una forma insoluble, con lo cual se precipitan algunas proteínas y lípidos (Birnboim, 1983).

Posteriormente, para terminar de separar los restos celulares se centrifugó. La fracción soluble se transfirió a una columna que contienen membrana de gel sílice que permite la separación selectiva del DNA plasmídico en condiciones de alta salinidad. Después se realizaron lavados para remover las sales y proteínas unidas al plásmido dentro de la columna. Finalmente, el DNA plasmídico se recuperó mediante elución con amortiguador EB, el cual es una solución de baja salinidad.

Ensayos de restricción y análisis electroforético del DNA plasmídico pET32a/*AtChi1* y pMCSG7/*AtChi2*

Para corroborar la presencia de los insertos en cada uno de los vectores se procedió a separar el gen de interés mediante enzimas de restricción.

- **AtChi1**

Para obtener el gen de la *AtChi1* dentro vector pET32a se utilizaron las endonucleasas de restricción *HindIII*-HF y *KpnI*, las cuales reconocen sitios que flanquean al inserto *AtChi1*. Esta doble digestión se hizo utilizando el amortiguador CutSmart que permitió un 50% de actividad para *KpnI* y 100% para *HindIII*-HF, por 60 min a 37 °C. La composición de la mezcla de reacción se detalla en la Tabla A1 del Anexo.

- **AtChi2**

Para el caso de la región codificante de *AtChi2* dentro del vector pMCSG7 se utilizaron las mismas endonucleasas de restricción ya que cortan a los extremos de donde se encuentra el gen. Se utilizaron las mismas condiciones de actividad descritas.

Además, los vectores pET32a y pMCSG7 con los insertos fueron digeridos o cortados con la enzima de restricción *XmnI*, ya que en ambos casos existen tres

sitios de corte por dicha enzima. Se utilizó el amortiguador CutSmart® que permitió un 100% de actividad durante 60 min a 37 °C.

Los productos de los ensayos de digestión se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) utilizando amortiguador TAE 1X. Se agregaron 3 µL de cada ensayo de digestión por pozo. Las muestras obtenidas se mezclaron con amortiguador de carga. La electroforesis se corrió a 90 V durante 60 min, el gel se reveló con bromuro de etidio al 0.01% y se observó en un fotodocumentador Chemidoc (Bio-Rad) a 260 nm.

2. Producción de las proteínas recombinantes AtChi1 y AtChi2 de Agave tequilana var. azul

Transformación de cepas de *E. coli* competentes con DNA plasmídico pET32a/AtChi1 y pMSCG7/AtChi2

- **rAtChi1**

La transformación de células competentes con el vector se hizo utilizando la cepa de *E. coli* Rosseta-gami, la cual presenta mutaciones en las enzimas glutaredoxin reductasa y tioredoxin reductasa ($\Delta gor \Delta trxB$), lo que permite mantener un ambiente oxidante en el citoplasma (Fathi-Roudsari et al., 2016).

Para identificar la presencia del vector dentro de la célula, éstas se sembraron en placas con medio LB suplementado con antibióticos, cuya composición se detalla en la Tabla A2 del Anexo, incubándolas a 37 °C por una noche.

- **rAtChi2**

Para la correcta producción de la proteína recombinante AtChi2 se utilizó la cepa SHuffle, que se encuentra modificada genéticamente para ser capaz de plegar

correctamente proteínas con enlaces disulfuro en su citoplasma (Lobstein et al., 2012).

La transformación de las células competentes se realizó como se describe anteriormente. Finalmente se sembraron en medio LB suplementado con antibióticos, cuya composición se detalla en la Tabla A2 del Anexo, incubándolas a 37 °C por una noche.

Inducción de rAtChi1 y rAtChi2 con IPTG

Las clonas positivas se utilizaron para preparar un preinóculo que consistió en 2 mL de medio LB con antibióticos, Tabla A2 del Anexo. Este se incubó a 37° C durante una noche (12-16 h). A continuación, se tomaron 500 µL del preinóculo y se adicionaron a un matraz Erlenmeyer con 20 mL de medio LB con antibióticos, en agitación (180 rpm) y temperaturas de 37 y 30 °C, para las cepas de Rosetta-gami y SHuffle, respectivamente. Una vez que los cultivos alcanzaron DO₆₀₀ de 0.6 y 0.7 para AtChi1 y AtChi2, respectivamente, la inducción de las proteínas recombinantes se llevó a cabo por la adición de IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactósido), ya que los transgenes se encuentran bajo el control del operador *lac*.

En Rosetta-gami se requirió de una concentración de 0.5 mM y se incubó en agitación (180 rpm) a 18 °C por 16 h, mientras que la cepa SHuffle requirió de una concentración de 1 mM a 16 °C por 18 h, durante estos periodos de tiempo se tomaron alícuotas de 1 mL cada 2 h, las cuales se centrifugaron a 13 000 rpm por 3 min y se les desechó el sobrenadante. Finalmente, las muestras se guardaron y almacenaron a -20 °C para su posterior tratamiento.

Lisis celular de *E. coli* Rosetta-gami y *E. coli* SHuffle

A las células de *E. coli* se les trató con una solución de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8, 300 mM NaCl y PMSF 1 mM) y la mezcla se sonicó en un equipo sonicador de tipo copa a potencia 4 con ciclos de 10 s cada uno e intervalos de descanso de 30 s a 4 °C. Después se centrifugó a 14 500 rpm por 10 min, con lo que se obtuvieron dos

fases, la fase soluble (citosólica) y la fase insoluble (los restos celulares) los cuales se resuspendieron en el amortiguador de lisis.

3. Purificación y caracterización de rAtChi1 y rAtChi2

Purificación de la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad

La fracción soluble obtenida de la lisis celular se filtró primero a través de una membrana de 0.45 µm, posteriormente a través de una membrana de 0.22 µm (Durapore, Millipore), y se aplicó a una columna de afinidad a níquel (HisTrap HP 5mL, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) previamente equilibrada con amortiguador de equilibrio (Tris/HCl 20 mM pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol), la elución de la proteína de fusión se hizo con un gradiente lineal de 20 a 400 mM de imidazol.

Corte de la proteína de fusión con la proteasa TEV

A 20 mg de la proteína de fusión se le añadió 1 mg de proteasa TEV (obtenida en el laboratorio) y la mezcla se dializó en amortiguador de Tris/HCl 50 mM durante 19 h a 4 °C (MWCO 6000-8000 Spectra/Por). Posteriormente, se adicionó DTT a una concentración final 0.25 mM y se dejó a temperatura de 37 °C durante 1 h.

Segunda purificación por cromatografía de afinidad

Posterior a la hidrólisis con la proteasa TEV, la muestra fue sometida a cromatografía de afinidad a níquel. La proteína hidrolizada no se adhirió a la columna y se recuperó el eluido de la columna. Después se hizo pasar imidazol 20 mM para romper interacciones no específicas. La fracción adherida se eluyó con 400 mM de imidazol.

Cromatografía de exclusión molecular (CEM)

La muestra obtenida del paso anterior fue concentrada y se dializó contra 20 mM de Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, posteriormente se aplicó a una columna de exclusión molecular (Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare) equilibrada con el mismo amortiguador (microfiltrado 0.22 μm , Durapore, Millipore). Las muestras se inyectaron al cromatógrafo (Amersham Pharmacia Biotech) y se hicieron pasar por la columna a un flujo de 0.5 mL/min. Se colectaron fracciones de 1 mL.

Cromatografía de intercambio aniónico

La proteína rAtChi2 obtenida por cromatografía de exclusión molecular (CEM) fue sometida a un paso extra de purificación. Se colectaron los picos mayoritarios y se dializaron con membrana de celulosa (MWCO 6000-8000 Spectra/Por) en amortiguador MES 0.1 M pH 6.0 dura toda la noche a 4°C. La muestra se filtró (0.22 μm Durapore, Millipore) y se aplicó a una columna de intercambio aniónico (Mono Q 5/50 GL, GE Healthcare Bio-Science, Sweden) previamente equilibrada con amortiguador MES 0.1 M pH 6.0 y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 1 M.

Perfil electroforético por SDS-PAGE

Las fracciones mayoritarias de la cromatografía se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS (12%) de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970), con los componentes enlistados en la Tabla A3 del Anexo. La concentración de proteína se determinó usando el coeficiente teórico de extinción molar (1.76 y 1.71 mL/cm*mg para AtChi1 y AtChi2, respectivamente) y midiendo la absorbancia a 280 nm. Las muestras se mezclaron con amortiguador de carga 5X y se calentaron por 5 min a 95°C. Los geles se corrieron a 95 V por 3 h. Para revelar los geles se utilizó Coomassie R-250 1.5 mM en solución con metanol: ácido acético glacial: agua (50:10:40, v/v) durante 30 min, después se enjuagó con una mezcla de solución destañidora (metanol-ácido acético-agua) a una proporción 45:10:35 (v/v) durante

15 min, posteriormente se decantó el líquido y al gel se le adicionó una mezcla de agua con solución desteñidora 1:1.

Análisis de la pureza por espectrometría de masas

En la espectrometría de masas se usó como método de ionización MALDI (por sus siglas en inglés; Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) acoplado a un analizador de tiempo de vuelo (Time-of-flight (TOF); por sus siglas en inglés) (Microflex, Bruker). Se utilizó una concentración aproximada de 3 mg/mL de cada enzima en agua Milli-Q para el análisis. La matriz consistió en una disolución saturada de ácido sinapínico en acetonitrilo (ACN) acuoso al 30% (v/v) y ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% (v/v). El espectrómetro fue operado en modo lineal positivo y se usó el software FlexAnalysis para la detección de los picos.

4. Purificación de β -1,3 glucanasa y heveína nativas de *Hevea brasiliensis*

La purificación de β -1,3 glucanasas y heveína se realizó a partir de las vacuolas también conocidos como lutoides, obtenidos de la ultracentrifugación del látex del árbol de hule (*Hevea brasiliensis*). Las muestras con fecha de 7/08/2009 y 3/10/2012 (almacenados a -70°C) fueron colectadas de la plantación “El Palmar”, Tezonapa, Veracruz.

La extracción de proteínas a partir de la fracción lutoides se realizó de la siguiente forma: la fracción lutoide se homogeneizó en disolución de NaCl 0.35 M en equipo Ultraturrax durante 10 min (ciclos de 30 s ON y 30 s OFF) a 4°C . El homogeneizado se clarificó por ultracentrifugación a 14 700 rpm por 45 min a 4°C . El sobrenadante se dializó contra agua Milli-Q[®] a 4°C durante toda la noche (MWCO 3000 Spectra/Por) y de nueva cuenta se separó el sedimento del sobrenadante mediante ultracentrifugación.

Purificación de β -1,3 glucanasas de *H. brasiliensis*

A partir del sedimento obtenido se obtuvieron las dos isoformas de β -1,3 glucanasa de *H. brasiliensis*, de acuerdo con la metodología descrita por Fuentes-Silva et al. (2007).

Ensayos de actividad enzimática

La actividad de β -1,3 glucanasa se determinó utilizando laminarina (Sigma-Aldrich, Chemical Co., St Louis, USA) como sustrato y el análisis de azúcares reductores liberados se realizó usando ácido dinitro salicílico (DNS; Miller, 1959), usando D-(+)-glucosa (Sigma-Aldrich, Chemical Co., St Louis, USA) como estándar.

La mezcla de reacción contenía 15 μ g de cada isoforma en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.0 (disolución enzimática 200 μ L) en una mezcla total de 500 μ L que contenía laminarina (2.0 mg/mL) disuelta en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.0. La Tabla A4 del Anexo muestra las mezclas de reacción y los blancos. Los azúcares reductores liberados se midieron después de incubar a 37 °C por 1 h con agitación suave (100 rpm), al cabo de este tiempo se adicionaron 500 μ L de DNS, se llevó a ebullición por 10 min y las muestras se colocaron en hielo y se centrifugaron a 13 000 rpm durante 1 min. La absorbancia se midió a longitud de onda de 550 nm. Una unidad de β -1,3 glucanasa se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de carbohidrato reductor equivalente a glucosa en un 1 min, bajo las condiciones de ensayo.

Purificación de heveína de *H. brasiliensis*

A partir del sobrenadante obtenido de la primera extracción de los lutoides de *H. brasiliensis*, se obtuvo el extracto proteico para la obtención de heveína de *H. brasiliensis* siguiendo la metodología de Llinas-García (1999).

5. Pruebas *in vitro* de actividad antifúngica de rAtChi1 y rAtChi2 en presencia de proteínas relacionadas con la patogénesis de *Hevea brasiliensis*

Material biológico: cepas de hongos fitopatógenos

Se utilizaron distintos hongos filamentosos, *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Pestalotiopsis* sp. y *Trichoderma* sp. pertenecientes a la colección de hongos del laboratorio del Dr. José Rivera Chávez del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química, UNAM.

Preparación del medio de cultivo

Para preparar el medio agar papa dextrosa (PDA), se requirió de 39 g de medio PDA (MCD LAB) por litro de agua desionizada. Se mezcló la cantidad necesaria y se esterilizó por calor húmedo (14 psi, 121 °C por 20 min), distribuyendo el medio en cajas Petri en condiciones estériles.

Condiciones de crecimiento de hongos filamentosos en medio sólido

A partir de cultivos preexistentes de *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Pestalotiopsis* sp. y *Trichoderma* sp. en medio sólido, se extrajeron cubos de aproximadamente 1 cm³ que se utilizaron como inóculo. Estos se colocaron en el centro de cajas Petri y se incubaron por 24 h a temperatura ambiente (aproximadamente 19 °C) y posteriormente a 28 °C por 24 h, al finalizar este periodo se obtuvo crecimiento radial alrededor del inóculo. Cabe mencionar que tanto *Trichoderma* sp. como *Pestalotiopsis* sp. no pudieron ocuparse en los ensayos posteriores debido a que en el caso del primero la extensión de las hifas cubrió toda la placa y, para el segundo, no presentó desarrollo suficiente alrededor del inóculo.

Preparación de proteínas relacionadas con la patogénesis

Se utilizaron sistemas Amicon® de corte MWCO 10 000 y MWCO 3 0000 (8 °C y 3 500 rpm; previamente equilibradas con amortiguador estéril) para cambiar el amortiguador a citrato de sodio 20 mM pH 5.0 de las muestras de glicosilhidrolasa (AtChi1, AtChi2 e isoformas de β -1,3 glucanasa) y heveína, respectivamente.

Después, el volumen fue transferido a sistemas de Amicon Ultra-0.5 mL con membrana de corte correspondiente a MWCO 10 000 y 3 000, con la finalidad de concentrar las muestras. La concentración de proteína fue determinada con espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Los coeficiente de extinción molar para las β -1,3 glucanasas heveína son de 1.57 y 2.75 mL/cm*mg, respectivamente.

Inhibición del crecimiento

La actividad antifúngica de las proteínas purificadas en este estudio fue estimada cualitativamente por medio de la inhibición del crecimiento de las hifas a través del medio. A las placas con crecimiento fúngico les fueron colocadas discos de papel estériles (aprox. de 5 y 7 mm de diámetro) a una distancia de 5 mm con respecto al crecimiento fúngico, a dichos discos se le colocó la solución de proteína purificada. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 48 h o bien, hasta que el crecimiento del micelio envolviera los discos control y formara zonas de inhibición alrededor de discos con acción antifúngica. El disco control consistió en amortiguador de citrato de sodio 20 mM pH 5.0 sin proteína.

6. Condiciones de estabilidad para las quitinasas rAtChi1 y rAtChi2

Ensayos termofluorescencia

La búsqueda de ligandos que pudieran incrementar la estabilidad de las quitinasas de *A. tequilana* var. azul, se evaluó a través ensayos de termofluorimetría diferencial de barrido. Se utilizó el kit Additive Screen™ (HR2-428, Hampton Research), el fluoróforo SYPRO Orange (λ_{ex} = 470 nm, λ_{em} = 569 nm; Thermo-Fisher Scientific) y AtChi1 0.15 mg/mL en amortiguador MES 20 mM pH 6.0. Se utilizó una proporción 1:50 (v/v) fluoróforo:proteína. A 10 μ L de esta mezcla se le adicionaron 10 μ L de la solución del kit a evaluar y se colocaron en placa de 96 pozos. Se utilizó el equipo qPCR (StepOne Real-Time PCR System) en donde se incrementó la temperatura de manera continua de 25 °C a 98.9 °C. Los datos se normalizaron y se ajustaron

a la ecuación de Boltzmann, los gráficos se representaron con el programa GraphPad Prism.

Respecto a rAtChi2, no fue posible realizar este mismo ensayo dado que se obtuvieron bajos rendimientos en la purificación y no se contaba con la cantidad suficiente.

7. Predicción *in silico* de la estructura tridimensional de las quitinasas recombinantes AtChi1 y AtChi2 de *A. tequilana* var. azul

Modelado

La predicción de la estructura tridimensional de las dos quitinasas de *A. tequilana* var. azul se realizó usando dos algoritmos diferentes, RoseTTAFold (Baek et al., 2021) y AlphaFold v2.0 (AlphaFold2; Jumper et al. 2021). La secuencia de aminoácidos de AtChi1 y AtChi2 se utilizaron como datos de entrada para la predicción de las estructuras terciarias.

RoseTTAFold: A través de los recursos provistos en la plataforma de Robetta (<https://rosetta.bakerlab.org/>), se utilizó el método RoseTTAFold, cuyo modelado está basado en aprendizaje profundo (deep learning). La salida consistió en cinco modelos, cada uno calificado mediante un gráfico que estima el error local por residuo de aminoácido en la proteína. Se seleccionó un modelo por cada predicción que presentara los valores más bajos de error medido en angstroms.

AlphaFold2: Se empleó la versión ligera de AlphaFold (AlphaFold Colab) en el notebook Colaboratory de Google Research, esta versión mantiene una precisión cercanamente idéntica a la versión completa de AlphaFold2. Dentro de la plataforma se ejecutaron cinco pasos por default, la salida del proceso consistió en un archivo .pdb. Los valores de métrica con la que se califica el modelo se encuentran en la penúltima columna del archivo .pdb, ubicación donde residen los valores del factor B o factor de temperatura.

Estimación de la confiabilidad

Los algoritmos RoseTTAFold (Baek et al., 2021) y AlphaFold2 (Jumper et al. 2021) utilizados para predecir la estructura terciaria de AtChi1 y AtChi2, proporcionaron métricas de confiabilidad para cada uno de sus modelos. Con el algoritmo RoseTTAFold se obtuvo la confiabilidad del modelo al evaluar la capacidad a *posteriori* de los servidores de modelado, asignando estimaciones de error a sus predicciones. Estas estimaciones se expresaron como distancias esperadas (en Å) entre las posiciones de carbono alfa (C α) del modelo y a la estructura objetivo (RMSD). Dicha información se encontró en un gráfico que proporcionó la plataforma Robetta.

Por otro lado, a partir del archivo de salida obtenido de la predicción con AlphaFold2 se registraron los valores de confiabilidad expresados como porcentajes de la prueba de diferencia de distancia local (LDDT, por sus siglas en inglés). Esta prueba es una superposición independiente que evalúa distancias interatómicas recompensando estructuras localmente correctas otorgando porcentajes de 0 a 100. Los porcentajes fueron graficados en función de los residuos de aminoácido de la proteína.

Evaluación estructural

La calidad estructural de los modelos se midió a través de diferentes herramientas. Se calificó la calidad de los modelos a través de puntajes o “scores” asignados por distintos evaluadores como QMEANDisCo Global (Studer et al., 2020) y MolProbity v.4.4 (Williams et al., 2018). Además se compararon los valores del porcentaje de residuos en zonas energéticamente permitidas en el gráfico de Ramachandran. Finalmente, a través de las herramientas como ERRAT (Colovos & Yeates, 1993) y PROVE (Pontius et al., 1996), ambos dentro de la suite de SAVES v.6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>), se obtuvieron valores que midieron el factor de calidad y el porcentaje de átomos estructuralmente atípicos (“outliers”), respectivamente.

8. Filogenia de quitinasas de *A. tequilana* var. *azul* y diferentes especies del género *Agave*

Identificación de quitinasas y proteínas tipo quitinasa en el transcriptoma de *Agave tequilana* var. *azul* y otros miembros de la subfamilia Agavoideae

Minado de transcrito de quitinasas en *Agave tequilana* var. *azul*

El primer enfoque para la búsqueda de quitinasas dentro de la especie de *A. tequilana* var. *azul* se hizo en archivos depositados por Gross et al. (2013) en el repositorio digital Dryad (DRYAD, sus siglas en inglés)(<https://datadryad.org/>), utilizando la palabra clave “*chitinase*”. De esta búsqueda se obtuvieron secuencias que se habían asignado con esa actividad en función de diferentes servidores como Pfam (PF00182), INTERPRO (Glicosil hidrolasa, familia 19) y GOTERM (GO:0004568).

