

Estudio de los genes allinasa y quitinasa en el ajo costarricense (*Allium sativum* L.)

Study of the genes alliinase and chitinase in materials of costarican garlic (*Allium sativum* L.)

Karina Barboza Rojas¹
Alejandro Hernández Soto²
Claudia Zúñiga Vega³

Fecha de recepción: 20 de febrero del 2012
Fecha de aprobación: 18 de setiembre del 2012

Barboza, K; Hernández, A; Zúñiga, C. Estudio de los genes allinasa y quitinasa en el ajo costarricense (*Allium sativum* L). *Tecnología en Marcha*. Vol. 26, N° 1. Pág 46-53

- 1 Ingeniera en Biotecnología. Correo electrónico: karibarbosa10@gmail.com
- 2 Académico. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: alejandro.hernandez@micit.go.cr
- 3 Académica. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: czuniga@itcr.ac.cr

Palabras clave

Allinasa, quitinasa, ajo costarricense, *Allium sativum*.

Resumen

El cultivo del ajo en Costa Rica se ha visto afectado por la calidad y cantidad de semillas almacenadas. La producción de los bulbos también se ve deteriorada por las enfermedades. Sin embargo, este cultivo es apetecido por su sabor, considerado superior al del ajo importado de China. La pungencia del ajo está dada en parte por la acción de la enzima allinasa. Además, la resistencia a ciertos hongos patógenos está influenciada por la actividad de la enzima quitinasa. En el presente estudio se analizaron los genes que codifican para ambas enzimas, utilizando plántulas *in vitro* obtenidas a partir de materiales de las zonas de Llano Grande, Santa Ana, Miramar, San Ramón y de ajo importado de China. Se compararon y estudiaron las secuencias de ADN utilizando estos genes, con el fin de encontrar diferencias que permitieran la caracterización de distintos materiales. Los resultados obtenidos indicaron la presencia de distintas copias del gen allinasa. El gen de la quitinasa presentó una secuencia muy conservada en todos los materiales analizados. Se encontraron dos intrones altamente conservados en el germoplasma costarricense y el material de referencia asiático. Se concluyó que el ajo costarricense es muy similar al asiático. Y se presenta el primer informe de la existencia de intrones en la quitinasa del ajo.

Key words

Allinase, chitinase, Costa Rican garlic, *Allium sativum*.

Abstract

Garlic production in Costa Rica has been affected by the quality and quantity of the harvested seeds. Bulb production has also been deteriorated by diseases. However, this crop is preferred for its flavor, considered superior to the one imported from China. Pungency of garlic is partially due to the action of the alliinase enzyme. Furthermore, the resistance to certain pathogenic fungi is influenced by the chitinase enzyme activity. The encoding genes for both enzymes were analyzed in this study, by using *in vitro* plantlets obtained from local materials from Llano Grande, Santa Ana, Miramar and San Ramon zones and garlic imported from China. By using these genes, DNA sequences were compared and studied in order to find differences that allow the characterization of various materials. The results showed the presence of different alliinase gene copies. The chitinase gene presented a highly conserved sequence in all materials tested. Two highly conserved introns were found in the Costa Rican germplasm and the Asian reference material. It was concluded that Costa Rican garlic is very similar to the Asian. Also, the first report of the existence of introns in the chitinase of garlic is presented here.

Introducción

El ajo (*Allium sativum* L.) es una especie diploide del género *Allium* de la familia de las amarilidáceas (Amarillidaceae) (AGP, 2009). Se conoce poco de su diversidad y se estima que cuenta con variaciones que pueden ser explotadas para el mejoramiento genético de la especie mediante técnicas no convencionales (Molina & Rosales, 2007).

El ajo es un cultivo que mantiene un fenotipo diverso entre los diferentes clones, a pesar de reproducirse exclusivamente de manera asexual (Lee et al., 2003). Maass & Klaas (1995) evaluaron la diversidad intraespecífica del ajo utilizando análisis de isoenzimas y RAPD. La propuesta más reciente se basa principalmente en las secuencias de la región del espaciador transcrito interno del ADN ribosomal nuclear (ITS, por sus siglas en inglés) (Friesen et al. 2006). Barboza y colaboradores (en prensa) utilizaron estos marcadores para evaluar el ajo costarricense y las secuencias obtenidas se encuentran publicadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (accesiones: JN036697.1, JN036698.1, JN036699.1, JN036700.1) (NCBI, 2011).