Como segundo enfoque de búsqueda se encontraron secuencias del transcriptoma de *novo* de Gross et al. (2013) en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (“*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI), por sus siglas en inglés) depositados en Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) con número de acceso de GenBank: GAHU00000000. Con la herramienta BLASTN (Zhang et al., 2000; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y utilizando como sonda o “*query*” la secuencia de nucleótidos de AtChi1 se recuperaron un total de 18 secuencias.

Utilizando las 18 secuencias encontradas en el transcriptoma, se generó un árbol guía con la finalidad de identificar un representante por cada clado generado y posteriormente seleccionarlo para someterlo de nueva cuenta a la búsqueda de quitinasas dentro de la base TSA de la especie *A. tequilana* var. *azul*.

Minado de transcrito de quitinasas en *A. deserti*, *A. americana* y *A. sisalana*

Se realizó la búsqueda de quitinasas en otras especies del género *Agave*. Las especies de agave que se eligieron presentan una puntuación de importancia

equivalente al *A. tequilana* var. azul, las cuales son: *A. americana*, *A. deserti* y *A. sisalana*. Dicho puntaje de Alducín-Martínez et al. (2022) se encuentra en función de la información que se tiene sobre estas especies e incluye, entre otros, los usos se han dado a estas plantas y la categoría en la que se encuentran en la lista roja de especies amenazadas.

Se utilizó como sonda 14 secuencias de quitinasas encontradas en el transcriptoma *A. tequilana* var. azul y se buscó contra la base de datos transcriptómicos de *A. americana* (Yin et al., 2018), *A. deserti* (Gross et al., 2013) y *A. sisalana* (Sarwar et al., 2019).

Minado de transcrito de quitinasas en *Yucca filamentosa* y *Yucca gloriosa*

Se realizó la búsqueda de quitinasas dentro de la subfamilia Agavoideae utilizando el transcriptoma de plantas del género *Yucca*, esto debido a que es un linaje independiente al linaje *Agave sensu stricto*, con tiempos de divergencia entre estos dos géneros de aproximadamente 16.0 millones de años (Jiménez-Barron et al., 2020). Esta información permitiría reconocer si la presencia de algunos transcritos son producto de aparición reciente dentro del género *Agave* o por el contrario, se encuentran conservadas previo a la divergencia entre estos dos géneros.

Se utilizó como sonda un total de 22 secuencias de quitinasas pertenecientes a las especies de agave aquí analizadas. Se emplearon como blanco o “target” los datos transcriptómicos de *Yucca gloriosa* (Zinkgraf et al., 2017) depositados en el NCBI y los datos de *Yucca filamentosa* depositado en el proyecto 1000 transcriptomas de plantas (1KP, 1000 Plant Transcriptomes) (Carpenter et al., 2019 y Leebens-Mack et al., 2019).

Curado de secuencias

Los transcritos obtenidos de los géneros *Agave* y *Yucca* se curaron de la siguiente manera:

- a) Las regiones codificantes (CDS, *CoDing Sequence*) de cada transcrito se analizaron conforme a las “firmas” reportadas para las quitinasas de la familia GH-19 con el programa UGENE (Okonechnikov, 2012).
- b) Las secuencias que codificaban para una proteína de longitud aproximadamente menor al 10% (aprox. 97 nucleótidos) de una quitinasa fueron descartadas.
- c) Se ensamblaron CDS de diferentes transcritos que compartían al menos un 50% de la extensión de la secuencia y que presentaban un 98% de identidad en dicha región. El ensamblaje de dos secuencias se hizo utilizando BioEdit (Hall, 1999) y el ensamblado de tres secuencias con el programa UGENE (Okonechnikov, 2012), el cual generó la secuencia consenso de dichas regiones. En el apartado 1. Curado de secuencias de la sección de Anexos se muestran un ejemplo de dichos ensamblajes.
- d) En casos particulares, fue necesario considerar dos diferentes CDS dentro un mismo transcrito que determinara la secuencia de aminoácidos correcta de una quitinasa de la familia GH-19.
- e) Se identificaron y retiraron péptidos de señalización a partir de la secuencia de aminoácidos en función de la literatura (Berglund et al., 1995; Shinshi et al., 1990; Neuhaus et al., 1991; Chrispeels & Raikhel, 1992) y de servidores en línea como SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

El número total de secuencias curadas de quitinasas y sus características para cada especie del género *Agave* y *Yucca* se encuentran en las Tablas A8-A13 del Anexo.

Alineamiento de las secuencias

Se realizó un alineamiento múltiple de secuencia (“*Multiple Sequence Alignment*”, MSA) ingresando la secuencia de aminoácidos de las proteínas maduras al servidor en línea MAFFT v 7.490 (Kcatch et al., 2019). El MSA se editó manualmente con UGENE (Okonechnikov, 2012), asegurando que las “firmas” de las quitinasas de la familia GH19 estuviesen correctamente alineadas. Estas “firmas” corresponden a motivos altamente conservados, que se encuentran en los siguientes dominios:

- a) Dominio de unión a quitina: C-x(4,5)-C-C-S-x(2)-G-x-C-G-x(4)-[FYW]-C (PROSITE PS00026).
- b) Dominio catalítico: C-x(4,5)-F-Y-[ST]-x(3)-[FY]-[LIVMF]-x-A-x(3)-[YF]-x(2)-F-[GSA] (PROSITE PS00773); [LIVM]-[GSA]-F-x-[STAG](2)-[LIVMFY]-W-[FY]-W-[LIVM] (PROSITE PS00774); QTSHETTGGW y NYNY (Kesari et al., 2015; Martínez-Caballero et al., 2014).

El MSA editado se usó como plantilla para alinear la secuencia de nucleótidos con base en codones en el servidor en línea TranslatorX (Abascal et al., 2010) y haciendo uso de la herramienta de Gblocks (Castresana, 2000). Esta última permite filtrar del MSA bloques que contienen muchos gaps y retiene aquellos que presentan mayor conservación, con esto se flanquearon posiciones de 7 bloques que corresponde a 240 posiciones, 74% del alineamiento original. La información completa del alineamiento resultante se reporta en la Tabla A14 del Anexo.

Análisis filogenético

Se utilizó el método de reconstrucción filogenética por Inferencia Bayesiana (IB, *Bayesian Inference*), para un total de 53 secuencias de quitinasas y proteínas tipo quitinasas de cuatro especies del género *Agave* y dos especies del género *Yucca*, además de una secuencia de quitinasa de clase I *Persea americana* (aguacate) como grupo externo.

Primero se determinó el modelo evolutivo que mejor se ajusta a los datos del alineamiento de nucleótidos, esto se hizo con el algoritmo de SMS (*Smart Model Selection*) (Lefort et al., 2017), el cual asignó el modelo GTR +G (*General Time Reversible* más *Gamma*, respectivamente) conforme al criterio de información Akaike (AIC, *Akaike Information Criterion*). Los valores de este criterio, así como del criterio de información Bayesiana (BIC, *Bayesian Information Criterion*), se muestran en la Tabla A13 de Anexo. Posteriormente, se utilizó el programa PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010) para la reconstrucción filogenética por Máxima Verosimilitud (ML) y el programa MrBayes v3.2 (Ronquist et al., 2012) para la reconstrucción por Inferencia Bayesiana, se asignó un modelo de análisis GTR + G

y uno por codones, respectivamente, y se asignó como grupo externo a la secuencia de quitinasa de clase I de *Persea americana*.

Dos análisis fueron realizados simultáneamente con la distribución de *probabilidad posterior* (pp) de los árboles, utilizando el algoritmo de cadena de Markov Monte Carlo (MCMC, *Markov chain Monte Carlo*). Cada corrida consistió en cuatro cadenas (tres “calientes” y una “fría”) y la construcción del árbol inicial fue de manera aleatoria. Se muestreó cada 500 generaciones hasta alcanzar un valor de desviación estándar (Desviation Standar, DS) <0.01. La concurrencia de ambos análisis se alcanzó a los 1, 350, 000 generaciones (DS: 0.004950). Además, la convergencia de las cadenas se verificó a través del tamaño de muestra efectivo (ESS, *effective sample size*), mayor a 100 y que el factor de reducción de escala potencial (PSRF, *Potential Scale Reduction Factor*) fuera cercano a 1.0. Con el programa Tracer v1.7.1 (Rambaut et al., 2018) se obtuvieron los valores de este análisis que se muestra en la Tabla A16 y A17 del Anexo.

VIII. RESULTADOS

1. Presencia de los genes *AtChi1* y *AtChi2* en las construcciones pET32a modificado y pMCSG7

Para evaluar la presencia del inserto, las construcciones se sometieron a un experimento de digestión con endonucleasas de restricción, los plásmidos pET3a y pMCSG7 se cortaron con la enzima XmnI y en un segundo ensayo se cortaron con las enzimas HindIII-HF y KpnI. La Figura 10 muestra los resultados de los cortes con las endonucleasas, donde se observa que los tamaños de las bandas corresponden a lo esperado. El plásmido pET32a fue digerido con la enzima XmnI,

que reconoce tres sitios dentro de la construcción, lo que generó tres fragmentos del material genético de tamaño aproximado 1,600, 1,900 y 3,300 (carril 1, Fig.10), el plásmido pMCSG7 presentó también tres sitios de reconocimiento para XmnI, con lo que se generaron fragmentos de tamaño 1,400, 1,900 y 2,800 (carril 2, Fig.14). Mientras que la doble digestión con las enzimas HindIII-HF y KpnI se generaron para el vector pET32a dos fragmentos de tamaño aproximado 1,000 y 5,800 (carril 3, Fig. 10) y para pMCSG7 dos bandas de aproximadamente 1,000 y 5,200 pb (carril 4, Fig. 10). Los fragmentos de aproximadamente 1,000 pb de bases corresponden a los insertos AtChi1 y AtChi2, señalados con una flecha azul.

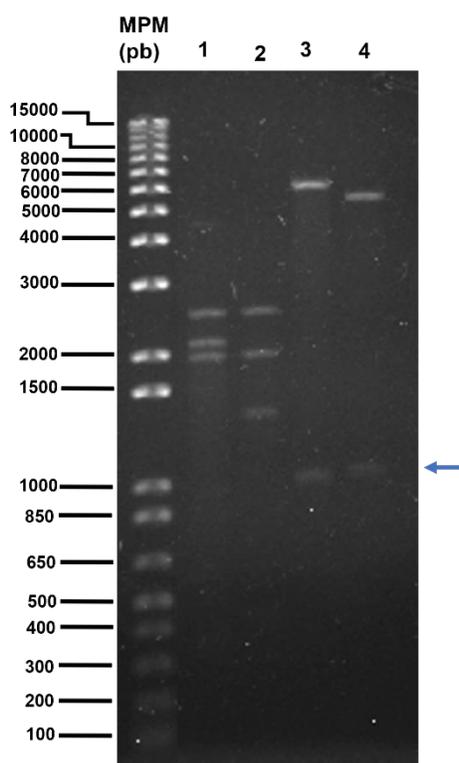


Figura 10. Análisis electroforético de las construcciones pET32a/*AtChi1* y pMCSG7/*AtChi2*. Marcador de peso molecular en pb (Estándar de ADN 1 Kb Plus, Invitrogen). **1.** Vector pET32a modificado con el gen de la *AtChi1* digerido con la enzima de restricción XmnI. **2.** Vector pMCSG7 con el gen de la *AtChi2* digerido con la enzima de restricción XmnI. **3.** Vector pET32a modificado con el gen de la *AtChi1* digerido con la enzima de restricción KpnI y HindIII HF. **4.** Vector pMCSG7 con el gen de la *AtChi2* digerido con las enzimas de restricción KpnI y HindIII-HF. Bandas esperadas de aprox. 900 pb marcada con flecha azul.

2. Producción de las proteínas recombinantes

La presencia de las proteínas recombinantes AtChi1 y AtChi2 producidas en las células de *E. coli* Rosseta-gami y *E. coli* SHuffle, respectivamente, se observó a través de cinéticas de inducción de acuerdo con las condiciones de Sierra et al (2019).

La Figura 11 muestra los perfiles de migración para las proteínas producidas por las cepas de *E. coli* SHuffle y *E. coli* Rosseta-gami. La proteína de fusión AtChi2 producida por *E. coli* SHuffle corresponde a una proteína de peso molecular de 36.8 kDa, debido a la secuencia aminoácidos del tag de purificación y el sitio de reconocimiento para el corte con proteasa TEV. En el caso de la proteína de fusión AtChi1, a una proteína con peso molecular de 49 kDa, ya que además de presentar las secuencias antes mencionadas tiene fusionada la proteína tiorredoxina.

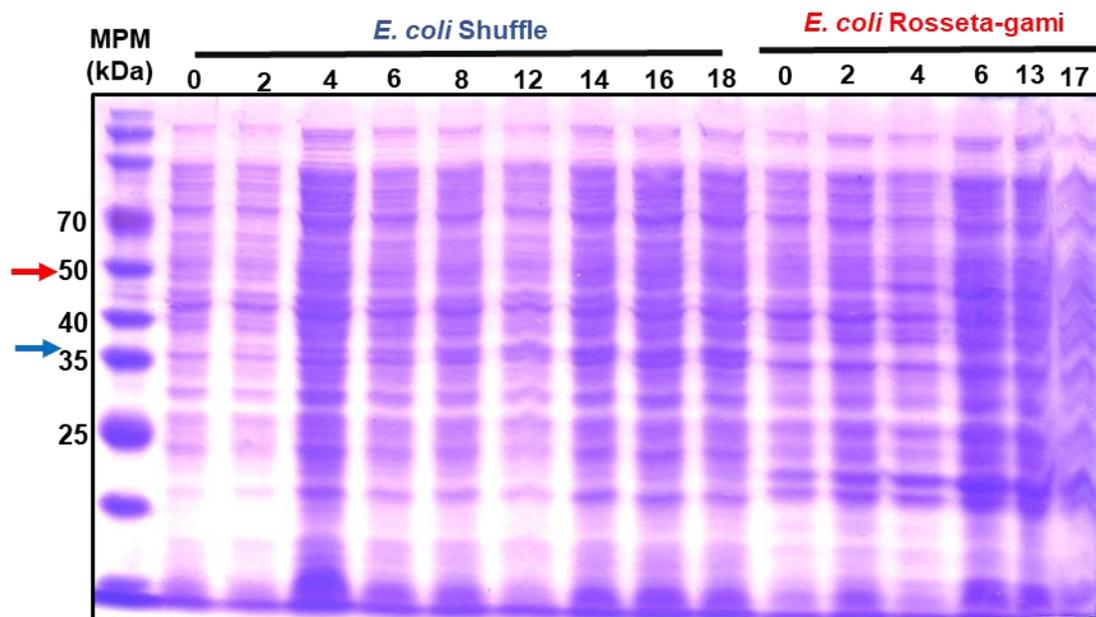


Figura 11. Cinética de inducción de las proteínas recombinantes AtChi1 y AtChi2. Fracción soluble de *E. coli* SHuffle de 0-18 h. Fracción soluble de *E. coli* Rosseta-gami de 0-17 h. .

3. Purificación de rAtChi1 y rAtChi2 de *Agave tequilana* var. azul

Purificación por cromatografía de afinidad a Níquel

Para purificar a las quitinasas rAtChi1 y rAtChi2, se utilizó la cromatografía de afinidad a níquel, pues ambas proteínas tienen fusionadas una etiqueta de histidinas (6xHis-tag). En el lado izquierdo de la Figura 12 se presentan los cromatogramas de elución de las proteínas recombinantes antes y después de pasar un gradiente lineal de imidazol (línea punteada azul), los picos que eluyeron de la columna a una concentración aproximada de 100 mM de imidazol se analizaron geles de SDS-PAGE (Fig. 12, derecha). De las proteínas presentes en cada una de las alícuotas, dos bandas bien definidas y abundantes de cada gel presentan los tamaños esperados para las proteínas de fusión, 50 kDa para el caso de la AtChi1 y de alrededor de 35 kDa para AtChi2 (flechas rojas).

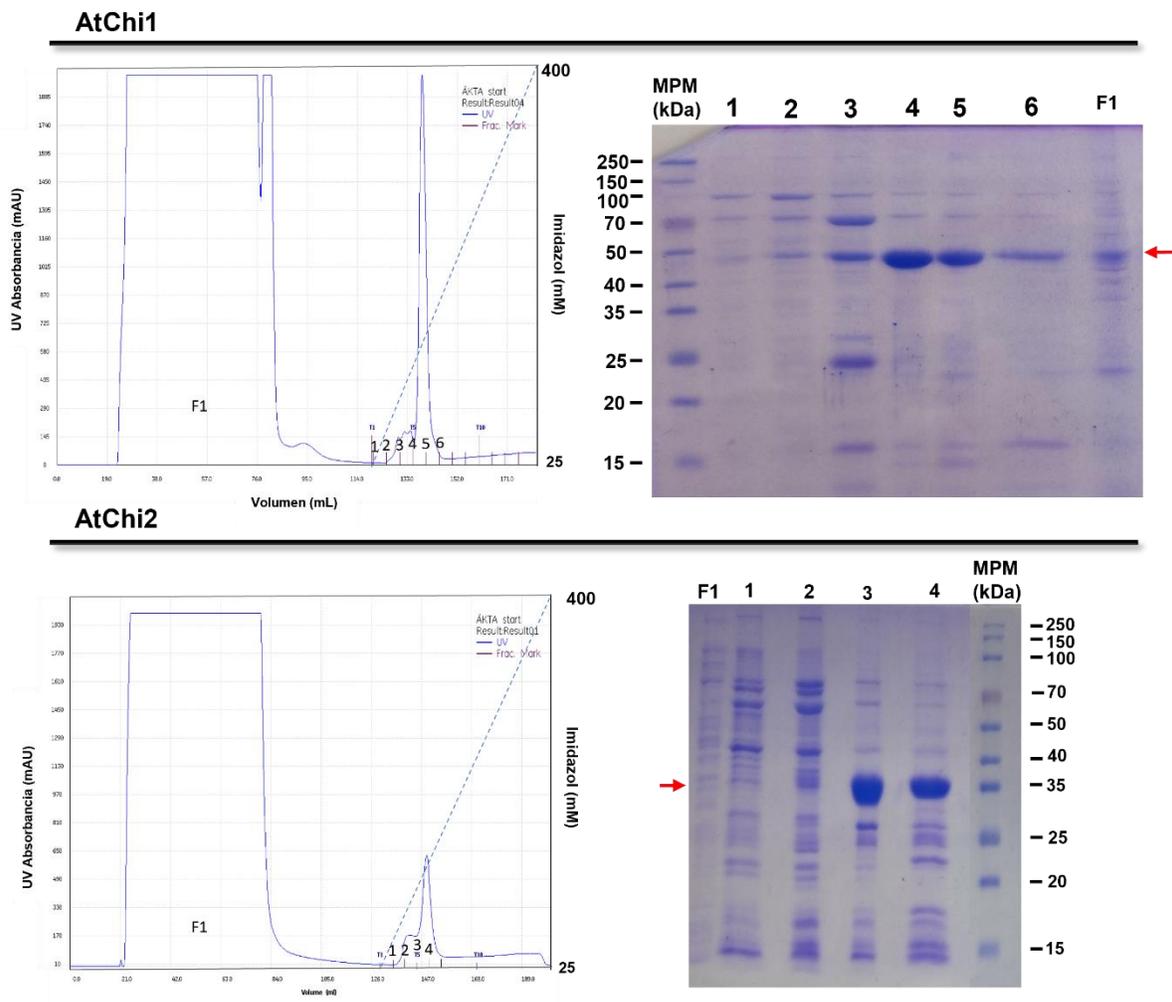


Figura 12. Primer paso de purificación de las quitinasas rAtChi1 y rAtChi2 a través de cromatografía de afinidad a níquel. **Izquierda:** Cromatogramas de afinidad a níquel de las muestras lisadas de las cepas de expresión de *E. coli* antes y después de un gradiente de imidazol 20-400 mM. **Derecha:** SDS-PAGE 12%. **AtChi1**, Carril 1-6. **AtChi2**, Carril 1-4. Fracciones recuperadas en el gradiente lineal de elución de 20-400 mM imidazol. F1. Fracciones del lisado celular antes de aplicar gradiente de imidazol. La flecha roja indica la masa molecular en kDa de las proteínas de fusión.

Las fracciones enriquecidas con la proteína de fusión fueron tratadas con la proteasa TEV para escindir la secuencia de aminoácidos fusionada en el extremo amino, posteriormente se cargaron a la columna de afinidad a níquel y diferentes fracciones obtenidas se monitorearon con SDS-PAGE 15% (Figura 13). La masa esperada de las proteínas recombinantes AtChi1 y AtChi2 es de ~32 kDa.

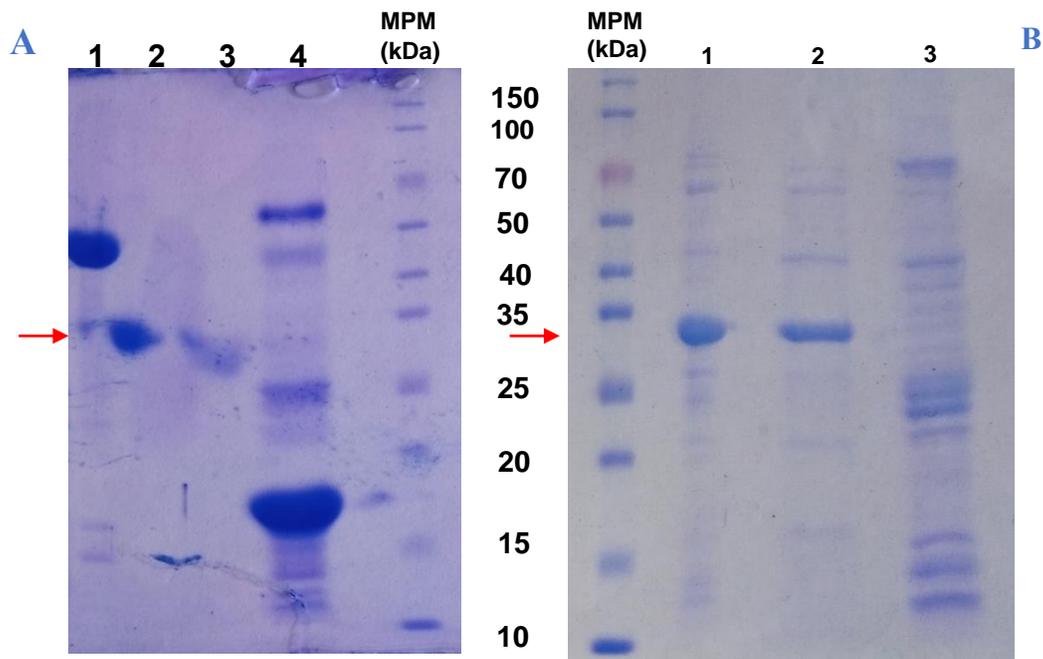


Figura 13. Monitoreo del segundo paso de purificación de las quitinasas recombinantes por medio de cromatografía de afinidad. **A.** rAtChi1, Carril 1: Proteína de fusión. Carril 2: Fracción no adherida a la columna. Carril 3. Lavado con 20 mM imidazol. Carril 4: Fracción adherida a la columna. **B.** rAtChi2, Carril 1: Fracción no adherida a la columna. Carril 2. Lavado con 20 mM imidazol. Carril 3: Fracción adherida a la columna. Flecha roja indica masa molecular esperada de las proteínas rAtChi1 y rAtChi2 (31.7 kDa y 31.9 kDa, respectivamente).

Purificación por Cromatografía de Exclusión Molecular

Las fracciones que tenían presencia de bandas alrededor de los 35 kDa se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular, analizándose los perfiles de elución con SDS-PAGE 12% (Figura 14A y 14B). Aparentemente rAtChi1 se purificó a homogeneidad, no así rAtChi2.

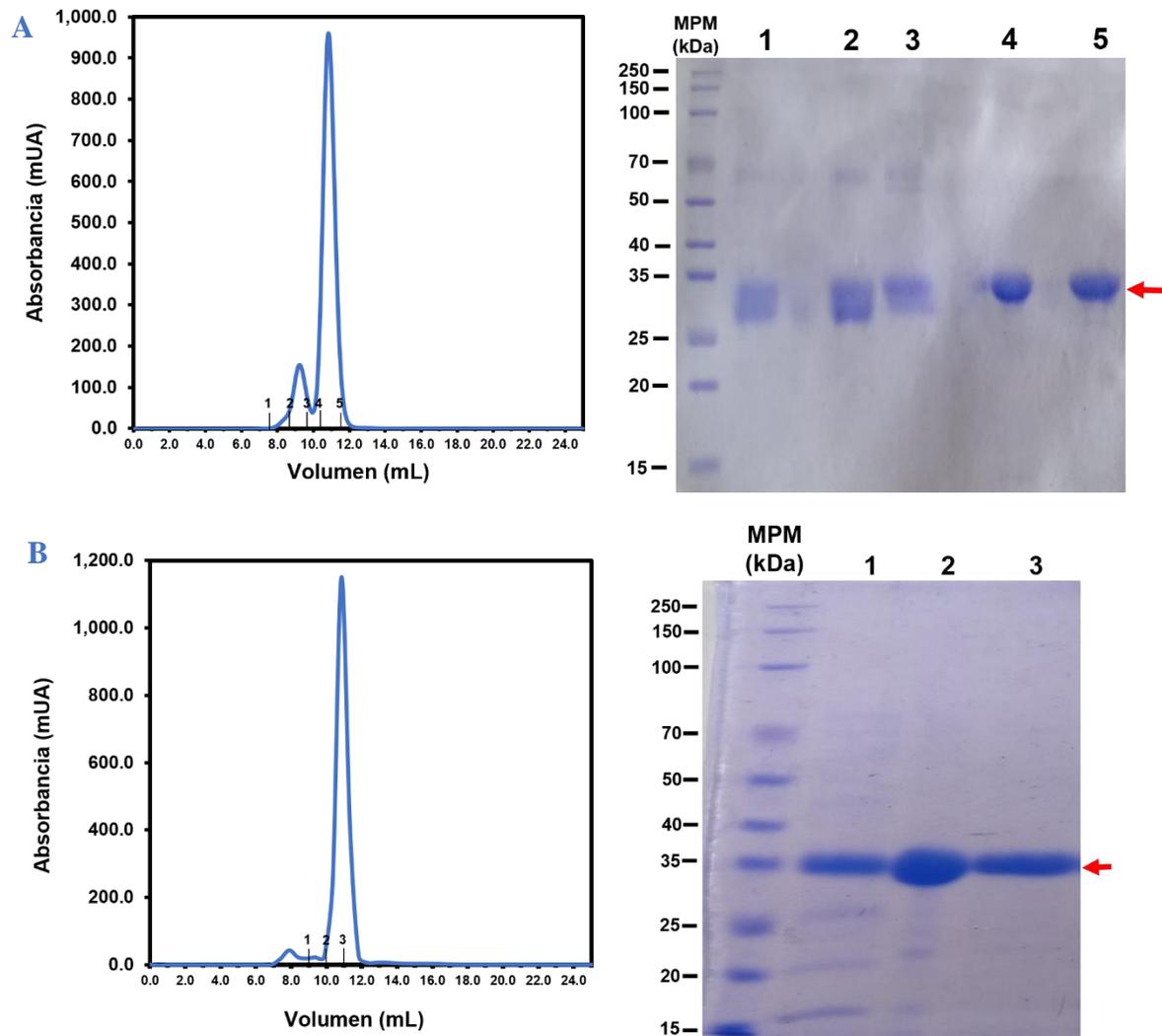


Figura 14. Purificación rAtChi1 y rAtChi2 mediante CEM. **A. Proteína AtChi1.** Cromatograma de elución (izquierda). Monitoreo de la purificación en SDS-PAGE. Carril 1-3: Fracciones colectadas del primer pico de elución. Carril 4-5: Fracciones correspondiente el segundo pico más abundante (derecha). **B. Proteína AtChi2.** Cromatograma de elución (izquierda). Monitoreo de la purificación en SDS-PAGE. Carril 1-3: Fracciones colectadas del pico más abundante (derecha).

Purificación por cromatografía de intercambio iónico

La proteína rAtChi2 con punto isoelectrico (pI) teórico de 4.82 se sometió a cromatografía de intercambio aniónico en amortiguador MES 0.1 M pH 6.0 como se muestra en la Fig. 15. La carga teórica de la proteína recombinante es negativa, lo que permitiría ser adsorbida por la matriz cargada positivamente (Q sepharosa®); sin embargo, esto no sucede, presumiblemente debido a un valor de pI real más alto de AtChi2.

Las fracciones no adherida y más abundantes muestran una banda alrededor de los 31 kDa en PAGE Bis-Tris al 10%; no obstante, también se observan bandas de mayor peso molecular, lo que se presume podrían ser estados oligoméricos de AtChi2.

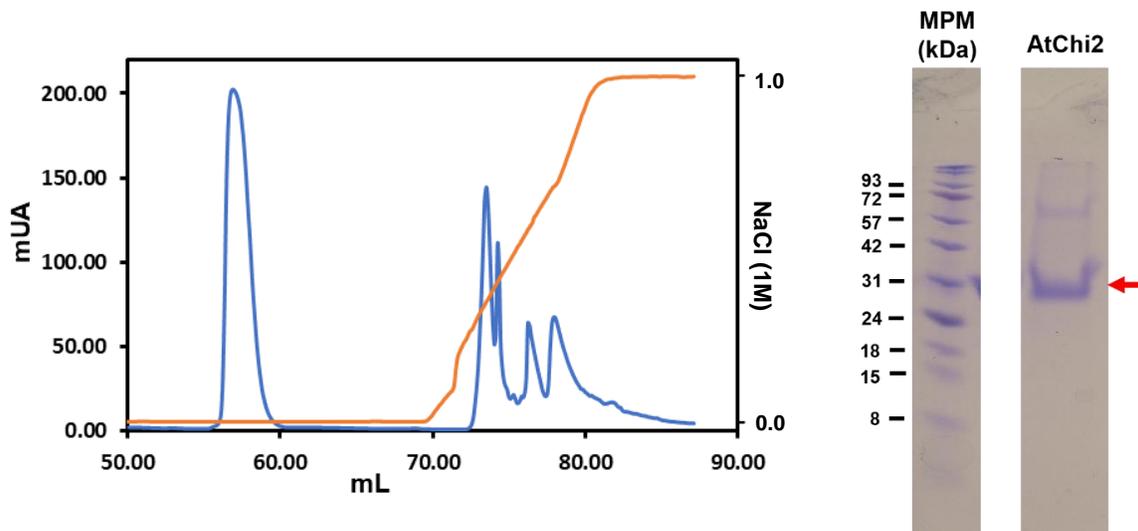


Figura 15. Purificación de rAtChi2, mediante cromatografía de intercambio aniónico. Cromatograma de elución de proteínas antes y después del gradiente lineal de NaCl 1 M (izquierda). Monitoreo de la purificación en SDS-PAGE 10% (derecha).

Espectrometría de masas de las quitinasas rAtChi1 y rAtChi2 de *A. tequilana* var. azul

Para probar que las quitinasas rAtChi1 y rAtChi2 se encontraban puras después del último paso de purificación, se midió la relación masa-carga de las biomoléculas a través de espectrometría de masas (Fig. 16). De este experimento se detectó la masa para rAtChi1 que corresponde al ion molecular $[M+H]^+$ de 31.8 y para rAtChi2 este valor fue de 31.6. Además, en ambos espectros se logró detectar masas cuyos valores correspondían al doble ($[2M+H]^+ \sim 64$) o triple ($[3M+H]^+ \sim 97$) del valor de la masa de las quitinasas, con lo que posiblemente podrían tratarse agregados.

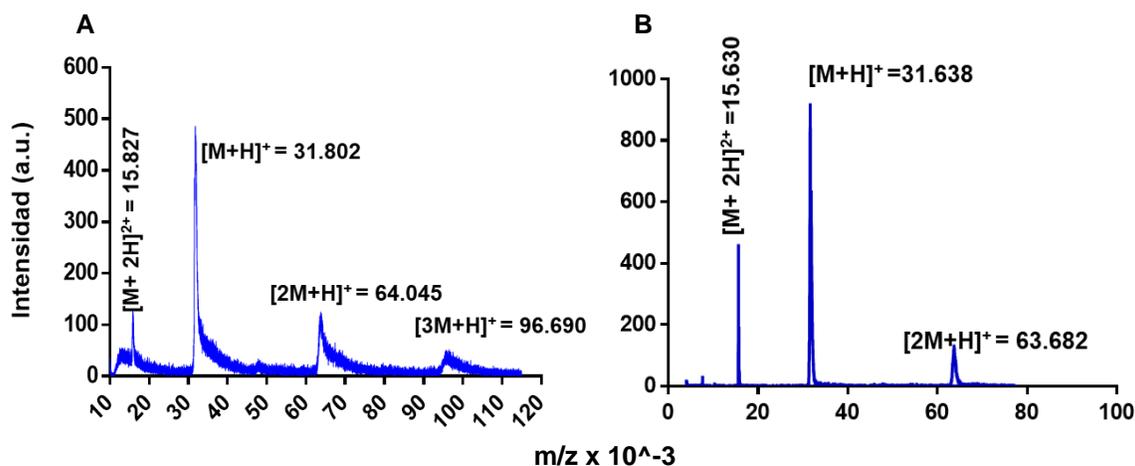


Figura 16. Espectrometría de masas MALDI-TOF de las quitinasas recombinantes de *A. tequilana* var. azul. **A. rAtChi1.** Ion doblemente cargado que corresponde a $[M+2H]^{2+}$; el ion molecular a $[M+H]^+$; dímero corresponde a $[2M+H]^+$; y el trímero que corresponde a $[3M+H]^+$ **B. rAtChi2.** Ion doblemente cargado que corresponde a $[M+2H]^{2+}$; el ion molecular a $[M+H]^+$; dímero corresponde a $[2M+H]^+$

4. Purificación de β -1,3 glucanasa y heveína nativas de *Hevea brasiliensis*

Para determinar un posible efecto sinérgico de inhibición del crecimiento fúngico se incluyeron β -1,3 glucanasas y una proteína de unión a quitina (heveína) de la planta *Hevea brasiliensis* junto con las quitinasas recombinantes de *A. tequilana* var. azul. En primer término, se purificaron dos isoformas de β -1,3 glucanasa de *H. brasiliensis* siguiendo el protocolo de Fuentes-Silva et al., (2007). A continuación, se muestran los pasos de purificación y el rendimiento final para cada isoforma (Tabla 4).

Tabla 4. Pasos de purificación de isoformas de β -1,3 glucanasa *Hevea brasiliensis*, GlucHbr Iso I y II.

Paso de purificación	Lote 1 (7/08/2009)	Lote 2 (3/10/2012)	
	Proteína total (mg)	Proteína total (mg)	
	555.6	1 562.0	
Extracción	2.52	2.63	
Microfiltración	-	2.32	
Cromatografía de exclusión molecular	0.46	0.84	
	GlucHbr Isoforma	Proteína total (mg)	Rendimiento (%)
Cromatografía de afinidad a ConA	I	1.04	0.05
	II	0.26	0.01

La actividad de β -1,3 glucanasa de las dos isoformas obtenidas, GlucHbr Iso I y II, se midió frente a laminarina en amortiguador de acetato de sodio pH 5.0 y se comparó con una muestra de β -1,3 glucanasa pura almacenada en el laboratorio (Fig. 17). Se observó que la isoforma II presentó 3 veces mayor actividad que la isoforma I. Debido a la cantidad obtenida de las isoformas de β -1,3 glucanasa no fue posible realizar réplicas de la medición de actividad enzimática.

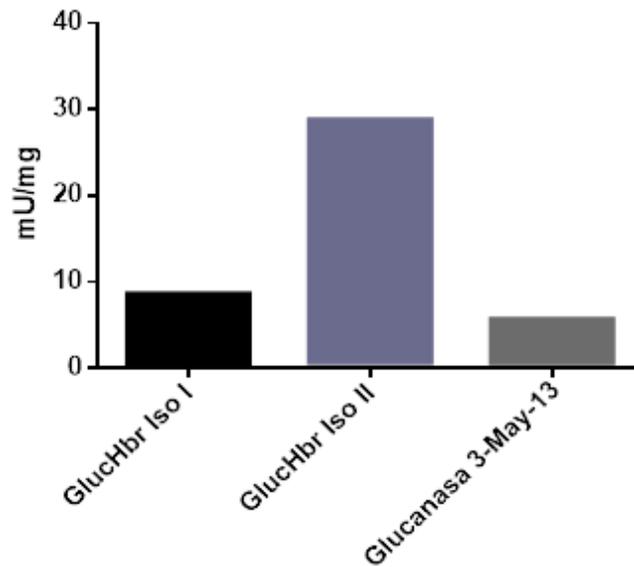


Figura 17. Actividad de β -1,3 glucanasa de las isoformas purificadas de *H. brasiliensis*. La unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que libera azúcares reductores equivalentes a 1 μ mol de glucosa por min por cantidad de proteína en mg.

Otra de las proteínas relacionadas con la patogénesis que se logró obtener de los lutoides de *H. brasiliensis* fue la proteína de unión a quitina (heveína), la cual se purificó conforme al protocolo Llinas-García (1999). En la Tabla 5 se muestran los pasos de purificación de dos lotes distintos de lutoides de *H. brasiliensis* y el rendimiento final para cada uno de ellos.

Tabla 5. Pasos de purificación de heveína *Hevea brasiliensis*.

Paso de purificación	Lote 1 (7/08/2009)			Lote 2 (3/10/2012)		
	Concentración (mg/mL)	Volumen total (mL)	Proteína total (mg)	Concentración (mg/mL)	Volumen total (mL)	Proteína total (mg)
Sedimento	-	-	555.6	-	-	1 562.0
Re-suspendido	1.78	3.0	5.34	1.44	2.0	2.88
Centrifugación	0.40	3.0	1.20	0.19	8.0	1.54
Microfiltración	0.32	3.5	1.14	0.16	8.0	1.26
Concentrado y dializado	0.36	3.0	1.093	-	-	-
CEM ^a	0.04	17	0.63	0.03	15	0.50
CIA [*]	0.88	4	0.35	-	-	-
Rendimiento por lote (%)			0.06			0.03
Rendimiento total (%)				0.04		

^aCEM: Cromatografía de exclusión molecular

^{*}CIA: Cromatografía de intercambio aniónico.

5. Ensayos de inhibición del crecimiento fúngico en placa por rAtChi1 y rAtChi2 en presencia de proteínas relacionadas con la patogénesis de *Hevea brasiliensis*

Para probar la actividad antifúngica de las quitinasas recombinantes de *A. tequilana* var. *azul* en sinergia con las proteínas nativas de *H. brasiliensis* (β -1,3 glucanasas y heveína), se realizaron ensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento de hongos. En el experimento 1 y 2 (Figura 18 y 19) se muestra el efecto de la presencia de discos que contienen a las proteínas relacionadas con la patogénesis frente al desarrollo de *Fusarium* sp. y *Aspergillus* sp. El crecimiento micelial rodeó y cubrió el disco control cargado únicamente con amortiguador (disco A, Fig. 19) y se produjeron medias lunas alrededor de los discos cargados con las proteínas, siendo el de mayor efecto el disco que contenía la combinación de AtChi1 y GlucHbr Iso II (disco E, Fig. 18). El efecto inhibitorio producido por estas proteínas fue similar para los dos tipos de fitopatógenos.

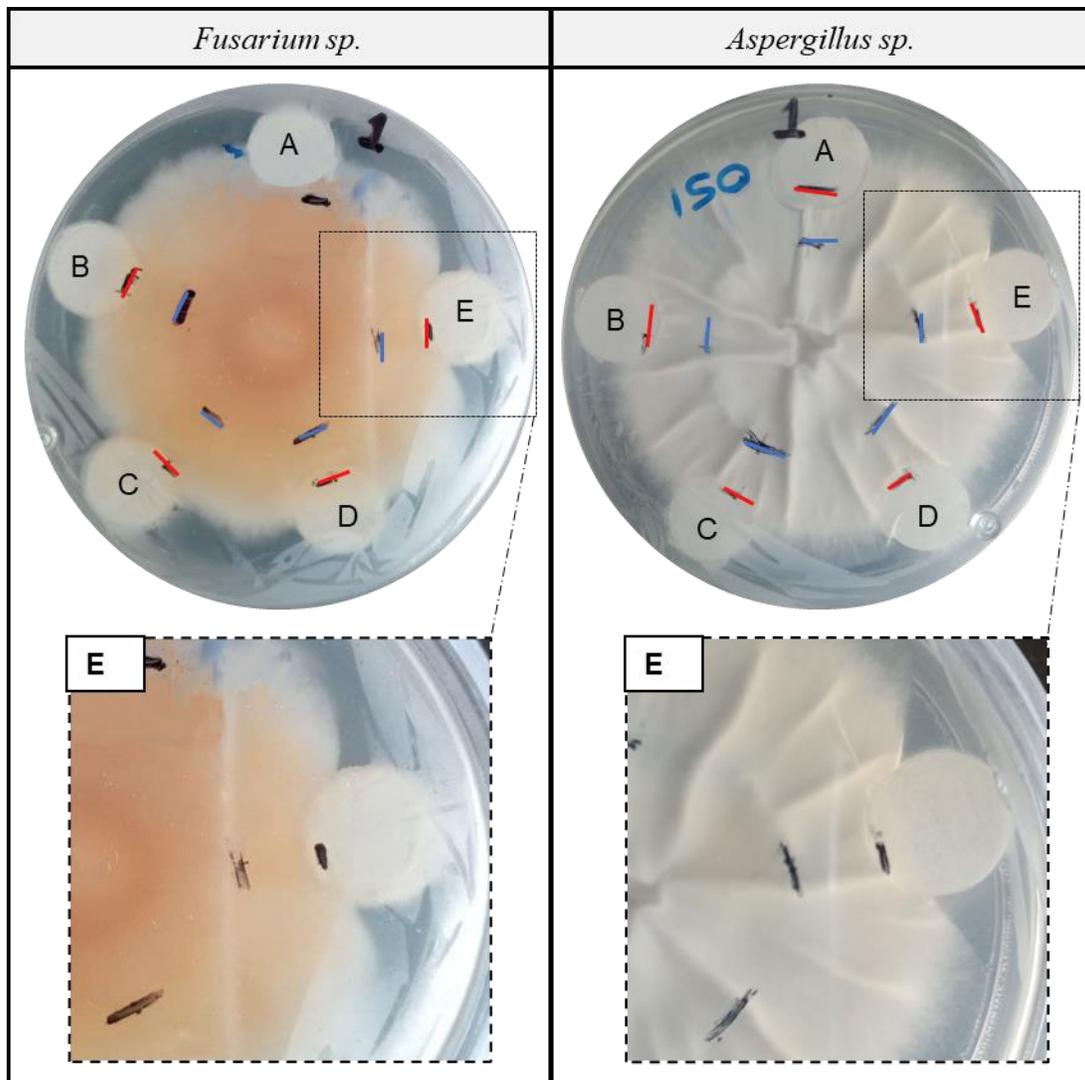


Figura 18. Primer ensayo de inhibición del crecimiento de fúngico. **A.** 150 μg rAtChi1 **B.** 150 μg rAtChi2 **C.** 150 μg rAtChi1 + 150 μg rAtChi2 **D.** 150 μg rAtChi1 y 40 μg heveína. **E.** 150 μg rAtChi1 + 47 μg GlucHbr Iso II. Línea —: Crecimiento de la colonia después de 2 días. Línea —: Discos de papel filtro colocados a 0.5 cm de distancia del crecimiento fúngico.