Desde 1970, la producción mundial de ajo ha sufrido un incremento tanto en el área sembrada como en el rendimiento (Cavagnaro & Galmarini, 2007). En Costa Rica, varios autores señalan la importancia de aumentar la producción a nivel nacional, principalmente por las características organolépticas del ajo criollo sobre el importado de China (Barboza et al., en prensa y Brenes y Zúñiga, en prensa) e indican que como los agricultores costarricenses han visto disminuidos sus ingresos por los bajos precios y la competencia en la producción e importación de otras hortalizas, como la cebolla y la papa, consideran que este cultivo es una excelente opción para diversificar.

Los compuestos organosulfurados son los responsables del sabor en *Allium* y de la mayoría de los beneficios para la salud. Las células de las aliáceas contienen en su citoplasma los precursores sin olor del sabor en ajo (ACSOs) que, cuando son hidrolizados por la enzima allinasa, dan lugar al sabor y pungencia (picante) característicos de este género (Cavagnaro et al., 2005). En un estudio realizado por Cavagnaro et al. (2003, 2004), se observaron de 4 a 8 bandas en hibridaciones Southern blot de

la enzima allinasa, y caracterizaron la secuencia del extremo 5' de 12 supuestos alelos de allinasa de una accesión de ajo, lo que indica las duplicaciones de esta familia de genes.

Otra enzima estudiada es la quitinasa, la cual actúa sobre la quitina, que es un polímero soluble, lineal y compuesto por unidades de N-acetilglucosamina (NAG) unidas entre sí por enlaces β -1,4, común en muchos organismos y que se encuentra en las paredes celulares de hongos, exoesqueletos de insectos y conchas de los crustáceos (Zou, 2000). En el ajo, la propagación vegetativa obligada ha promovido problemas fitopatológicos como la "pudrición blanca", causada por *Sclerotium cepivorum* Berk, un hongo muy agresivo. Y una de las estrategias que se sugieren para resolver el problema es la clonación de genes de enzimas involucradas en la protección contra hongos patógenos (quitinasas y β -glucanasas) y la sobreexpresión de esos genes en la planta. En ajo, se han reportado secuencias (ADNc) de quitinasa (*chi 1* y *chi 2*) y ninguna para β -glucanasas (Carvajal & Salcedo, 2001).

Muchas quitinasas de plantas son codificadas por una pequeña familia multigénica. Los genes de quitinasas de clase I en *Arabidopsis* tienen un intrón, mientras que los de tabaco CHN14, CHN48 y CHN50 tienen dos. En el caso de los frijoles (CH5B), el arroz (RCH10) y el ajo no hay intrones reportados (Zou, 2000).

El objetivo de esta investigación consistió en caracterizar los genes quitinasa y allinasa en materiales de ajo costarricense, por su relación con la resistencia de las plantas a patógenos y la pungencia del producto, respectivamente. Lo anterior permitirá establecer comparaciones mediante análisis bioinformáticos con materiales foráneos, publicados en las bases de datos existentes, que servirán de insumo para programas de mejoramiento genético.

Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago. Los materiales de ajo costarricense (*Allium sativum*) se recolectaron en las zonas de San Ramón de Alajuela, Miramar de Puntarenas, Santa Ana en San José y Llano Grande de Cartago y también se incluyó ajo importado de China.

Material vegetal y extracción del ADN

Para el estudio se siguieron los protocolos recomendados por Barboza et al. (en prensa), para la obtención de plantas *in vitro* de ajo mediante la introducción en el laboratorio de ápices de bulbillos; así como el protocolo modificado del Wizard® Genomic DNA Purification Kit) para la extracción del ADN del ajo.