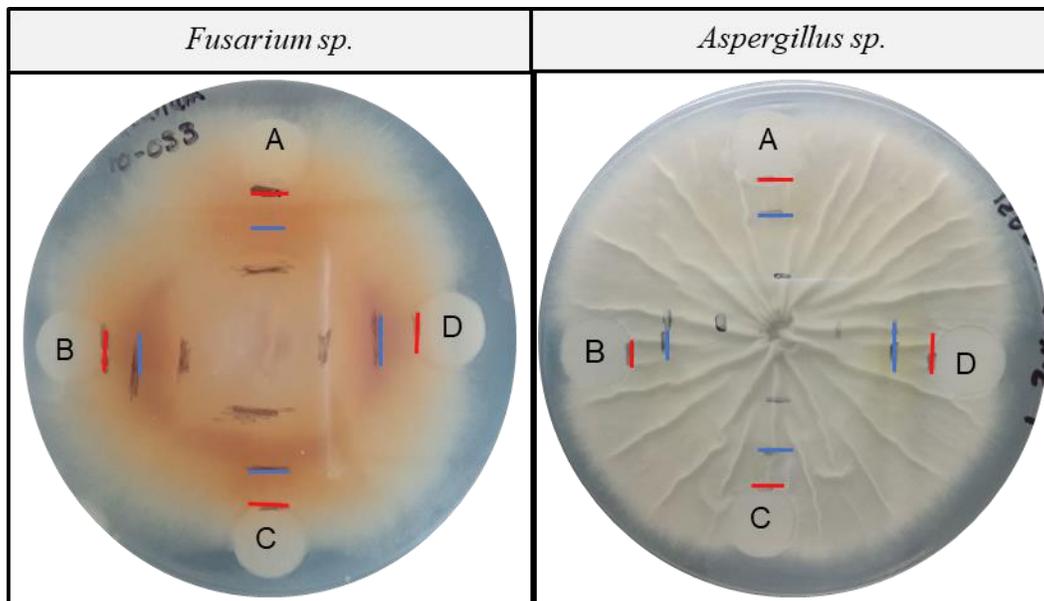


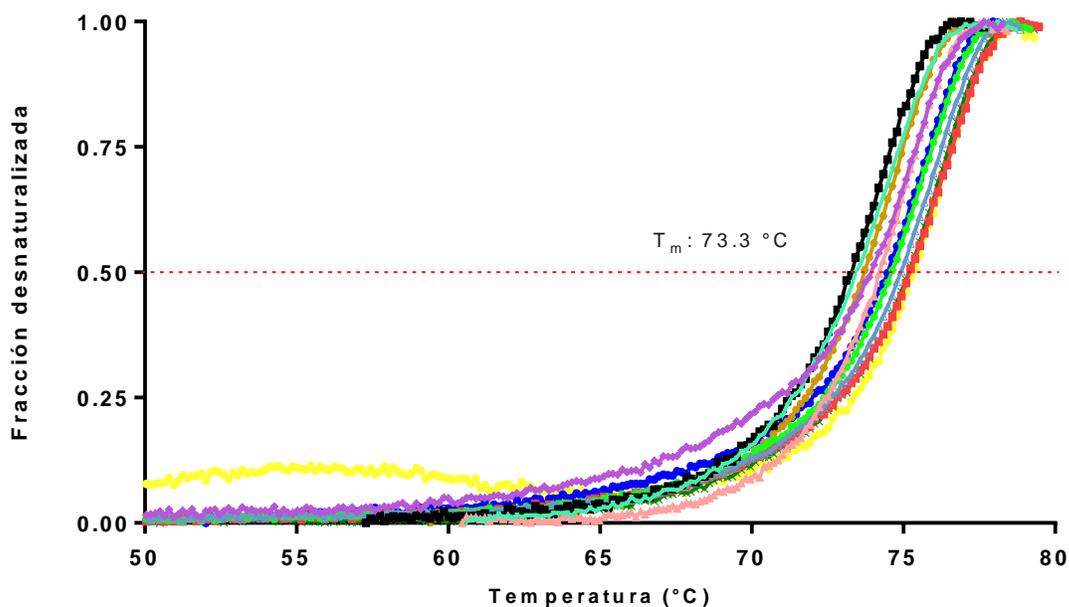
Figura 19. Segundo ensayo de inhibición del crecimiento de fúngico. **A.** Amortiguador citrato de sodio 20 mM pH 5.0. **B.** 150 μ g rAtChi1 **C.** 150 μ g rAtChi2 **D.** 150 μ g AtChi1 + 50 μ g GlucHbr Iso I. Línea —: Crecimiento de la colonia después de 2 días. Línea —: Discos de papel filtro colocados a 0.5 cm de distancia del crecimiento fúngico.

6. Condiciones de estabilidad para las quitinasas recombinantes AtChi1 y AtChi2

Con la finalidad de encontrar condiciones que propicien la cristalización de las quitinasas recombinantes, se realizaron pruebas de fluorimetría diferencial de barrido (thermal shift assay), ya que a menudo con el incremento de la estabilidad térmica el dinamismo y heterogeneidad del estado nativo disminuye, por lo que la muestra se vuelve más apta para su cristalización (Grøftehaug et al., 2015).

Para los ensayos se utilizó a rAtChi1, ya que debido al bajo rendimiento que se obtuvo de la purificación de rAtChi2 no se contó con la cantidad de proteína suficiente para tales pruebas. Las condiciones que se evaluaron fueron compuestos de diferentes naturaleza del kit de Aditivos HR2-428 (Hamptom Research) (ver Tabla A6 del anexo) disueltos en amortiguador MES pH 6.0.

En la Figura 20A se muestran las curvas del desplazamiento térmico para rAtChi1 obtenidas por la presencia de diferentes aditivos, mostrando solo aquellos compuestos que provocaron un ligero incremento (hasta un 3%) en el valor de temperatura media de desnaturalización (T_m) con respecto al ensayo que no contenía ningún aditivo (curva de color negro). De esta lista (Fig. 20B) se puede observar que en su mayoría son compuestos que presentan grupos hidroxilo, como monosacáridos, disacáridos o bien, que son capaces de formar puentes de hidrógeno a través de sus grupos funcionales (glicina y glicil-glicil-glicina), permitiendo que a través de esta interacción se establezca la estructura terciaria.

A**B**

Curva	Compuesto	Concentración Final	T _m (°C)
	Glicil-glicil-glicina	0.15 M	73.4
	Mio-inositol	6 % p/v	73.7
	Glicerol	15 % p/v	73.9
	Glicina	0.5 M	74.2
	D-(+)-Trehalosa dihidratada	15% p/v	74.5
	Sacarosa	15 % p/v	74.6
	D-(+)-Glucosa monohidratada	15 % p/v	74.9
	Xilitol	15 % p/v	75.2
	D-Sorbitol	15 % p/v	75.2
	D-(+)-Galactosa	15 % p/v	75.4

Figura 20. Ensayo de desplazamiento térmico de la quitinasa rAtChi1. **A.** Curva de transición térmica de rAtChi1 en presencia de diferentes aditivos en amortiguador MES 20 mM pH 6.0. **B.** Lista de aditivos que incrementaron el valor de la T_m.

7. Predicción *in silico* de la estructura tridimensional de las quitinasas rAtChi1 y rAtChi2 de *A. tequilana* var. azul

A través de recientes métodos computacionales, basados en inteligencia artificial, se predijeron las estructuras terciarias de las quitinasas recombinantes. Los métodos empleados predijeron con alta precisión los dominios funcionales de rAtChi1 y rAtChi2; sin embargo, como era de esperarse, mostraron baja confiabilidad en la región que corresponde al péptido conector (Anexo Fig. 1A). La calidad estructural fue evaluada encontrando ligeras diferencias entre ambos métodos (Anexo Tabla A7).

Tomando como referencia los modelos obtenidos a través de AlphaFold2, se compararon las diferencias estructurales encontradas por medio de una superposición con las quitinasas de clase I, hasta la fecha reportadas. Se utilizó el software VMD y Chimera (Humphrey, et al., 1996 y Pettersen et al., 2004) para tal fin.

La Figura 21A muestra la superposición de los modelos estructurales de rAtChi1 y rAtChi2 (amarillo y verde, respectivamente) sobre las estructuras de quitinasa de *S. glauca* y *O. sativa* (rojo y cian, respectivamente). En este se aprecia que el dominio catalítico de las quitinasas se sobrepone bien en la mayoría de las estructuras secundarias, sin embargo, para el dominio de unión a quitina no ocurre debido a la orientación adoptada por el péptido conector multidominio.

La Figura 21B muestra un alineamiento múltiple del péptido conector de las quitinasas, donde se observa una clara diferencia en longitud e identidad de los aminoácidos que lo constituyen. La Figura 21C muestra la superposición del dominio de unión a quitina, en el que se presentan los aminoácidos implicados en la unión con el sustrato, se observan diferencias en la identidad y orientación de estos residuos. Finalmente, el dominio catalítico de las enzimas fue comparado (Fig. 22D) a través de la superposición de los carbonos alfa, aquí se observa que la mayor parte de las estructuras secundarias se encuentran sobrepuestas y adquieren una orientación semejante, además en la amplificación se muestran residuos implicados en la catálisis, los cuales son idénticos y se sobrepone completamente.

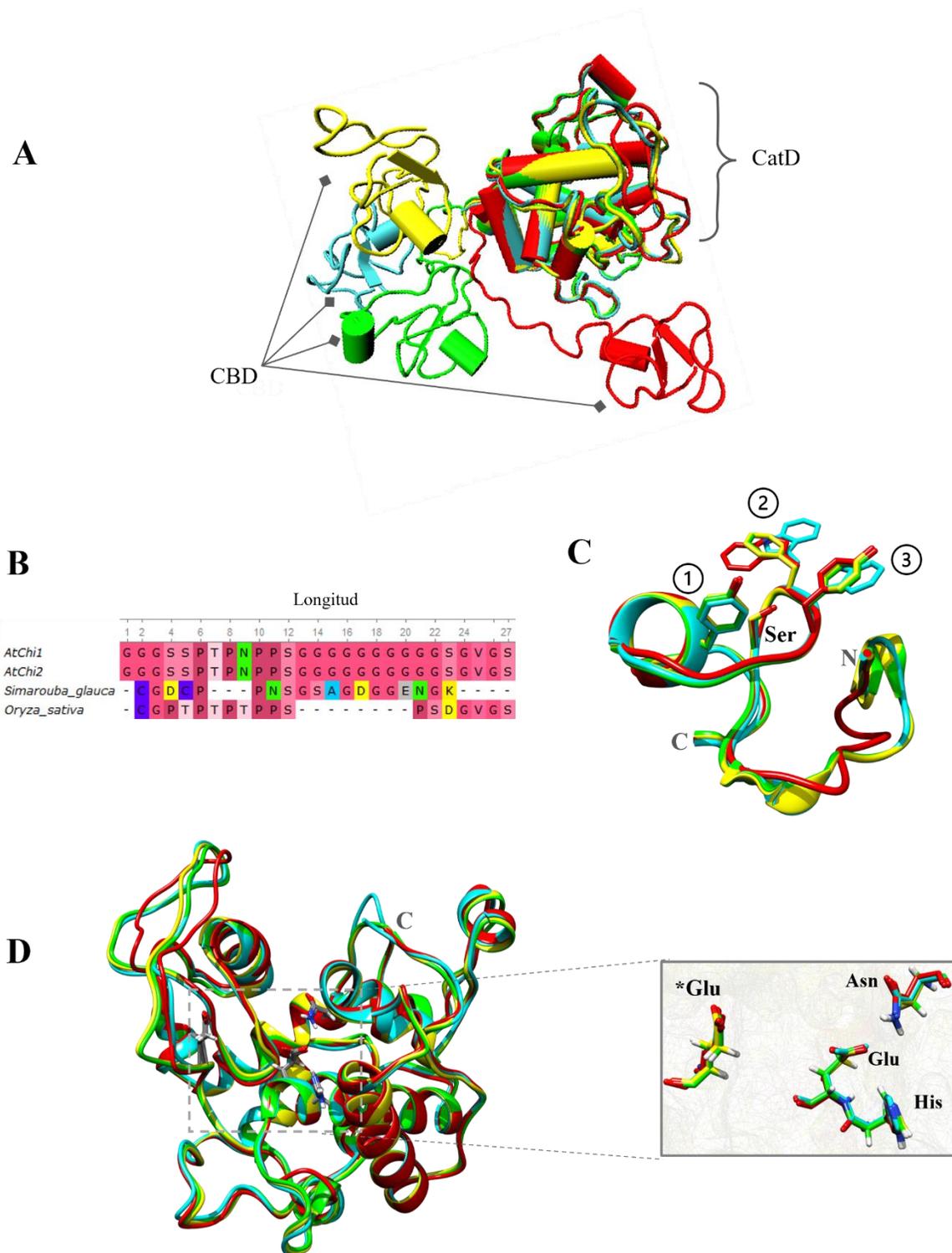


Figura 21. Superposición de la estructura terciaria de las quitinasas de clase I. *Simarouba glauca* (PDB: 6LNR) en rojo; *Oryza sativa* (PDB: 2DKV) en cian; AtChi1 (predicción con AlphaFold2) en amarillo y AtChi2 (predicción con AlphaFold2) en verde. **A.** Superposición de la estructura completa de las quitinasas de clase I en representación de caricatura. **B.** Alineamiento múltiple de secuencias del péptido conector. Algoritmo usado MAFFT. **C.** Superposición del dominio de unión a quitina. En representación de ball & sticks

se muestran los aminoácidos implicados en la unión con la quitina: (1) corresponde a F-30 (*O. sativa*), Y-26 (*S. glauca*), Y-30 (AtChi1) y Y-30 (AtChi2); (2) corresponde a W-21 (*O. sativa*), W-18 (*S. glauca*), F-21 (AtChi1) y F-21 (AtChi2); (3) corresponde a W-23 (*O. sativa*), Y-20 (*S. glauca*), Y-23 (AtChi1) y Y-23 (AtChi1). **D.** Superposición del dominio catalítico y amplificación del sitio activo con representación en ball & stick de residuos implicados en la catálisis. *Glu: E-122 (*O. sativa*), E-122 (*S. glauca*), E-129 (AtChi1 y AtChi2); Asn: N-254 (*O. sativa*), N-249 (*S. glauca*), N-261 (AtChi1 y AtChi2); Glu: E-144 (*O. sativa*), E-141 (*S. glauca*), E-151 (AtChi1 y AtChi2); His: H-121 (*O. sativa*), H-121 (*S. glauca*), H-128 (AtChi1 y AtChi2).

8. Filogenia de quitinasas de *A. tequilana* var. *azul* y otras especies del género *Agave*

Recuperación de secuencias de quitinasas y proteínas tipo quitinasas

Se obtuvieron secuencias de quitinasas y proteínas tipo quitinasas del género *Agave* y *Yucca* a partir de datos transcriptómicos depositados en las bases de datos NCBI y CNGB. Los transcritos se sometieron a un proceso de curado para obtener secuencias maduras de quitinasas y proteínas tipo quitinasas, como se muestra en el ejemplo de la Figura A2 y A3 del Anexo. Dentro de las secuencias obtenidas se encuentran quitinasas de clase I, II y IV así como proteínas tipo quitinasas clase II, con un mayor número de secuencias para aquellos trabajos con mayor número de tejidos de la planta analizados (Tabla 6).

La información del alineamiento a nivel nucleótido de las 53 secuencias de quitinasas se presenta resumida en la Tabla A14 del Anexo. Estos datos fueron recuperados con el programa AMAS (Borowiec, 2016).

Análisis filogenéticos

Para la reconstrucción filogenética mediante inferencia Bayesiana (IB) se obtuvieron los valores del análisis estadístico que se muestran en la Tabla A15 y A16 del Anexo. En este último se indica el modelo nucleotídico ocupado y los valores de confiabilidad para las tasas de cambio reversibles para los diferentes nucleótidos.

A través de la estimación filogenética producida por el método probabilístico de IB se obtuvo el árbol filogenético mostrado en la Figura 22, cada clase de quitinasa y proteína tipo quitinasa se muestra en el árbol agrupadas en clados de diferente color y los números junto a los nodos indican los valores de probabilidad a posterior (mayor al 60%). Además, usando un método distinto de reconstrucción filogenética como Máxima Verosimilitud (ML), se logró obtener una arquitectura similar del árbol filogenético (Anexos Fig. A4).

Tabla 6. Secuencias curadas de quitinasas y proteínas tipo quitinasas de cuatro especies de *Agave* y dos especies de *Yucca* a partir de datos transcriptómicos.

Género y especie	No. de acceso en la base de datos	No. de secuencias		Clase de quitinasa	Tejido analizado	Autor
		Encontradas	Curadas			
Base de datos NCBI, National Center for Biotechnology Information						
<i>A. tequilana</i> var. azul	GAHU000000000	30	17	I, II, IV y tipo quitinasa II	Cogollo, hoja y raíz	Gross et al., 2013
<i>A. deserti</i>	GAHT000000000	29	13	I, II, IV y tipo quitinasa II	Cogollo, hoja y raíz	Gross et al., 2013
<i>A. americana</i>	GBHM000000000	18	9	I, II, IV y tipo quitinasa II	Hoja, meristemo, rizoma, raíz o tallo	Abraham et al., 2016
<i>A. sisalana</i>	GGRE000000000	11	5	I, II y tipo quitinasa II	Hoja	Sarwar et al., 2019
<i>Y. gloriosa</i>	GFHP000000000	9	5	I, IV y tipo quitinasa II	Tallo y hoja	Zinkgraf et al., 2017
<i>Y. filamentosa</i>	ICNN	16	5	I, II, IV y tipo quitinasa II	-	Leebens-Mack et al., 2019

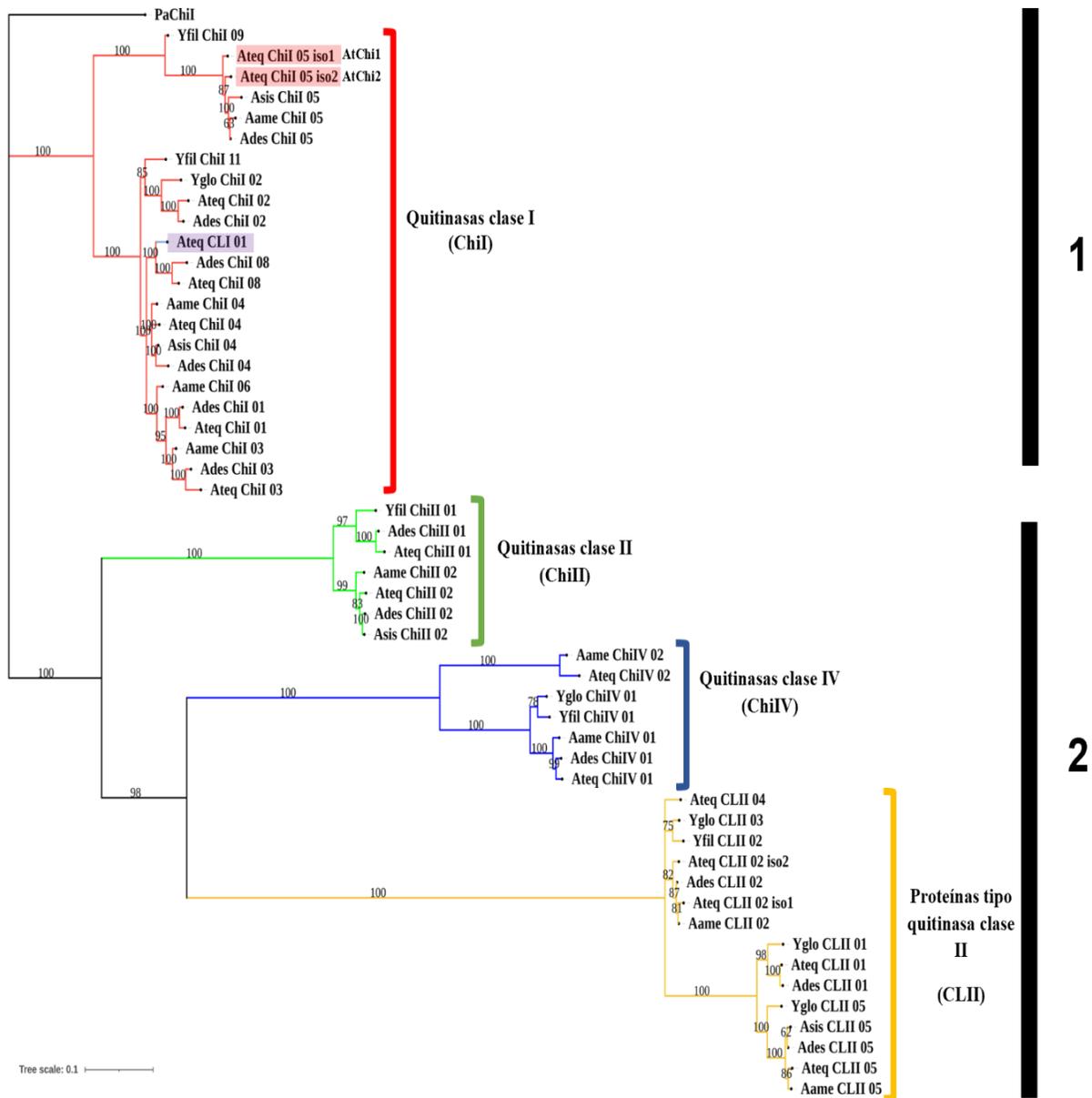


Figura 22. Reconstrucción filogenética de secuencias de quitinasas y proteínas tipo quitinasas de *A. tequilana* var. *azul* y otras especies dentro del género *Agave* y *Yucca*. Árbol obtenido por el método de IB con el programa MrBayes v3.2. Los valores en las ramas representan la probabilidad *a posteriori*.

IX. DISCUSIÓN

En esta sección se destacan los aspectos más importantes de este trabajo que permiten sugerir que es posible producir enzimas activas y estables de *A. tequilana* var. azul y *H. brasiliensis* que pueden ser usadas para el control del crecimiento de algunos hongos patógenos. Dadas las circunstancias de pandemia bajo las cuales se desarrolló el trabajo experimental, no fue posible obtener cantidades de enzimas necesarias para corroborar algunos resultados.

- **Presencia de los genes AtChi1 y AtChi2 en las construcciones pET32a modificado y pMCSG7**

Previamente Sierra et al. (2019) obtuvieron los sistemas de vectores recombinantes en el que insertaron los genes que codifican para AtChi1 y AtChi2. Por lo tanto, para iniciar la producción de las proteínas recombinantes se verificó que dichos insertos se encontraran en las construcciones. Se hicieron experimentos de digestión con endonucleasas de restricción, con lo que se encontraron los patrones de fragmentación esperados para los plásmidos pET32a y pMCSG7, como se muestra en los geles de agarosa de la Figura 10, confirmando de esta forma la presencia de los insertos dentro de las construcciones.

- **Purificación de rAtChi1 y rAtChi2 de *Agave tequilana* var. azul**

El proceso de purificación de rAtChi1 y rAtChi2 a partir de células de *E. coli* se realizó conforme a Sierra et al. (2019), como se muestra a través de los perfiles de elución de las técnicas cromatográficas ocupadas y los geles PAGE-SDS (Figura 14A y 15, respectivamente). Las proteínas puras presentan bandas con masas esperadas para las quitinasas recombinantes; no obstante, además se observaron bandas con tamaños del casi el doble para rAtChi1 y rAtChi2. Al tratarse de condiciones reductoras (2-mercaptoetanol) se descarta la posibilidad de la formación de enlaces disulfuro entre proteínas; sin embargo, como estrategia

experimental para reducir el volumen de la mezcla a cargar en el gel PAGE-SDS la muestra se sometió a un mayor tiempo a temperatura mayor a 90 °C, estas condiciones se saben pueden promover interacciones de diferente tipo (p. ej. interacciones covalente como enlaces isopeptídicos), por lo que la agregación no ordenada de las proteínas podría dar lugar a las bandas de mayor masa molecular.

- **Análisis de la pureza de las quitinasas recombinantes AtChi1 y AtChi2 de *Agave tequilana* var. azul por espectrometría de masas, criterio de pureza**

La pureza de rAtChi1 y rAtChi2 se verificó a través de espectrometría de masas (MALDI-TOF). Se obtuvo la relación masa-carga de las quitinasas recombinantes, con los valores del ion molecular $[M+H]^+$ de 31.8 para rAtChi1 y para rAtChi2 de 31.6, no obstante, a partir de esta técnica se detectaron otras señales que presentaban relación masa/carga de aproximadamente el doble o el triple de los iones moleculares, lo que sugiere la presencia de estados oligoméricos de las quitinasas recombinante. Previamente Sierra et al. (datos no publicados) habían observado efectos de oligomerización de las quitinasas rAtChi1 y rAtChi2.

- **Purificación de β -1,3 glucanasa y proteína de unión a quitina (heveína) nativas de *Hevea brasiliensis***

Para conocer si existe un efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento *in vitro* de hongos por las quitinasas rAtChi1 y rAtChi2 en presencia de otras proteínas relacionadas con la patogénesis con actividad antifúngica se purificaron β -1,3 glucanasas y una proteína de unión a quitina (heveína) de *H. brasiliensis*. Los lotes de lutoides ocupados produjeron un rendimiento bajo de las isoformas de β -1,3 glucanasas, lo que podría deberse a la condición en la expresión de dichos genes en las muestras utilizadas (Chungchow et al., 1995; Fuentes-Silva, 2009). Finalmente, las dos isoformas de β -1,3 glucanasas purificadas presentaron actividad frente a laminarina en amortiguador de acetatos pH 5.0, siendo la GlucHbr Iso II la que presenta mayor actividad (Fig. 17).

De acuerdo con la Tabla 6 que muestra los pasos de purificación para la obtención de heveína, se tuvo un rendimiento un 30% menor al reportado por Llinas-García, (1999), esto podría deberse a que se empleó látex de clonas de *H. brasiliensis* distintas a la que se utilizó en dicho estudio.

- **Evaluación del efecto sinérgico de las quitinasas recombinantes AtChi1 y AtChi2 de *Agave tequilana* var. azul y proteínas antifúngicas de *Hevea brasiliensis***

Los ensayos de inhibición del crecimiento fúngico en presencia de las quitinasas recombinantes más otras proteínas PR antifúngicas mostraron un ligero incremento de la capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Fusarium* sp. y *Aspergillus* sp., en comparación el efecto inhibitorio observado por la acción individual de las quitinasas (Fig. 18 y 19). Si bien, para probar la existencia de un efecto sinérgico causado por la combinación de las diferentes enzimas empleadas se requiere de la implementación de diferentes combinaciones enzimática y por tanto de un número mayor de ensayos; sin embargo, una aproximación que ofrece este estudio es a través de la comparación de los discos C y E del primer experimento (Fig. 18), donde la acción inhibitoria de la rAtChi1 más GlucHbr Iso II tiene un efecto superior (disco E) a la suma de las quitinasas recombinantes (disco C). Estos resultados dan indicios de un posible efecto sinérgico entre las quitinasas recombinantes de *A. tequilana* var. azul y β -1,3 glucanasas de *H. brasiliensis*. Es importante mencionar que la concentración de rAtChi1 y rAtChi2 empleada corresponde a la concentración más baja utilizada en el trabajo previo de Sierra et al. (2019), por lo que el efecto inhibitorio del crecimiento es menor.

Por otra parte, en los discos que contenían la combinación de la rAtChi1 y alguna de las isoformas de β -1,3 glucanasas de *H. brasiliensis*, se observa que la presencia de la isoforma GlucHbr Iso II (Fig. 18 disco E) en el disco incrementa más el halo de inhibición de crecimiento fúngico en comparación del halo generado con la GlucHbr

Iso I (Fig. 19 disco D), atribuyendo esto a que la isoforma II presentó una mayor actividad de β -1,3 glucanasa.

En general, se observó un ligero incremento de la inhibición del crecimiento *in vitro* en los experimentos de actividad sinérgica con la rAtChi1 e las isoformas de β -1,3 glucanasa, siendo este efecto mayor para el hongo *Fusarium* sp., lo cual podría deberse a la composición de la pared celular de dicho hongo lo que lo vuelva sensible a la presencia de quitinasas y glucanasas

- **Condiciones de estabilidad térmica para las quitinasas recombinantes AtChi1 y AtChi2**

La determinación de la estructura tridimensional de las quitinasas de *A. tequilana* var. azul mediante cristalografía, requiere de la obtención de cristales adecuados para llevar a cabo experimentos de difracción de rayos X. La formación de cristales es afectada por variables como: pH, fuerza iónica, aditivos, concentración de precipitante y proteína. Previamente, Sierra et al. (2019) determinaron el pH y el tipo de amortiguador en el que las quitinasas recombinantes AtChi1 y AtChi2 presentan la mayor termoestabilidad, esto a través de ensayos de estabilidad térmica basados en fluorescencia o fluorimetría diferencial de barrido (DSF, por sus siglas en inglés). La termoestabilidad es una característica importante que permite predecir *a priori* las condiciones necesarias para el crecimiento exitoso de cristales proteicos (Ericsson et al., 2016). Por lo anterior, el presente trabajo abordó el estudio de la termoestabilidad de las quitinasas de *A. tequilana* var. azul en presencia de diferentes aditivos como parámetro adicional que permita incrementar la probabilidad de obtener cristales de proteína. Cabe mencionar que, debido al bajo rendimiento obtenido de la purificación de rAtChi2, solo se realizaron los ensayos para la proteína rAtChi1.

Para este fin, se emplearon un total de 91 reactivos, como se muestra en la Tabla A6 de la sección de Anexos. Los resultados muestran que en presencia de distintas clases de aditivos los valores de T_m de AtChi1 se encuentra cercanos al valor del ensayo control (hasta un <4%), esto ocurre con los siguientes reactivos: iones

multivalentes (BaCl_2 , 70.6 °C; CaCl_2 , 70.6 °C; MgCl_2 , 71.6 °C), sales ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 72.8 °C; KCl , 71.4 °C; CsCl , 71.2 °C; NaF , 71.2 °C), agentes quelantes (EDTA, 71.8 °C), agentes de disociación (NaBr , 72.2 °C), aminoácidos (L-prolina, 72.9 °C), algunos agentes caotrópicos (urea, 72.9 °C), compuestos espaciadores/enlazadores hidrófilos (glicina, 74.1 °C; glicil-glicil-glicina, 73.4 °C; taurina, 73.3 °C), polioles (glicerol, 73.9 °C) y compuestos anfifílicos (1,2,3-heptanotriol, 73.1 °C). Dada la naturaleza química de estos compuestos se considera que probablemente interacciones no covalentes, como las de puentes de hidrógeno y electrostáticas no modifican de manera drástica el valor del punto medio de desnaturalización de rAtChi1. Ahora bien, aditivos como cofactores (β -NAD, 43.0 °C; ATP, 52.6 °C), agentes reductores (GSH/GSSG, 60.5 °C), osmolitos como el N-óxido de trimetilamina (67.0 °C) y algunos iones metálicos (CrCl_3 , 45.5 °C; YCl_3 , 45.9 °C; ZnCl_2 , 52.2 °C) influyen negativamente en el desplazamiento del punto medio de transición térmica en comparación con el valor control (hasta un <40%) (ver Anexos, Tabla A6). Por otro lado, existen condiciones en las que no se obtuvieron curvas típicas de desnaturalización para rAtChi1, pues probablemente los aditivos provocaron el desplegamiento de la estructura terciaria de la proteína generando superficies hidrófobas a las que se unió la sonda fluorescente.

Las condiciones que propiciaron un ligero incremento del valor de T_m con respecto al control (hasta un 3%) fueron principalmente carbohidratos y algunos aditivos como espaciadores/enlazadores hidrófilos y polioles, como se muestra en la Figura 20B. Se propone que la preservación de la estructura nativa a altas temperaturas en presencia de dichos aditivos se debe a que estas moléculas tienen la capacidad de mantener interacciones estabilizadoras proteína-reactivo reemplazando las de tipo proteína-agua, dada su capacidad de formar enlaces no covalentes de tipo puente de hidrógeno (Crowe et al., 1998). Por otra parte, del gráfico de la Fig. 20A, se observa que la curva de desnaturalización térmica de rAtChi1 con galactosa presenta un incremento en la fracción desnaturalizada a temperaturas entre 50-60 °C, dada la alta termoestabilidad de rAtChi1 este comportamiento presumiblemente se deba un cambio conformacional o a la triada de residuos aromáticos que se sitúa en el dominio de unión a quitina, el cual forma un bolsillo o *pocket* poco profundo de

unión a la quitina (Kezuka et al., 2010), lo que permitiría la unión de la molécula fluorescente.

Finalmente, el estudio nos otorga información de utilidad en la elección del agente crioprotector. Los crioprotectores más usados que evitan la formación de cristales de moléculas de agua que dañan la estructura cristalina de las proteínas son el glicerol, 2-metil-2,4-pentanediol (MPD), etilenglicol y polietilenglicol (PEG) de bajo peso molecular (Drenth & Mesters, 2007). Los crioprotectores que afectan la termoestabilidad de la quitinasa recombinante AtChi1 son el polietilenglicol 3,350 (no se obtuvo curva típica de desnaturalización) y etilenglicol ($T_m=69.3\text{ }^{\circ}\text{C}$) los cuales no deben usarse, no así el caso de glicerol que incrementó ligeramente el valor de la T_m con respecto al valor control ($T_m=73.9\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Debido a que la cantidad de rAtChi1 purificada se empleó en diferentes objetivos experimentales, no fue posible montar pruebas de cristalización en las condiciones encontradas.

- **Predicción *in silico* de la estructura tridimensional de las quitinasas recombinantes AtChi1 y AtChi2 de *A. tequilana* var. azul**

La caracterización de los mecanismos de defensa que intervienen en la interacción planta-patógeno nos permite entender mejor los procesos de respuesta empleados por las plantas para afrontar el ataque de fitopatógenos. A este respecto, se ha generado conocimiento a nivel molecular para entender el plegamiento que tienen las quitinasas de plantas de diferentes especies, discutido ampliamente en la revisión de Ubhayasekera et al. (2011). Sin embargo, los casos de éxito para elucidar la estructura tridimensional de quitinasas de clase I resultan ser muy escasos, como los de *Oryza sativa* L. *japónica* (Kezuka et al., 2010) y *Simarouba glauca* (Balu et al., 2020). Determinar la estructura terciaria de AtChi1 y AtChi2 de *Agave tequilana* var. azul representa una fuente importante de información y especialmente dentro de esta especie taxonómica.

Si bien, aún no se ha logrado obtener experimentalmente la estructura de las quitinasas recombinantes de *Agave tequilana* var. azul, en este estudio se abordó una aproximación a través de recientes métodos computacionales. Los modelos predichos de las quitinasas recombinantes permitieron distinguir diferencias con las estructuras de las quitinasas de clase I de *O. sativa* y *S. glauca*. Aquellas diferencias se hacen notar con la disposición espacial que adquiere el dominio de unión a quitina (CBD) (Fig. 21A). En el caso del cristal de *O. sativa*, el dominio CBD se encuentra en el lado opuesto al sitio activo y para el cristal de *S. glauca* este se encuentra cercano al sitio activo. Balu et al. (2020) proponen que la orientación espacial del CBD cercano al sitio activo es útil o necesaria para que se acomode el polímero de quitina en una geometría adecuada para una catálisis efectiva. La orientación espacial del dominio tipo heveína para la quitinasa de clase I de *O. sativa*, así como la de los modelos predichos de las quitinasas recombinantes de *A. tequilana* var. azul, resultan estar opuestos al sitio activo, lo cual ha sido observado a través de experimentos de SAXS (por sus siglas en inglés, small-angle X-ray scattering) (Kezuka et al., 2010 y Sierra et al., 2019, respectivamente), con una conformación extendida y los dominios separados uno del otro. Sin embargo, esta geometría no permitiría una catálisis efectiva por parte del dominio CatD. Lo que se propone es que ambos dominios funcionales se encuentran del mismo lado en presencia del sustrato, consiguiéndose esto a través de las propiedades que concede el péptido conector de las quitinasas de clase I. El alineamiento múltiple de secuencia de la Fig. 21B permite observar las diferencias en longitud de la región del péptido conector. En el caso de las quitinasas recombinantes de *A. tequila* var. azul presentan una longitud aprox. 30% mayor que el de *O. sativa* y *S. glauca*, además los péptidos conectores son ricos en aminoácidos como glicina (55.6% del total de aminoácidos), dichas características proporcionan flexibilidad y permiten la movilidad de los dominios (Chen et al., 2013), con lo que la interacción entre el dominio de unión a quitina y el dominio catalítico se justificaría.

Respecto al dominio CBD, las quitinasas AtChi1 y AtChi2 comparten un 72 y 54% de identidad con el dominio CBD de *O. sativa* y *S. glauca*, respectivamente, En dicho dominio se tiene una región central compuesta por una triada de residuos

aromáticos y una serina, que se sabe forman el bolsillo o “*pocket*” de unión a quitina (Kezuka et al., 2010), representados en la Fig. 21C por los números 1, 2 y 3. La posición 1 corresponde a la Tyr-30 en AtChi1 y AtChi2 que sobreponen bien con los residuos de Phe-30 y Tyr-26 de los cristales de *O. sativa* y *S. glauca*; dicho aminoácido se ha visto implicado en la formación de un puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo hidroxilo de una unidad de *N*-acetil glucosamina que conforman la quitina (Harata & Muraki, 2000). La posición 2 y 3 conservan similitud, siendo Phe-21 y Tyr-23 en el caso de las quitinasas recombinantes, esto es importante ya que la orientación de los anillos aromáticos en esta ubicación se ha visto que mantienen interacciones hidrofóbicas con los anillos de los oligosacáridos de quitina (Kezuka et al., 2010; Harata & Muraki, 2000).

- **Familia de quitinasas de *A. tequilana* var. azul y otras especies de la subfamilia Agavoideae**

En este estudio se identificó a la familia de quitinasas GH-19 de *A. tequilana* var. azul formada por 17 secuencias obtenidas a partir de datos transcriptómicos. Esta familia tiene 7 quitinasas de clase I, 1 secuencia tipo quitinasa clase I, 2 secuencias de clase II, 2 secuencias de clase IV y 5 secuencias de proteínas tipo quitinasas de clase II. Estos transcritos se encontraron en tejidos como cogollo, penca y raíz (Tabla 6) colectados de dos diferentes plantas adultas ubicadas en plantaciones de Guanajuato, México. Una de las preguntas que surgen en torno a el papel que tienen las quitinasas de la familia GH-19, aquí identificadas, es si su función está relacionada con la defensa de la planta o bien, tienen un papel en su desarrollo. Van Loon et al. (2006) mencionan que en algunas especies como *Arabidopsis* y arroz la familia de proteínas PR-1 conformada por 22 y 39 genes, respectivamente, solo uno o dos de estos genes se inducen por la presencia de fitopatógenos. Aunque se hable de otras posibles funciones de las proteínas PR expresadas de manera constitutiva, resulta de gran interés investigar el papel que puedan desempeñar las quitinasas y proteínas tipo quitinasas identificadas en plantas aparentemente sanas de *A. tequilana* var. azul crecidas en campo.

Con el fin de incrementar el conocimiento sobre las quitinasas de la familia GH-19, dentro del contexto de la subfamilia Agavoideae, se realizó su identificación en diferentes especies del género *Agave*, como *A. americana*, *A. sisalana* y *A. deserti*, las cuales presentan una puntuación de importancia equivalente al de *A. tequilana* var. azul, de acuerdo con el reciente estudio de Alducin-Martínez et al. (2022). Dicha puntuación contempla aspectos como el nivel de riesgo basado en la Lista Roja de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza), endemismo en México, usos generales y conocimiento de polinizadores. La identificación de quitinasas de la familia GH-19 incluyó un género distinto que forma parte de la subfamilia Agavoideae, siendo este el género *Yucca*. Dicho género es un punto de referencia que nos permite conocer si la presencia de ciertos transcritos resultan de aparición reciente o bien son conservados previo a la divergencia entre los géneros *Yucca* y *Agave*.