Diseño de los cebadores para la amplificación de los genes allinasa y quitinasa en ajo

Este proceso se realizó a partir de las secuencias s73324.1 y M94105.1 respectivamente, disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para la obtención de los cebadores se utilizó la aplicación Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000); y para verificar la efectividad de los mismos en la amplificación de las secuencias en estudio se empleó el programa FastPCR de la Universidad de Helsinki (Kalendar et al., 2009).

Amplificación de los genes de allinasa y quitinasa

Para la amplificación de las secuencias del gen de la quitinasa, se utilizaron 5 µl del ADN extraído, 2,5 µl de cada cebador (100 ng/µl) y 0,9 µl de Taq Polimerasa (Dream Taq™ DNA Polymerase, Fermentas 5u/µl) por reacción de PCR. En el caso del gen de la allinasa, se emplearon 5 µl de cada cebador y 1,2 µl de Taq Polimerasa. Las muestras se colocaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 y Veriti (Applied Biosystems) para su amplificación.

Para el gen de la quitinasa se utilizó el siguiente programa de termociclado: un ciclo de desnaturalización inicial (95 °C-3 minutos), 30 ciclos de desnaturalización (95 °C-30 segundos), alineamiento (56 °C-30 segundos) y extensión (70 °C-45 segundos), con un ciclo de extensión final (70 °C-10 minutos). Para la amplificación del gen de la allinasa: un ciclo de desnaturalización inicial (95 °C-5 minutos), 30 ciclos de desnaturalización (95 °C-30 segundos), alineamiento (58 °C-30 segundos) y extensión (70 °C-1,5 minutos), con un ciclo de extensión final (70 °C-10 minutos). Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p/v).

Purificación y secuenciación de los productos de PCR

La limpieza de los productos se llevó a cabo utilizando cloroformo y luego isopropanol para precipitar

el ADN. Los productos limpios fueron resuspendidos en un volumen de 30µl de agua ultrapura estéril. Los productos amplificados se enviaron a MacroGen USA para ser secuenciados en un analizador de ADN Applied Biosystems ABI 3730XL.

Análisis bioinformático de las secuencias de los genes allinasa y quitinasa

Las secuencias se editaron manualmente con base en las señales observadas en los electroferogramas en el programa BioEdit (Hall, 1999). Se realizó un BLASTn para determinar su similitud con las secuencias publicadas en el GeneBank e identificar la presencia de intrones y exones en las regiones amplificadas.

Por otra parte, se comparó la secuencia utilizada para diseñar los cebadores de la allinasa y las secuencias que alinearon con un mayor porcentaje de identidad con los productos secuenciados de la zona de Miramar y del ajo chino.

Para el gen de la quitinasa se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de las cinco localidades en estudio con el programa ClustalW (Higgins et al., 1994), en busca de alguna diferencia significativa a nivel de las secuencias nucleotídicas y/o determinar su similitud. Para determinar si las diferencias nucleotídicas de las quitinasas reflejaban un cambio de aminoácido en la secuencia de las proteínas publicadas en el GeneBank, se hizo un BLASTx para encontrar los marcos abiertos de lectura (ORF, Open Reading Frame) utilizando las secuencias genómicas.

Resultados

Material vegetal y extracción de ADN

Se obtuvo material *in vitro* sano y limpio del cual se extrajo ADN de alta pureza, con una banda de alto peso molecular (mayor a 7000 pb), libre de contaminación por ARN y proteínas.

Diseño de los cebadores para amplificar los genes allinasa y quitinasa

Los cebadores diseñados para la amplificación de un fragmento de los genes quitinasa y allinasa de ajo se presentan en el cuadro 1.

La estrategia de amplificación por PCR se basó en flanquear intrones. El PCR *in silico* a partir del programa FastPCR (Kalendar et al., 2009) demostró

Cuadro 1. Cebadores diseñados para la amplificación de un fragmento de los genes quitinasa y allinasa de ajo

Gen	Cebador	Secuencia 5' a 3'
Allinasa	ALd	AGGT AGTGGGAAATGCTGCTGC
	ALr	CTCAAACGCACGTAACGACTGC
Quitinasa	CHd	TGCCCTGCCAATGGATTTTA
	CHr	TCCACCGTTGATGAT GTTGG

la efectividad de los cebadores para amplificar los genes en estudio. Al comparar los ARNm que se usaron para el diseño de los cebadores, la predicción del tamaño de los productos de PCR, sin intrones, fue de 868 bp y 535 bp para los genes allinasa y quitinasa respectivamente.