El estudio anterior nos muestra un patrón distinto en la presencia de transcritos, con una menor presencia del número quitinasas identificadas en los transcriptomas de las distintas especies de la subfamilia Agavoideae (Tabla 6). Estas diferencias podrían deberse al menor número de tejidos analizados por planta en los diferentes estudios transcriptómicos. Los trabajos en donde no se incluye el tejido del meristemo apical conocido, como cogollo, coincide con un menor número de secuencias de quitinasas encontradas; no obstante, para poder aseverar que existe una expresión diferencial en tejidos específicos, se requieren de diversos diseños experimentales.

Definida la familia de quitinasas de la subfamilia Agavoideae así como propuesta la nomenclatura para los transcritos, se indicó posteriormente el parentesco evolutivo de las quitinasas de *A. tequilana* var. azul entre sí y con las quitinasas de la subfamilia Agavoideae utilizando árboles filogenéticos. En dicho árbol se utilizó una secuencia de quitinasa de clase I de *P. americana* o aguacate (Sowka et al., 1998), que sirvió como grupo externo, pues pertenece a un linaje distinto de las monocotiledóneas.

El árbol filogenético obtenido (Fig. 22) muestra que las quitinasas se agrupan en dos grandes grupos, el primero conformado por quitinasas de clase I (clado color rojo) y, el segundo, en el que se conjuntan el resto de quitinasas encontradas, quitinasas clase II (clado verde), quitinasas clase IV (clado azul) y finalmente las secuencias más recientes, las proteínas tipo quitinasas de clase II (clado amarillo), que se aprecian en la Figura 22. Esta agrupación concuerda con otro estudio en el que se sugiere que las diversas clases de quitinasas (I, II y IV) han derivado de un ancestro común dando lugar a esta variedad de quitinasas que hoy se encuentran presentes (Hamel et al., 1997).

La filogenia logró ubicar a las quitinasas AtChi1 y AtChi2 identificando secuencias con un alto grado de identidad (99%) en el transcriptoma de *A. tequilana* var. azul, que corresponden a las secuencias nombradas Ateq Chil 05 iso 1 y Ateq Chil 05 iso 2. Dentro de este subclado formado se agruparon secuencias de *A. sisalana*, *A. americana* y *A. deserti*, que presentaron un alto porcentaje de identidad (>98%) con las de *A. tequilana* var. azul. Dicha relación de parentesco filogenético y grado de identidad podría sugerir la posibilidad que dichas secuencias sean ortólogas entre ellas. Con esta idea en mente y a reserva de realizar más experimentos que logren comprobar esto, se pensaría que estas enzimas podrían desempeñar un papel de defensa contra estrés biótico, de la misma forma que las quitinasa AtChi1 y AtChi2 de *A. tequilana* var. azul.

Finalmente, el análisis filogenético por inferencia Bayesiana tuvo buena resolución. Este logró agrupar las distintas clases de quitinasas encontradas en los transcriptomas de *A. tequilana* var. azul y especies de la subfamilia Agavoideae por clados, como se ilustra en la Figura 23. En este esquema, los módulos funcionales (dominio de unión a quitina y catalítico) tienen un tamaño similar al de todas las especies analizadas. También en este esquema se indica la posición que tienen los glutámicos catalíticos, que en el caso de las proteínas tipo quitinasa clase I y clase II uno de estos dos residuos está sustituido por una alanina y el otro por una lisina, respectivamente. Las proteínas tipo quitinasa clase I con sustitución de alanina se ha descrito que tienen capacidad antifúngica, a pesar de carecer de actividad

X. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A pesar de tener limitaciones en los ensayos de inhibición del crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos, se apreció una mayor inhibición al usar la combinación de quitinasas recombinantes de *A. tequila* var. azul (rAtChi1) con la β -1,3 glucanasas II de *H. brasiliensis*. A futuro se podrían diseñar ensayos *in vitro* que permitan probar la sinergia entre estas dos enzimas, que produjeron este ligero incremento en la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium* sp. y *Aspergillus* sp., constituyendo esta una estrategia que permita prevenir y controlar enfermedades causadas por hongos en los cultivos de agave. A este respecto, dada la capacidad de rAtChi1 en mantener su estabilidad ante la presencia de diversos aditivos, resulta ser una opción interesante de componente para agentes fitoprotectores en los que se utilizan enzimas y compuestos fungicidas de diversa clase, como el patentado por Novozymes BioAg.

También se contribuyó a proporcionar información sobre las condiciones que puedan propiciar la cristalización de AtChi1 para poder elucidar la estructura tridimensional de estas importantes enzimas que se considera proteína relacionada con la patogénesis en *A. tequilana* var. azul. Como aproximación se predijo la estructura 3D de ambas quitinasas y se compararon con las dos únicas estructuras de quitinasa de clase I reportadas. De manera general, se aprecia una gran conservación en ambos dominios, las diferencias más notorias residen en el péptido conector, por lo que el mecanismo de unión a la quitina podría variar en las enzimas de *A. tequilana* var azul.

Este estudio identificó por primera vez una familia de quitinasas presentes en tejido sano de *A. tequilana* var. azul compuesta por quitinasas de clase I, II, IV y sorpresivamente proteínas tipo quitinasa de clase I y II. Resulta importante entonces validar la presencia de estos transcritos de quitinasas ya sea a través de su localización en el genoma de la planta (cuando este sea publicado) o mediante ensayos de PCR utilizando la información de las secuencias aquí propuestas para el diseño los cebadores o *primers*. Queda entonces estudiar el papel que tendrían dichas proteínas en *A. tequilana* var. azul. Además, se presenta el primer reporte de los diferentes tipos de quitinasas en miembros de la subfamilia Agavoideae, los cuales podrían constituir una herramienta biotecnológica a futuro dada las diferencias a nivel de secuencia lo

que podría resultar en mejores características bioquímicas (mayor afinidad a su sustrato, mayor actividad enzimática) o estructurales (mayor estabilidad térmica).

XI. REFERENCIAS

- Abascal F, Zardoya R, Telford MJ (2010). TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations *Nucleic Acids Res.* 38: W7-13
- Abraham, P. E., Yin, H., Borland, A. M., Weighill, D., Lim, S. D., De Paoli, H. C., Engle, N., Jones, P. C., Agh, R., Weston, D. J., Wullschleger, S. D., Tschaplinski, T., Jacobson, D., Cushman, J. C., Hettich, R. L., Tuskan, G. A., & Yang, X. (2016). Transcript, protein, and metabolite temporal dynamics in the CAM plant *Agave*. *Nature Plants*, 2, 16178
- Aktar Hossain, M., Noh, H. N., Kim, K. Il, Koh, E. J., Wi, S. G., Bae, H. J., Lee, H., & Hong, S. W. (2010). Mutation of the chitinase-like protein-encoding AtCTL2 gene enhances lignin accumulation in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 167(8), 650–658
- Alducin-Martínez, C., Ruiz Mondragón, K. Y., Jiménez-Barrón, O., Aguirre-Planter, E., Gasca-Pineda, J., Eguiarte, L. E., & Medellin, R. A. (2022). Uses, Knowledge and Extinction Risk Faced by *Agave* Species in Mexico. *Plants (Basel, Switzerland)*, 12(1), 124.
- APG III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161(2), 105–121.
- APG IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1-20.
- Arlorio, M., Ludwig, a, Boiler, T., Bonfante, P., & Vegetale, B. (1992). Inhibition of fungal growth by plant chitinases and beta-1,3-glucanases. *Protoplasts*, 171, 34–43.
- Beintema, Jaap J. (1994), Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins, *FEBS Letters*, 350, 159-163
- Berglund, L., Brunstedt, J., Nielsen, K. K., Chen, Z., Mikkelsen, J. D., & Marcker, K. A. (1995). A proline-rich chitinase from *Beta vulgaris*. *Plant Molecular Biology*, 27(1), 211–216.
- Birnboim, H. C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymology*. 100, 243-55

- Borowiec, M. L. (2016). AMAS: a fast tool for alignment manipulation and computing of summary statistics. *PeerJ* 4: e1660
- Brameld, K. A., & Goddard, W. A. (1998). The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), 4276–4281.
- Carpenter, E. J., Matasci, N., Ayyampalayam, S., Wu, S., Sun, J., Yu, J., Jimenez Vieira, F. R., Bowler, C., Dorrell, R. G., Gitzendanner, M. A., Li, L., Du, W., Ullrich, K., Wickett, N. J., Barkmann, T. J., Barker, M. S., Leebens-Mack, J. H., & Wong, G. K. S. (2019). Access to RNA-sequencing data from 1,173 plant species: The 1000 Plant transcriptomes initiative (1KP). *GigaScience*, 8(10), 1–7.
- Chase, M. W., Reveal, J. L., & Fay, M. F. (2009). A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 132–136.
- Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17, 540–552.
- Chen, X., Zaro, J. L., & Shen, W. C. (2013). Fusion protein linkers: Property, design and functionality. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(10), 1357–1369.
- Chrispeels, M. J., & Raikhel, N. V. (1992). Short peptide domains target proteins to plant vacuoles. *Cell*, 68(4), 613–616.
- Churngchow, N., Suntaro, A., & Wittsuwannakul, R. (1995). β -1,3-glucanase isozymes from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry*, 39(3), 505–509.
- Collinge, D.B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K.K., Ulla, R., Vad K. (1993) MINI-REVIEW. Plant chitinases. *The Plant Journal*, 3(1), 31-40
- Colovos C, Yeates TO. (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* 2(9):1511-9.
- Coria-Contreras JJ, Mora-Aguilera G, Yañez-Morales MJ, Acevedo-Sánchez G, Santana-Peñaloza B, Mendoza-Ramos C, Jiménez-González L, Martínez-Bustamante VI, García-Martínez DC and Rubio-Cortés R. 2019. Applied regional epidemiology to inductive characterization and forecasting of blue agave gray spot (*Cercospora agavicola*) in Jalisco, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology*, 37(1), 71-94.
- Crowe, J.H.; Carpenter, J.F.; Crowe, L.M. (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 60, 73-103
- DGSV-CNRF. (2017). Marchitez del agave. *Fusarium oxysporum*. SAGARPA-SENASICA. Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Tecamac, México. 11 p.

- Drenth, J., & Mesters, J. (2007). *Principles of protein x-ray crystallography* (Third edition). Springer.
- Ericsson, U., Hallberg, B., Detitta, G., Dekker, N., and Nordlund, P. (2006). Thermofluor-based highthroughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal. Biochem*, 357:289-298.
- Fathi-Roudsari, M., Akhavian-Tehrani, A., & Maghsoudi, N. (2016). Comparison of three *Escherichia coli* strains in recombinant production of reteplase. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 8(1), 16–22.
- Ferreira, RB., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, CN., Chen, Z., Batista, LM., Duarte, J., Borges, A. & Teixeira, AR. (2007). The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Mol. Plant Pathol*, 8: 677-700.
- Fuentes-Silva, D. (2009). Estudio bioquímico y caracterización estructural de dos isoformas nativas del alérgeno hev b 2 de *Hevea brasiliensis*. Tesis de doctorado. UNAM
- Fuentes-Silva, D., Mendoza-Hernández, G., Stojanoff, V., Palomares, L. A., Zenteno, E., Torres-Larios, A., & Rodríguez-Romero, A. (2007). Crystallization and identification of the glycosylated moieties of two isoforms of the main allergen Hev b 2 and preliminary X-ray analysis of two polymorphs of isoform II. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 63(9), 787–791.
- García-Mendoza A. (2007) Los agaves de México. *Ciencias-Universidad Nacional Autónoma de México*, 87, 14–23.
- García-Mendoza, A. J., I. S. Franco Martínez y D. Sandoval Gutiérrez. (2019). Cuatro especies nuevas de Agave (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta Botánica Mexicana*, 126: e1461.
- Grøftehauge, M. K., Hajizadeh, N. R., Swann, M. J. & Pohl, E. (2015). Protein-ligand interactions investigated by thermal shift assays (TSA) and dual polarization interferometry (DPI). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 71, 36–44.
- Gross, S. M., Martin, J. A., Simpson, J., Abraham-Juarez, M. J., Wang, Z., & Visel, A. (2013). De novo transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *BMC Genomics*, 14(1), 1–14.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3):307-21
- Hall, T.A. (1999). Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

- Hamel, F., Boivin, R., Tremblay, C., & Bellemare, G. (1997). Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants. *Journal of Molecular Evolution*, 44(6), 614–624.
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14(1), 33–28.
- Inch, S., Rice, J. W., Scott, B. R., Leland, J., & Greenshields, D. (2019). Methods of protecting a plant from fungal pests. (World Intellectual Property Organization Patente N° WO 2019/236687).
<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2019236687>
- Jalil, S.U., Mishra, M., & Ansari, M.I. (2015). Current View on Chitinase for Plant Defence. *Trends in Biosciences*, 8(24), 6733-6743.
- Jiménez-Barron, O., García-Sandoval, R., Magallón, S., García-Mendoza, A., Nieto-Sotelo, J., Aguirre-Planter, E., & Eguiarte, L. E. (2020). Phylogeny, Diversification Rate, and Divergence Time of *Agave sensu lato* (Asparagaceae), a Group of Recent Origin in the Process of Diversification. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1–17.
- Jiménez-Hidalgo I, Virgen-Calleros G, Martínez-de la Vega O, Vandemark G and Olalde-Portugal V. 2004. Identification and characterization of bacteria causing soft-rot in *Agave tequilana*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 317–331.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589.
- Karthik, N., Binod, P., & Pandey, A. (2017). Chitinases. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products* (pp. 335–368)
- Kasprzewska, A. (2003) Plant chitinases-regulation and function. *Cell Mol. Biol. Lett.*, 8, 809–824.
- Kcatch, K., Rozewicki, J, Yamada K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20 (4), 1160-1166.
- Kesari, P., Patil, D. N., Kumar, P., Tomar, S., Sharma, A. K., & Kumar, P. (2015). Structural and functional evolution of chitinase-like proteins from plants. *Proteomics*, 15(10), 1693–1705.

- Kezuka, Y., Kojima, M., Mizuno, R., Suzuki, K., Watanabe, T., & Nonaka, T. (2010). Structure of full-length class I chitinase from rice revealed by X-ray crystallography and small-angle X-ray scattering. *Proteins*, 78(10), 2295–2305.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Leebens-Mack, J. H., Barker, M. S., Carpenter, E. J., Deyholos, M. K., Gitzendanner, M. A., Graham, S. W., Grosse, I., Li, Z., Melkonian, M., Mirarab, S., Porsch, M., Quint, M., Rensing, S. A., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Stevenson, D. W., Ullrich, K. K., Wickett, N. J., DeGironimo, L., Wong, G. K. S. (2019). One thousand plant transcriptomes and the phylogenomics of green plants. *Nature*, 574(7780), 679–685.
- Lefort V, Longueville JE, Gascuel O. (2017). SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution*, 34 (9), 2422–2424.
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic acids research*, 49(W1), W293–W296
- Llinas-García, P. (1999). Alergenos de *Hevea brasiliensis* Purificación y cristalización de la heveína para estudios estructurales a alta resolución. Tesis de licenciatura. UNAM
- Lobstein, J., Emrich, C. A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., & Berkmen, M. (2012). SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial cell factories*, 11, 56.
- López-Bautista V, Mora-Aguilera G, Gutiérrez-Espino sa MA, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, Coria-Contreras JJ, Acevedo-Sánchez G and Santana-Peñaloza B. (2020). Morphological and molecular characterization of Fusarium spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in Agave tequilana. *Mexican Journal of Phytopathology*, 38(1), 79-106.
- Martínez-Caballero, S., Cano-Sánchez, P., Mares-Mejía, I., Díaz-Sánchez, A. G., Macías-Rubalcava, M. L., Hermoso, J. A., & Rodríguez-Romero, A. (2014). Comparative study of two GH19 chitinase-like proteins from Hevea brasiliensis, one exhibiting a novel carbohydrate-binding domain. *FEBS Journal*, 281(19), 4535–4554.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. and Boller, T. (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol.* 88: 936-942.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428

- Neuhaus, J. M., Sticher, L., Meins, F., & Boller, T. (1991). A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(22), 10362–10366.
- Okonechnikov; Golosova; Fursov. (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28: 1166-1167
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612.
- Prasannath, K. (2017). Plant defense-related enzymes against pathogens: a review. *AGRIEAST: Journal of Agricultural Sciences*, 11(1), 38.
- Pontius, J., Richelle, J., & Wodak, S. J. (1996). Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. *Journal of Molecular Biology*, 264(1), 121–136.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., and Suchard, M. A. (2018). Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* 67, 901–904.
- Rodríguez-Romero, A., Ravichandran, K. G., & Soriano-García, M. (1991). Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution. *FEBS letters*, 291(2), 307–309.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van derMark, P., Ayres, D., Darling, A., Höhna, S., et al. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542.
- Sarma, K., Dehury, B., Sahu, J., Sarmah, R., Sahoo, S., Sahu, M., Sen, P., Modi, M. K., & Barooah, M. (2012). A comparative proteomic approach to analyse structure, function, and evolution of rice chitinases: A step towards increasing plant fungal resistance. *Journal of Molecular Modeling*, 18(11), 4761–4780.
- Sarwar, M. B., Ahmad, Z., Rashid, B., Hassan, S., Gregersen, P. L., Leyva, M. O., Nagy, I., Asp, T., & Husnain, T. (2019). De novo assembly of *Agave sisalana* transcriptome in response to drought stress provides insight into the tolerance mechanisms. *Scientific reports*, 9(1), 396
- Sela-Buurlage, M. B., Ponstein, A. S., Bres-Vloemans, S. A., Melchers, L. S., Van Den Elzen, P., and Cornelissen, B. (1993). Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and b-1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.* 101:857-863
- SENASICA-Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020). Plagas reglamentadas del agave. Recuperado el 26 de mayo de 2022 de <https://www.gob.mx/senasica/documentos/plagas-reglamentadas-del-agave-110851>

- Sexton, A. C., & Howlett, B. J. (2006). Parallels in fungal pathogenesis on plant and animal hosts. *Eukaryotic cell*, 5(12), 1941–1949.
- Shaun M., B., & Stephen J., F. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 28(8), 799-808
- Shinshi, H., Neuhaus, J. M., Ryals, J., & Meins, F. (1990). Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. *Plant Molecular Biology*, 14(3), 357–368.
- Sierra, G. Y., Rodríguez, H. A., Cano, S. P., Gómez, V. H., Hernández, S. A., Siliqi, D., & Rodríguez, R. A. (2019). A biophysical and structural study of two chitinases from *Agave tequilana* and their potential role as defense proteins. *FEBS Journal*, 286(23), 4778-4796
- Sowka, S., Hsieh, L. S., Krebitz, M., Akasawa, A., Martin, B. M., Starrett, D., Peterbauer, C. K., Scheiner, O., & Breiteneder, H. (1998). Identification and cloning of prs a 1, a 32-kDa endochitinase and major allergen of avocado, and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(43), 28091–28097
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A.M., Gumienny, G., Haas, J., Schwede, T. (2020). QMEANDisCo - distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, 36, 1765-1771
- Theis, T., & Stahl, U. (2004). Antifungal proteins: Targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(4), 437–455.
- Ubhayasekera, W. (2011). Structure and function of chitinases from glycoside hydrolase family 19. *Polymer International*, 60(6), 890–896.
- Vaaje-Kolstad, G., Eijsink Vincent G. H., Horn Svein, J. (2007). Method of enhancing degradation of chitin. (U. S. Patent and Trademark Office Patente, N° US 2007/0218046)
<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=US41838424>
- Villegas-Camas, J., Verdel-Aranda, K., Lara-Reyna, J., & Martínez-Hernández, A. (2022). In silico characterization and gene expression analysis of late-embryogenesis abundant proteins of *Agave tequilana* Weber var. azul. *Botanical Sciences*, 100(1), 169–191.
- Wenzhong Liu, Yubin Xie, Jiyong Ma, Xiaotong Luo, Peng Nie, Zhixiang Zuo, Urs Lahrmann, Qi Zhao, Yueyuan Zheng, Yong Zhao, Yu Xue and Jian Ren*. (2015). IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics*, 31(20):3359-3361.
- Williams, C. J., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Prisant, M. G., Videau, L. L., Deis, L. N., Verma, V., Keedy, D. A., Hintze, B. J., Chen, V. B., Jain, S., Lewis, S. M., Arendall,

- W. B., 3rd, Snoeyink, J., Adams, P. D., Lovell, S. C., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2018). MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 27(1), 293–315.
- Younas, A., Saleem, M., Tariq, H., Arooj, B., Akhthar, M. S., & Tahira, R. (2016). Purification and biochemical characterization of a pathogenesis related endochitinase *Arachis hypogaea*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 18(4), 780–788.
- Zhang, D., Hrmova, M., Wan, C. H., Wu, C., Balzen, J., Cai, W., Wang, J., Densmore, L. D., Fincher, G. B., Zhang, H., & Haigler, C. H. (2004). Members of a new group of chitinase-like genes are expressed preferentially in cotton cells with secondary walls. *Plant Molecular Biology*, 54(3), 353–372.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W., (2000), A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.*, 7(1-2):203-14.
- Zhong, R., Kays, S.J., Schroeder, B.P. and Ye, Z.-H. (2002). Shapes, and Overproduction of Ethylene Linked of Ethylene Mutation of a Chitinase-Like Gene Causes Ectopic Deposition of Lignin, Aberrant Cell Shapes, and Overproduction. *Plant Cell*, 14(1), 165–179.
- Zinkgraf, M., Gerttula, S., & Groover, A. (2017). Transcript profiling of a novel plant meristem, the monocot cambium. *Journal of Integrative Plant Biology*, 59(6), 436–449.

XII. ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla A1. Componentes del ensayo de doble digestión con enzimas de restricción

Componente	Volumen (μL)
Amortiguador CutSmart® 10X	1
Plásmido	3
Enzimas de restricción KpnI	1
HindIII-HF	1
H ₂ O destilada	5

Tabla A2. Composición del medio LB con antibióticos utilizados para las cepas de *E. coli* Rosetta-gami y SHuffle.

Componente	Concentración
Agar	15 g/L
LB	20 g/L
Ampicilina ^{1,2}	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en dH ₂ O
Tetraciclina ²	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en etanol 70%
Cloranfenicol ²	34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en etanol 70%
Kanamicina ²	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en dH ₂ O

1: antibiótico utilizados por la cepa SHuffle. 2: antibióticos utilizados por la cepa Rosetta-gami.

Tabla A3. Composición gel de poliacrilamida (12%)

Componente	Cantidad (μL)
Gel separador	
Amortiguador Tris 1.5 M pH 8.8	1230
Acrilamida/Bis acrilamida 40%	1500
SDS 10%	50
Persulfato de amonio 10%	10
TEMED	1
Agua cbp 5 mL	2200
Gel concentrador	
Tris 0.5 M pH 6.8	1260
Acrilamida/bis acrilamida 40%	500
SDS 10%	20
Persulfato de amonio 10%	10
TEMED	1
Agua cbp 5 mL	1260

Tabla A4. Mezclas de reacción de ensayos de actividad de β -1,3 glucanasa

Composición de la mezcla de reacción	
Bb=Blanco del amortiguador	300 μ L amortiguador de acetatos pH 5.0 + 200 μ L de agua desionizada
Brx= Blanco de reacción	300 μ L amortiguador de acetatos pH 5.0 + 200 μ L disolución enzimática
Bs=Blanco del sustrato	300 μ L sustrato (2 mg/mL) disuelto en amortiguador de acetatos pH 5 + 200 μ L de agua desionizada

Tabla A5. Mezclas de reacción de ensayos de actividad de quitinasa

Composición de la mezcla de reacción	
Bb=Blanco del amortiguador	300 μ L amortiguador de citrato pH 5.0 + 200 μ L de agua desionizada
Bs=Blanco del sustrato	300 μ L sustrato* (20 mg/mL) disuelto en amortiguador de citrato pH 5.0 + 200 μ L de agua desionizada

*El sustrato se preparó utilizando 10 g de quitina de camarón (Sigma- Aldrich, St Louis, USA) y se adicionaron 125 mL de HCl concentrado (37%) bajo agitación a 4°C durante toda la noche (~18 h). La suspensión se filtró al vacío usando papel filtro Whatman 2 y se lavó y se lavó con agua hasta alcanzar un pH de 6.0-7.0, se dejó secar y se almacenó para su uso posterior. Se obtuvieron de éste 45.3 g de quitina coloidal.

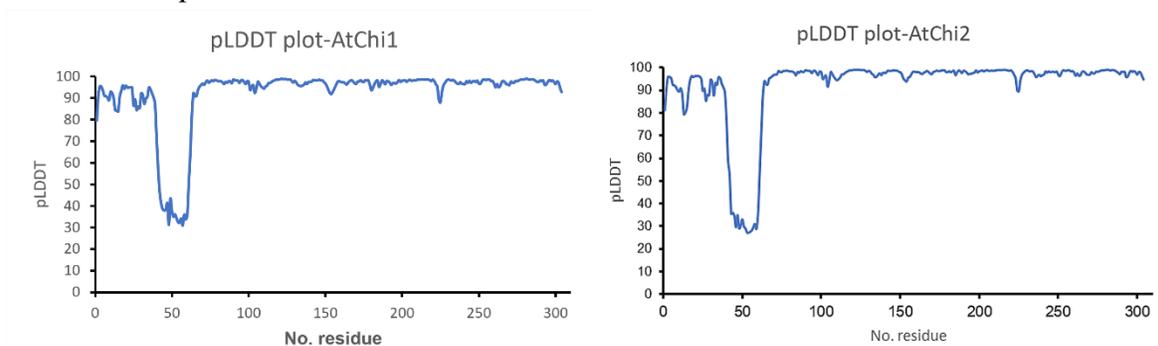
Tabla A6. Condiciones empleadas para ensayos de termofluorescencia. Aditivos HR2-428 (Hamptom Research).

No.	Compuesto	Conc. Final	Tm (° C)	No.	Compuesto	Conc. Final	Tm (° C)
1	Cloruro de Bario dihidratado	0.05 M	70.6	47	Hidrocloruro de TCEP	0.05 M	-
2	Cloruro de Cadmio hidratado	0.05 M	52.9	48	GSH/GSSG	0.005 M	60.5
3	Cloruro de Calcio dihidratado	0.05 M	70.6	49	EDTA	0.05 M	71.8
4	Cloruro de Cobalto (II) hexadhidratado	0.05 M	66.6	50	Polivinilpirrolidona K15	2.50%	-
5	Cloruro de Cobre (II) dihidratado	0.05 M	-	51	Sal de Sodio de sulfato de dextrano	15%	70.6
6	Cloruro de Magnesio hexahidratado	0.05 M	71.6	52	Etoxilato de pentaeritritol	20%	-
7	Cloruro de Maganeso (II) tetrahidratado	0.05 M	69.2	53	Polietilenglicol 3,350	5%	-
8	Cloruro de Estroncio hexahidratado	0.05 M	68.2	54	D-(+)-Glucosa monohidratada	15%	74.9
9	Cloruro de Itrio (II) hexahidratado	0.05 M	45.9	55	Sacarosa	15%	74.6
10	Cloruro de Zinc	0.05 M	52.2	56	Xilitol	15%	75.2
11	Cloruro de Hierro (III) hexahidratado	0.05 M	-	57	D-Sorbitol	15%	75.2
12	Cloruro de Níquel (II) hexahidratado	0.05 M	66.3	58	Mio-inositol	6%	73.7
13	Cloruro de Cromo (III) hexahidratado	0.05 M	45.5	59	D-(+)-Trehalosa	15%	74.5
14	Acetato de Praseodimio hidratado	0.05 M	60.2	60	D-(+)-Galactosa	15%	75.4
15	Sulfato de amonio	0.5 M	72.8	61	Etilenglicol	15%	69.3
16	Cloruro de Potasio	0.5 M	71.4	62	Glicerol	15%	73.9
17	Cloruro de Litio	0.5 M	71.1	63	NDSB-195	1.5 M	-
18	Cloruro de Sodio	0.5 M	70.3	64	NDSB-201	1.0 M	-
19	Fluoruro de Sodio	0.5 M	71.2	65	NDSB-211	1.0 M	-
20	Ioduro de Sodio	0.5 M	54.5	66	NDSB-221	1.0 M	-
21	Tiocinato de Sodio	0.5 M	59.8	67	NDSB-256	0.5 M	-
22	Tartrato de Sodio Potasio tetrahidratado	0.5 M	70.9	68	1,2,3-heptanotriol	0.25%	73.1
23	Citrato tribásico de Sodio	0.5 M	64.9	69	Clorhidrato de benzamidina	10%	-
24	Cloruro de Cesio	0.5 M	71.2	70	LDAO, DDAO	2.50%	-
25	Malonato de Sodio pH 7.0	0.5 M	66.2	71	n-octil- β -D-glucosido	2.50%	-
26	L-Prolina	0.05 M	72.9	72	n-dodecil- β -maltosido	2.50%	-
27	Fenol	0.05 M	-	73	Trimetilamina N-oxido dihidratado	15%	67.0
28	Dimetil sulfóxido	15%	-	74	1,6-Hexanodiol	15%	-
29	Bromuro de Sodio	0.05 M	72.2	75	2-metil-2,4-pentanodiol	15%	-
30	Ácido 6-aminohexanoico	15%	66.2	76	Polietilenglicol 400	25%	-
31	Dihidrocloruro diaminopentano	15%	70.0	77	Jeffamine ® m-600 pH 7.0	25%	-
32	Diaminohexano	15%	-	78	2,5-hexanodiol	20%	-
33	Diaminooctano	15%	-	79	1,3-butanodiol	20%	-
34	Glicina	0.5 M	74.1	80	Polipropilenglicol P 400	20%	-

35	Glicil-glicil-glicina	0.15 M	73.4	81	1,4-dioxano	15%	-
36	Taurina	0.05 M	73.3	82	Etanol	15%	-
37	Hidrocloreuro de betaína	0.05 M	-	83	2-propanol	15%	-
38	Espermidina	0.05 M	40.9	84	Metanol	15%	-
39	Tetrahydrocloruro de espermidina	0.05 M	71.0	85	1,2-Butanodiol	5%	-
40	Cloruro de hexaaminocobalto (III)	0.05 M	68.8	86	ter-butanol	20%	-
41	Sarcosina	0.05 M	73.1	87	1,3-propanodiol	20%	-
42	Clorhidrato de trimetilamina	0.05 M	-	88	Acetonitrilo	20%	-
43	Clorhidrato de guanidinio	0.5 M	66.9	89	Formamida	20%	-
44	Urea	0.05 M	72.9	90	1-propanol	20%	-
45	β -NAD	0.05 M	43.0	91	Acetato de etilo	2.50%	61.3
46	ATP	0.05 M	52.6	92	Control AtChi1 en amortiguador MES		73.3

-: Bajo esta condición no se obtuvieron curvas típicas de desnaturalización térmica por lo que no fue posible determinar el valor de Tm.

- AlphaFold



- RosettaFold

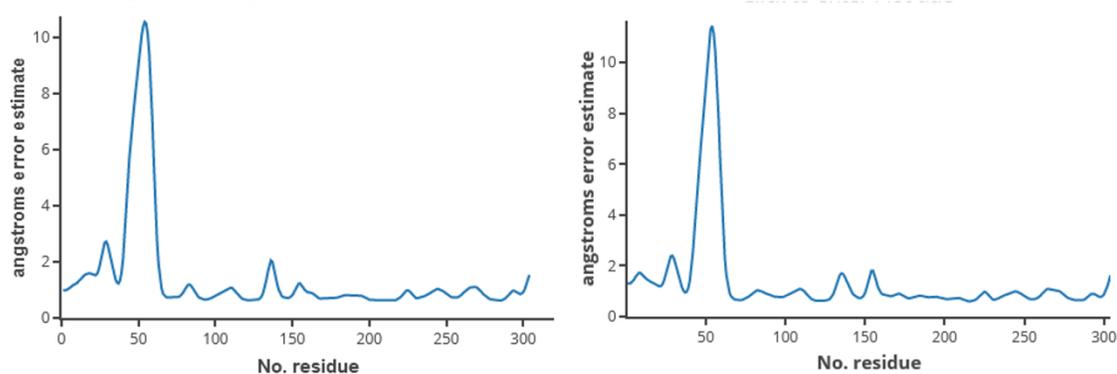


Figura A1. Métricas de confiabilidad de los modelos de AtChi1 (izquierda) y AtChi2 (derecha) por número de aminoácido obtenidas de AlphaFold2 y RosettaFold.

Tabla A7. Evaluación de calidad estructural de los modelos de AtChi1 y AtChi2 de *A. tequilana* var. azul obtenidos a través de dos métodos computacionales.

Algoritmos	Modelo	Evaluadores				
		QMEANDisCo Global Score	MolProbity Score	Ramachandra (%)	PROVE (%) Átomos atípicos del modelo	ERRAT (%) Factor de calidad global
AlphaFold	AtChi1	0.80 ± 0.05	1.06	96.0	3.0	97.8
	AtChi2	0.80 ± 0.05	1.06	96.0	2.2	95.3
RoseTTAFold	AtChi1	0.78 ± 0.05	2.89	96.7	3.3	93.2
	AtChi2	0.78 ± 0.05	2.67	98.3	3.6	95.3

Tabla A8. Características de las secuencias curadas de quitinasas y proteínas tipo quitinasas a partir del transcriptoma *Agave tequilana* var. *azul*.

Número	ID GenBank	Nombre original	Nombre propuesto	RNA	ORF	ORF	Proteína madura	
				transcrito		traducido	pb	aa
				pb	pb	aa	pb	aa
1	GAHU01000757.1 GAHU01000758.1 GAHU01000759.1	Locus319v1rpkm419.04; Locus319v2rpkm351.19; Locus319v3rpkm313.20	Ateq_CLII_01		906	302	810	270
2	GAHU01000786.1	Locus330v1rpkm411.93	Ateq_Chil_1	1336	1020	340	927	309
3	GAHU01000805.1	Locus337v1rpkm406.33	Ateq_CLII_02	1090	918	306	813	271
4	GAHU01002903.1	Locus1252v1rpkm176.49	Ateq_CLII_03	1366	915	305	813	271
5	GAHU01002905.1	Locus1252v3rpkm17.59_PRE	Ateq_CLII_04	1295	612	204	585	195
6	GAHU01001771.1	Locus713v1rpkm253.41	Ateq_Chil_2	1218	972	324	909	303
7	GAHU01002434.1	Locus1012v1rpkm204.93	Ateq_CLI_01	757	729	243	666	222
8	GAHU01005831.1	Locus2527v1rpkm104.68	Ateq_Chil_03	1195	1053	351	934	311
9	GAHU01007466.1 GAHU01007467.1	Locus3186v1rpkm85.91; Locus3186v2rpkm10.36	Ateq_CLII_05		474	158	474	158
10	GAHU01007553.1	Locus3227v1rpkm85.15	Ateq_Chil_04	1291	978	326	859	286
11	GAHU01009985.1	Locus4422v1rpkm64.99	Ateq_ChilV_01	1365	816	272	735	245
12	GAHU01023853.1	Locus11035v1rpkm27.21	Ateq_ChilV_02	1111	810	270	735	245
13	GAHU01042196.1 GAHU01042197.1	Locus19916v2rpkm4.46; Locus19916v3rpkm4.12	Ateq_Chil_05_iso2	974	687	229	687	229
14	GAHU01059469.1	Locus28763v1rpkm6.58	Ateq_Chill_02	960	852	284	741	247
15	GAHU01077632.1	Locus38802v1rpkm3.01	Ateq_Chill_03	1022	825	275	741	247
16	GAHU01114371.1	Locus64577v1rpkm1.05	Ateq_Chil_06	912	897	299	840	280
17	GAHU01042195.1 GAHU01042198.1	Locus19916v1rpkm12.95; Locus19916v4rpkm2.25	Ateq_Chil_05_iso1	1203	1131	377	1071	357

Nombre propuesto; tiene como clave lo siguiente: At: *Agave tequilana*, Chi: Chitinase: No. romano: Clase, No. arábigo: numeración.

Tabla A9. Características de las secuencias curadas de quitinasas y proteínas tipo quitinasas a partir del transcriptoma *Agave deserti*

Número	ID GenBank	Nombre original	Nombre propuesto	RNA	ORF	ORF	Proteína madura	
				transcrito		traducido	pb	aa
				pb	pb	aa	pb	aa
1	GAHT01002386.1	Locus1371v3rpkm31.80	Ades_Chil_03	1185	1071	357	924	308
2	GAHT01003582.1	Locus2202v1rpkm131.42	Ades_ChilV_01	1255	861	287	735	245

3	GAHT01004089.1	Locus2550v1rpkm116.03	Ades_Chil_05	1150	978	326	912	304
4	GAHT01004207.1 GAHT01004208.1	Locus2626v1rpkm112.95; Locus2626v2rpkm46.78	Ades_Chil_01		858	286	858	286
5	GAHT01004462.1	Locus2806v1rpkm106.04	Ades_Chil_02	1170	903	301	885	295
6	GAHT01004505.1	Locus2840v2rpkm41.67	Ades_Chil_04_iso1	1147	978	326	858	286
7	GAHT01006048.1 GAHT01006049.1	Locus3856v1rpkm77.88 Locus3856v2rpkm61.18	Ades_CLII_02		777	259	777	259
8	GAHT01010928.1	Locus6884v1rpkm43.91	Ades_CLII_05	869	627	209	603	201
9	GAHT01011412.1	Locus7191v1rpkm41.95	Ades_CLII_01	1166	882	294	810	270
10	GAHT01013872.1	Locus8569v1rpkm34.66	Ades_Chil_08	1343	999	333	852	284
11	GAHT01016026.1	Locus9935v1rpkm29.15	Ades_Chil_02	854	853	284	703	234
12	GAHT01023582.1	Locus14516v1rpkm18.02	Ades_CLII_04	899	549	183	522	174
13	GAHT01025647.1 GAHT01056890.1	Locus15719v1rpkm16.13 Locus34694v1rpkm3.12	Ades_Chil_03		741	247	741	247

Nombre propuesto; tiene como clave lo siguiente: At: *Agave deserti*, Chi: Chitinase: No. romano: Clase, No. arábigo: numeración.

Tabla A10. Características de las secuencias curadas de quitinasas y proteínas tipo quitinasas a partir del transcriptoma *Agave americana*

Número	ID GenBank	Nombre original	Nombre propuesto	RNA transcrito	ORF	ORF traducido	Proteína madura	
				pb	pb	aa	pb	aa
1	GBHM01004435.1	Aam010163	Aame_Chil_05	1123	906	302	843	281
2	GBHM01016109.1	Aam044200	Aame_Chil_06	1663	1050	349	927	309
3	GBHM01016110.1	Aam044201	Aame_Chil_12	1594	981	326	858	286
4	GBHM01020074.1	Aam052151	Aame_Chil_03	1115	920	306	792	264
5	GBHM01008052.1	Aam018094	Aame_Chil_03	1033	822	274	741	247
6	GBHM01027382.1	Aam076356	Aame_ChilV_01	1188	906	301	735	245
7	GBHM01015352.1	Aam042650	Aame_CLII_02	1566	969	322	813	271
8	GBHM01010641.1	Aam025845	Aame_CLII_05	1406	969	322	807	269
9	GBHM01005542.1	Aam012383	Aame_ChilV_02	1077	813	270	735	245

Nombre propuesto; tiene como clave lo siguiente: At: *Agave americana*, Chi: Chitinase: No. romano: Clase, No. arábigo: numeración.

Tabla A11. Características de las secuencias curadas de quitinasas y proteínas tipo quitinasas a partir del transcriptoma *Agave sisalana*

Número	ID GenBank	Nombre original	Nombre propuesto	RNA transcrito	ORF	ORF traducido	Proteína madura	
				pb	pb	aa	pb	aa
1	GGRE01020161.1	Unigene_DN21537_c0_g2_i1	Asis_Chil_04	1154	978	326	858	286
2	GGRE01023936.1	Unigene_DN23134_c1_g2_i1	Asis_CLII_02	835	740	246	668	222
3	GGRE01024980.1	Unigene_DN23534_c3_g1_i1	Asis_CLII_05	1388	609	203	585	195
4	GGRE01049666.1; Unigene_DN43006_c0_g1_i1; GGRE01058298.1; Unigene_DN5059_c0_g1_i1; GGRE01061857.1 Unigene_DN6525_c0_g1_i1		Asis_Chil_05		903	301	903	301
5	GGRE01063497.1; Unigene_DN778_c0_g1_i1; GGRE01063498.1 Unigene_DN778_c1_g1_i1		Asis_Chil_3		617	205	617	205

Nombre propuesto; tiene como clave lo siguiente: Asis: *Agave sisalana*, Chi: Chitinase, CL: Chitinase-Like No. romano: Clase, No. arábigo: numeración.

Tabla A12. Características de las secuencias curadas de quitinasas y proteínas tipo quitinasas a partir del transcriptoma *Yucca gloriosa*.

Número	ID GenBank	Nombre original	Nombre propuesto	RNA transcrito	ORF	ORF traducido	Proteína madura	
				pb	pb	aa	pb	aa
1	GFHP01009498.1	T009498	Yglo_Chil_02	1460	1002	334	861	287
2	GFHP01018429.1	T018429	Yglo_CLII_01	1185	1056	352	717	239
3	GFHP01018430.1	T018430	Yglo_CLII_05	1135	909	303	717	239
4	GFHP01018433.1	T018433	Yglo_CLII_03	1359	831	277	717	239
5	GFHP01031646.1	T031646	Yglo_ChilV_01	355	354	118	354	118

Nombre propuesto; tiene como clave lo siguiente: Yglo: *Yucca gloriosa*, Chi: Chitinase, CL: Chitinase-Like, No. romano: Clase, No. arábigo: numeración.