Sin embargo, al realizar la predicción con una secuencia genómica de la enzima quitinasa de uva (*Vitis vinifera*) (NW_002240826.1), el producto de PCR sería de mayor peso molecular debido a los intrones, aproximadamente 1000 pb, pensando en la existencia de intrones en el gen quitinasa en ajo.

En el caso de la allinasa, la predicción del producto amplificado se realizó tomando como referencia las secuencias CDS parciales que se encuentran publicadas en el GeneBank, y se esperaba un producto de aproximadamente 1200 pb.

Amplificación de los genes allinasa y quitinasa

En la figura 1 se muestra la efectiva amplificación del gen allinasa de ajo (*A. sativum*) con los cebadores diseñados en los cinco materiales estudiados. En el gel se observan bandas de igual peso molecular para todas las muestras, aproximadamente 1200 pb.

En la Figura 2 se observan los productos de PCR amplificados de tamaño esperado y correspondientes al gen quitinasa de ajo (*A. sativum*). Los resultados muestran una banda de similar peso molecular (cerca de 750 pb) para las cinco localidades.

Análisis bioinformático de las secuencias de los genes allinasa y quitinasa

De los productos de PCR del gen allinasa de las cinco localidades analizadas, solo se obtuvieron dos secuencias parciales (ajo de Miramar y ajo chino) útiles para el análisis bioinformático de las mismas. La secuencia de Miramar alineó en un 94% (porcentaje de identidad) con la secuencia del gen allinasa

de tres clones publicados en el GeneBank, todos originarios de Taiwán.

El análisis comparativo entre la secuencia utilizada para diseñar los cebadores de la allinasa y las secuencias que alinearon con un mayor porcentaje de identidad con los productos secuenciados de la zona de Miramar y del ajo chino permitió determinar que la región amplificada corresponde a tres intrones y dos exones completos del gen. Sin embargo, tras la secuenciación de los productos amplificados, solo fue posible visualizar en su totalidad la secuencia del ajo chino. La de Miramar únicamente mostró la región correspondiente a dos intrones y un exón de forma completa.

Se encontraron dos secuencias reportadas de ADNc para el gen de la quitinasa que alinean en más de un 95% para todos los casos y que corresponden a las accesiones M94105.1 y M94106.1 del GenBank. El alineamiento múltiple con la secuencia de la quitinasa de la UVA (accesión AJ291506.1 GI:10880380) y el ARNm de la quitinasa de ajo permitió predecir dos intrones en las secuencias de quitinasas analizadas. Esto corresponde al tamaño esperado debido a que se trata de la amplificación de ADN genómico. La secuenciación confirmó la presencia de los intrones y exones según corresponde para el producto de PCR del gen que codifica para la enzima quitinasa de ajo. Este resultado es importante, ya que es la primera vez que se informa de la secuenciación de intrones de las quitinasas de ajo.

En general, las secuencias de quitinasas mostraron ser muy conservadas. Los puntajes obtenidos del alineamiento reflejaron una identidad del 98% al 100% entre las secuencias, siendo el ajo chino y el de la zona de Llano Grande los que resultaron tener idéntica la secuencia para este gen.

El alineamiento múltiple de las secuencias mostró la presencia de dos cambios a nivel de nucleótido en uno de los intrones. Esta es la primera vez que