Tabla A13. Características de las secuencias curadas de quitinasas y proteínas tipo quitinasas a partir del transcriptoma *Yucca filamentosa*

Número	ID CNGB	Nombre propuesto	RNA transcrito	ORF	ORF traducido	Proteína madura	
			pb	pb	aa	pb	aa
1	gnl onekp ICNN_scaffold_2015389	Yfil_CLII_03	1146	628	208	597	199
2	gnl onekp ICNN_scaffold_2031036	Yfil_Chil_11	1131	1053	351	912	304

3	gnl onekp ICNN_scaffold_2031037	Yfil_Chil_09	978	975	325	891	297
4	gnl onekp ICNN_scaffold_2035725	Yfil_ChilII_02	748	747	249	747	249
5	gnl onekp ICNN_scaffold_2149809	Yfil_ChilIV_01	1287	864	288	735	245

Nombre propuesto; tiene como clave lo siguiente: Yfil: *Yucca filamentosa*, Chi: Chitinase, CL: Chitinase-like. No. romano: Clase, No. arábigo: numeración.

Ejemplo de curado de secuencias

Ensamblado de 3 transcritos de *A. tequilana* var. azul para la obtención de la secuencia consenso de la proteína tipo quitinasa de clase II (AteqCLII_01).

A continuación se presentan los nombres, el tamaño total del transcrito (pb) y el tamaño de la región codificante (pb) de las secuencias a ensamblar.

GAHU01000757.1 TSA: Agave tequilana Locus319v1rpkm419.04

- Tamaño del transcrito de RNA: **745 pb**
- Tamaño de la región codificante (CDS): **735 pb**

GAHU01000758.1 TSA: Agave tequilana Locus319v2rpkm351.19

- Tamaño transcrito de RNA: **999 pb**
- Tamaño de la región codificante (CDS): **609 pb**

GAHU01000759.1 TSA: Agave tequilana Locus319v3rpkm313.20

- Tamaño del transcrito de RNA: **3281 pb**
- Tamaño de la región codificante (CDS): **579 pb**

El alineamiento múltiple de las secuencias codificantes muestra: 1) regiones en el que las tres secuencias son idénticas (letras blancas con fondo negro), 2) regiones en las que solo dos secuencias son idénticas (letras negras) y 3) regiones en las que no existe coincidencia con el resto de las secuencias. Además, en recuadro azul se muestra una región con menor coincidencias (Fig. A1).

```

Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 ATGGGGAA GAATTTT TGGTCA GTGG CAGTGATT CTCGCCTT GGCTCGGG CAGCTGCTG TTAATGTGAGCG
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 CAGGCAAG AAGGCCAA GACCTG CGCA CAAGGGAT GGGAGTGC AAGGACAG CGTGTACTG CTGCAACGAGAC
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 CATCACCG ATCTCTTC CAAGTCTAC CAATTTCGA GAACCTCT TCGCCAAG CGCAACTCC CCCGTTGC GCAT
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 GCTGTTGG GTTCTGGG ACTACCAGT CTTTCATC ACCGCCGC CGCGCTGT TCGAGCCCC TCGGGTTC GGGA
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 CCACCGGC GGC AAGAC GATGCAGAT GAAGGAGG TCGCGCGT TCC TCGGC CACGT CCG CAGCAAGACCTC
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 TTTGGCT ATGGTGT TGGGACTGGC GGTCCACT TGCATGGG GACTGTGCT ATAACCAT GAGATGAG TCCT
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 TTTGGCT ATGGTGT TGGGACTGGC GGTCCACT TGCATGGG GACTGTGCT ATAACCAT GAGATGAG TCCT
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 AGCCAATC CTATTGCA ACGATGACT ATCTTTAC CCCTGCAC TCCCGGAGT TGAGTACT ATGGTGTG GGTG
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 AGCCAATC CTATTGCA ACGATGACT ATCTTTAC CCCTGCAC TCCCGGAGT TGAGTACT ATGGTGTG GGTG
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 CCCTGCC TGTACTGGA ACTCCA ACTATGGAC TTATTGGT GA TGGGAT CAAGATTGA TCTGTTGA GCCA
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 CCCTGCC TGTACTGGA ACTCCA ACTATGGAC TTATTGGT GA TGGGAT CAAGATTGA TCTGTTGA GCCA
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 CCCTGCC TGTACTGGA ACTCCA ACTATGGAC TTATTGGT GA TGGGAT CAAGATTGA TCTGTTGA GCCA
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 CCCTGAAT ACCTAGAG CAGAATGC ACCCTCGC TTTCCAAGCTGCCATGT GGAGGTGGATGAACCCCATG
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 CCCTGAAT ACCTAGAG CAGAATGC ACCCTCGC TTTCCAAGCTGCCATGT GGAGGTGGATGAACCCCATG
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 AAGAAGAA GCAGCCAT CAGCCCACGATGCGTTT GTTGGTAACTGGAAGCCAAC AAGAACGA ACCTTGT
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 AAGAAGAA GCAGCCAT CAGCCCACGATGCGTTT GTTGGTAACTGGAAGCCAAC AAGAACGA ACCTTGT
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 CCAAGAGG CTACCAGG ATTTGGGG TACC ATGAAC ATTCTC TACGGGGAT CTAGTCTGCGGGCAGGGCCTT
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 CCAAGAGG CTACCAGG ATTTGGGG TACC ATGAAC ATTCTC TACGGGGAT CTAGTCTGCGGGCAGGGCCTT
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 CGTTGATG ACATGAAC AACATGATC TCCCACTACCAATATT ACCTTGACC TAATGGGT GTTGGCAGGGAA
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 CGTTGATG ACATGAAC AACATGATC TCCCACTACCAATATT ACCTTGACC TAATGGGT GTTGGCAGGGAA
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 TTATCGGG AGACA ACT TGGATTGTG CCGAGCAG GTAGCCTT CAACCCGTC TTCAAAT CTGATTCT TAG
-----
Locus319v3rpkm313_20 -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 TTATCGGG AGACA ACT TGGATTGTG CCGAGCAG GTAGCCTT CAACCCGTC TTCAAAT CTGATTCT TAG
-----

```

Figura A2. Alineamiento de los tres transcritos utilizados para generar la secuencia consenso de la proteínas tipo quitinasa de clase II de *Agave tequilana* var. azul (AteqCLII_01).

Dentro de la secuencia total del transcrito Locus319v3rpkm313.20, se encontraba en otro marco de lectura abierto, una región que coincidía con el resto de transcritos (Locus319v1rpkm419.04 y Locus319v2rpkm351.19) en la zona marcada en recuadro azul. La región de 27 nucleótidos dentro de la zona marcada en recuadro azul fue remplazada por la secuencia encontrada de 57 nucleótidos, como se muestra en el alineamiento de la Figura A2.

```

Locus319v3rpkm313_ORF -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 ATGGGGAAGAATTTT TGGTCAGTGGCAGTGAT TCTCGCCT TGGCTGGCGCAGCTGCT GTTAATGT GAGCG

Locus319v3rpkm313_ORF -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 CAGGCAA GAAGGCCAAGACCT GCGACAAGGGA TGGGAGTG CAAGGACA GCGTGTACT GCTGCAAC GAGAC

Locus319v3rpkm313_ORF -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 CATCACC GATCTCTT CCAAGTCTA CCAATTG GAGAACCCTC TTCGCCAA GCGCAACTC CCCCGTTG CGCAT

Locus319v3rpkm313_ORF -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 GCTGTTGGTTCTGGGACTACCAG TCTTTCAT CACCGCCG CCGCGCTG TTCGAGCCC CTCGGGTT CGGGA

Locus319v3rpkm313_ORF -----
Locus319v2rpkm351_19 -----
Locus319v1rpkm419_04 CCACCCG CCGCAAGACG ATGCAGA TGAAGGAG GTCGCCGG TTCTCGG CCACGTGG GCAGCAAGACCTC

Locus319v3rpkm313_ORF TTGTGGC TATGGTGT TCGGACTGGCGGTCCAC TTGCATGGGACTGTGCTATAACCA TGAGATGAGTCCT
Locus319v2rpkm351_19 TTGTGGC TATGGTGT TCGGACTGGCGGTCCAC TTGCATGGGACTGTGCTATAACCA TGAGATGAGTCCT
Locus319v1rpkm419_04 TTGTGGC TATGGTGT TCGGACTGGCGGTCCAC TTGCATGGGACTGTGCTATAACCA TGAGATGAGTCCT

Locus319v3rpkm313_ORF AGCCAAT CCTATTGCAACGATGAC TATCTTTA CCCCTGCACTCCCGGAG TTGAGTAC TATGGTCG TGGTG
Locus319v2rpkm351_19 AGCCAAT CCTATTGCAACGATGAC TATCTTTA CCCCTGCACTCCCGGAG TTGAGTAC TATGGTCG TGGTG
Locus319v1rpkm419_04 AGCCAAT CCTATTGCAACGATGAC TATCTTTA CCCCTGCACTCCCGGAG TTGAGTAC TATGGTCG TGGTG

Locus319v3rpkm313_ORF CCCTGCC TGTATACT GGAAGTCCAACTATGGACTTATTGGTGA TGGATCAAGATTGATCTGTTGAGCCA
Locus319v2rpkm351_19 CCCTGCC TGTATACT GGAAGTCCAACTATGGACTTATTGGTGA TGGATCAAGATTGATCTGTTGAGCCA
Locus319v1rpkm419_04 CCCTGCC TGTATACT GGAAGTCCAACTATGGACTTATTGGTGA TGGATCAAGATTGATCTGTTGAGCCA

Locus319v3rpkm313_ORF CCCTGAA TACCTAGAGCAGAATGC TACCCTCGCTTCCAA GCTGCCATG TGGAGGTG GATGAACCCATG
Locus319v2rpkm351_19 CCCTGAA TACCTAGAGCAGAATGC TACCCTCGCTTCCAA GCTGCCATG TGGAGGTG GATGAACCCATG
Locus319v1rpkm419_04 CCCTGAA TACCTAGAGCAGAATGC TACCCTCGCTTCCAA GCTGCCATG TGGAGGTG GATGAACCCATG

Locus319v3rpkm313_ORF AAGAAGA AGCAGCCA TCAGCCAC GATGCGTT TGTGGTAACTGGAAGCCAAC AAGAACGA CACTTGT
Locus319v2rpkm351_19 AAGAAGA AGCAGCCA TCAGCCAC GATGCGTT TGTGGTAACTGGAAGCCAAC AAGAACGA CACTTGT
Locus319v1rpkm419_04 AAGAAGA AGCAGCCA TCAGCCAC GATGCGTT TGTGGTAACTGGAAGCCAAC AAGAACGA CACTTGT

Locus319v3rpkm313_ORF CCAAGAG GCTACCAG GATTTGGGGCTAC CATGAAC ATTCT CTACGGGA TCTAGTCT GCGGGCAG GGCTT
Locus319v2rpkm351_19 CCAAGAG GCTACCAG GATTTGGGGCTAC CATGAAC ATTCT CTACGGGA TCTAGTCT GCGGGCAG GGCTT
Locus319v1rpkm419_04 CCAAGAG GCTACCAG GATTTGGGGCTAC CATGAAC -----

Locus319v3rpkm313_ORF CGTTGAT GACATGAA CAACATGAT CTCCTACT ACCAATAT TACCTTGAC CTAATGGG TGTGGCA GGGAA
Locus319v2rpkm351_19 CGTTGAT GACATGAA CAACATGAT CTCCTACT ACCAATAT TACCTTGAC CTAATGGG TGTGGCA GGGAA
Locus319v1rpkm419_04 -----

Locus319v3rpkm313_ORF TTATCGG GAGACAAC TTGGATTGT GCCGAGCA GGTAGCCT TCAACCCG TCTCAAAA TCTGATTG TTAG
Locus319v2rpkm351_19 TTATCGG GAGACAAC TTGGATTGT GCCGAGCA GGTAGCCT TCAACCCG TCTCAAAA TCTGATTG TTAG
Locus319v1rpkm419_04 -----

```

Figura A3. Alineamiento de los tres transcritos utilizados para generar la secuencia consenso de la proteínas tipo quitinasa de clase II de *Agave tequilana* var. azul (AteqCLII_01).

Finalmente, se generó la secuencia consenso que dio lugar a la secuencia ensamblada nombrada como AteqCLII_01, cabe mencionar que para los seis sitios variables o polimórficos se seleccionó manualmente la base nucleotídica que en dicho sitio presentaba mayor frecuencia.

Tabla A14. Resumen del alineamiento de nucleótidos de las 53 secuencias de quitinasas y proteínas tipo quitinasa en las especies del género *Agave* y *Yucca*

Datos recuperados con el programa AMAS (Borowiec, 2016)

No. taxones	53
Longitud del alineamiento	966 pb
Longitud de alineamiento después de la limpieza	720 pb
Caracteres indeterminados	3609
Porcentaje de pérdida	9.46
Numero de sitios variables	555
Proporción de sitios variables	0.77
Sitios informativos de parsimonia	534
Proporción de sitios informativos de parsimonia	0.74
Contenido AT	0.44
Contenido GC	0.56

Tabla A15. Criterios de selección del modelo de sustitución

Modelo	Decoración	K	Lik	AIC	BIC
GTR	+G	115	-8599,583	17429,166	17955,780

K: Número de parámetros libres del modelo **Lik:** Logaritmo de la verosimilitud de los datos dado el modelo de sustitución.

Tabla A16. Valores de la reconstrucción filogenética usados para los análisis de inferencia Bayesiana.

Intervalo de confiabilidad del 95% de muestras de los parámetros por Inferencia Bayesiana		
		Total ESS
Codón GTR +G		
TL	3.585- 4.169	788
r(A<->C)	0.153- 0.200	1048
r(A<->G)	0.272-0.330	492
r(A<->T)	0.095-0.136	876
r(C<->G)	0.122-0.163	775
r(C<->T)	0.152-0.194	718
r(G<->T)	0.073-0.110	873

r: tasas de sustitución reversible.

ESS: Tamaño de muestra efectiva (Effective sample size).

Tabla A17. Estimaciones de reconstrucción implementadas en los análisis de inferencia Bayesiana.

Parámetro	Promedio	Varianza	Limite		Mediana	total (ESS)	PSRF
			Inferior	Superior			
TL	3.877	0.0221	3.585	4.169	3.873	788	1.00
r(A<->C)	0.177	1.49E-04	0.153	0.200	0.177	1048	1.00
r(A<->G)	0.300	2.20E-04	0.272	0.330	0.299	492	1.00
r(A<->T)	0.115	1.16E-04	0.095	0.136	0.115	876	1.00
r(C<->G)	0.142	1.12E-04	0.122	0.163	0.142	775	1.00
r(C<->T)	0.173	1.19E-04	0.152	0.194	0.173	718	1.00
r(G<->T)	0.092	8.99E-05	0.073	0.110	0.093	873	1.00
omega	0.16032	1.16E-04	0.140	0.182	0.160	461	1.00
pi(AAA)	9.85E-03	4.66E-06	0.006	0.014	0.010	303	1.00
pi(AAC)	4.09E-02	2.29E-05	0.032	0.051	0.041	161	1.00
pi(AAG)	3.18E-02	2.41E-05	0.023	0.041	0.032	119	1.00
pi(AAT)	1.66E-02	7.38E-06	0.012	0.022	0.017	315	1.00
pi(ACA)	1.03E-02	4.41E-06	0.007	0.015	0.010	302	1.00
pi(ACC)	2.26E-02	9.84E-06	0.016	0.029	0.023	252	1.00
pi(ACG)	8.23E-03	3.50E-06	0.005	0.012	0.008	275	1.00
pi(ACT)	2.02E-02	1.09E-05	0.014	0.027	0.020	278	1.00
pi(AGA)	9.76E-03	6.87E-06	0.005	0.015	0.010	167	1.00
pi(AGC)	1.75E-02	1.12E-05	0.011	0.024	0.017	214	1.00
pi(AGG)	1.31E-02	8.42E-06	0.008	0.018	0.013	174	1.00
pi(AGT)	8.52E-03	6.43E-06	0.004	0.014	0.008	110	1.00
pi(ATA)	8.13E-03	4.30E-06	0.004	0.012	0.008	247	1.00
pi(ATC)	2.68E-02	1.57E-05	0.019	0.034	0.027	185	1.01
pi(ATG)	1.71E-02	1.53E-05	0.010	0.025	0.017	161	1.00
pi(ATT)	1.19E-02	6.47E-06	0.007	0.017	0.012	228	1.00
pi(CAA)	1.05E-02	5.33E-06	0.006	0.015	0.010	246	1.00
pi(CAC)	1.57E-02	1.15E-05	0.009	0.023	0.015	249	1.00
pi(CAG)	3.45E-02	2.57E-05	0.025	0.045	0.034	190	1.00
pi(CAT)	2.09E-02	1.80E-05	0.014	0.030	0.020	137	1.00
pi(CCA)	1.47E-02	7.28E-06	0.009	0.020	0.015	259	1.00
pi(CCC)	1.72E-02	9.44E-06	0.012	0.024	0.017	264	1.00
pi(CCG)	1.71E-02	9.40E-06	0.012	0.023	0.017	269	1.00
pi(CCT)	1.70E-02	1.12E-05	0.010	0.024	0.017	246	1.00
pi(CGA)	7.02E-03	5.38E-06	0.003	0.012	0.007	130	1.00
pi(CGC)	9.01E-03	6.61E-06	0.004	0.014	0.009	192	1.00
pi(CGG)	1.35E-02	7.83E-06	0.008	0.019	0.013	253	1.01
pi(CGT)	6.32E-03	6.04E-06	0.002	0.011	0.006	164	1.01
pi(CTA)	1.20E-02	6.68E-06	0.007	0.017	0.012	230	1.00
pi(CTC)	1.56E-02	9.67E-06	0.009	0.021	0.016	154	1.00

pi(CTG)	2.35E-02	1.25E-05	0.017	0.030	0.023	305	1.00
pi(CTT)	1.47E-02	1.07E-05	0.009	0.021	0.014	192	1.00
pi(GAA)	7.88E-03	3.44E-06	0.004	0.012	0.008	253	1.00
pi(GAC)	2.40E-02	9.23E-06	0.018	0.030	0.024	253	1.00
pi(GAG)	1.52E-02	8.52E-06	0.010	0.021	0.015	220	1.00
pi(GAT)	2.48E-02	1.18E-05	0.019	0.032	0.025	208	1.00
pi(GCA)	1.42E-02	4.90E-06	0.010	0.019	0.014	252	1.00
pi(GCC)	2.77E-02	1.07E-05	0.022	0.034	0.028	265	1.00
pi(GCG)	1.84E-02	7.60E-06	0.013	0.024	0.018	275	1.00
pi(GCT)	2.35E-02	9.97E-06	0.017	0.029	0.023	190	1.01
pi(GGA)	1.32E-02	4.33E-06	0.009	0.017	0.013	255	1.00
pi(GGC)	2.16E-02	6.84E-06	0.017	0.027	0.021	354	1.00
pi(GGG)	1.55E-02	4.99E-06	0.011	0.020	0.015	153	1.00
pi(GGT)	1.47E-02	5.55E-06	0.010	0.019	0.015	232	1.00
pi(GTA)	4.88E-03	2.60E-06	0.002	0.008	0.005	252	1.00
pi(GTC)	2.19E-02	1.13E-05	0.015	0.028	0.022	204	1.00
pi(GTG)	1.66E-02	1.17E-05	0.010	0.023	0.016	105	1.00
pi(GTT)	1.51E-02	1.00E-05	0.009	0.021	0.015	191	1.00
pi(TAC)	2.36E-02	1.57E-05	0.016	0.032	0.023	265	1.00
pi(TAT)	1.17E-02	5.23E-06	0.007	0.016	0.012	213	1.00
pi(TCA)	1.35E-02	8.71E-06	0.008	0.019	0.013	221	1.00
pi(TCC)	1.88E-02	1.11E-05	0.013	0.026	0.019	197	1.00
pi(TCG)	1.25E-02	8.27E-06	0.007	0.018	0.012	222	1.00
pi(TCT)	1.82E-02	1.52E-05	0.011	0.025	0.018	136	1.00
pi(TGC)	1.75E-02	1.18E-05	0.011	0.024	0.017	224	1.00
pi(TGG)	1.33E-02	1.38E-05	0.007	0.021	0.013	116	1.00
pi(TGT)	8.07E-03	4.73E-06	0.004	0.012	0.008	307	1.00
pi(TTA)	3.76E-03	3.09E-06	0.001	0.007	0.003	189	1.00
pi(TTC)	2.85E-02	2.71E-05	0.019	0.039	0.028	121	1.00
pi(TTG)	1.58E-02	1.22E-05	0.009	0.022	0.015	223	1.00
pi(TTT)	1.31E-02	7.64E-06	0.008	0.019	0.013	253	1.00