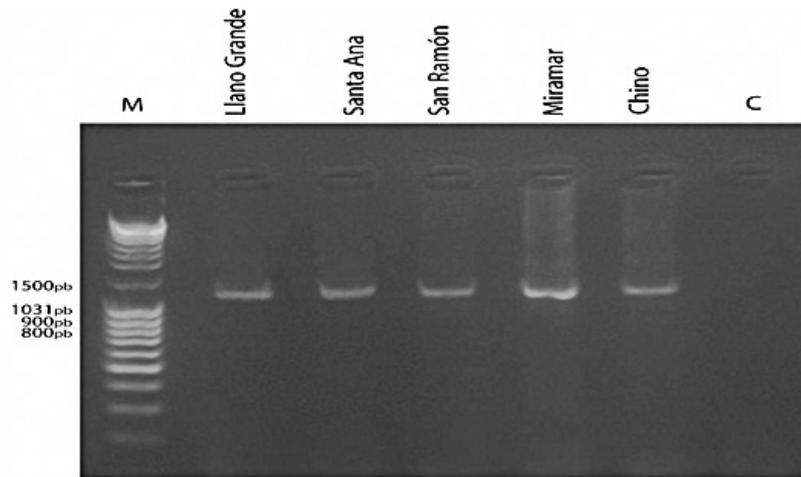


Figura 1. Gel de agarosa al 1% TAE 1X que muestra la amplificación por PCR de un fragmento nucleotídico del gen allinasa de ajo (*Allium sativum*) a partir de material in vitro de las localidades de Llano Grande, Santa Ana, San Ramón y Miramar y un ajo importado de Asia. (M) marcador de peso molecular 1 kb Ladder; Fermentas®.

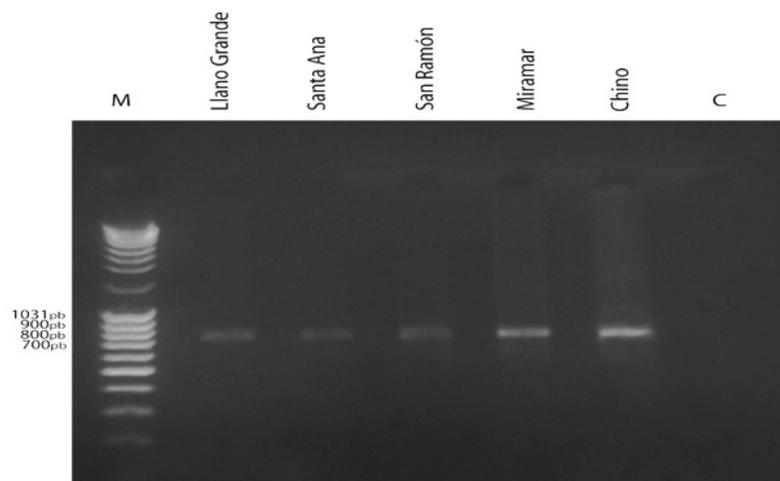


Figura 2. Gel de agarosa al 1% TAE 1X que muestra la amplificación por PCR de un fragmento nucleotídico del gen quitinasa de ajo (*Allium sativum*) a partir de material in vitro de las localidades de Llano Grande, Santa Ana, San Ramón y Miramar y un ajo importado de Asia. (M) marcador de peso molecular 1 kb Ladder; Fermentas®, (C) blanco.

se informa de este tipo de resultados en quitinasas. En el caso de los exones, el alineamiento múltiple mostró cinco cambios a nivel de nucleótido en dos de los tres exones identificados, en donde solo uno representó un cambio a nivel de aminoácidos (figura 3).

Según el BLASTx realizado, en la secuencia del ajo de Santa Ana, un residuo de leucina, presente en las demás localidades y en la secuencia publicada en el GeneBank, fue sustituido por uno de prolina. También se presentaron cambios en otros aminoáci-

dos en las secuencias de las quitinasas con respecto a la publicada en el NCBI, algunas fueron sustituciones conservadoras.

Discusión

Diseño de cebadores específicos para los genes allinasa y quitinasa

La obtención de amplicones de PCR de bandas únicas, de tamaño esperado en los geles de agarosa, y la secuenciación con patrones de alta calidad,

```
Chino
CTACAACCTACGGGCAGTGCGGTAATGCCATACATCAAGACCTGCTAAACAACCCAGATTT480
Llano_Grande
CTACAACCTACGGGCAGTGCGGTAATGCCATACATCAAGACCTGCTAAACAACCCAGATTT480
Miramar
CTACAACCTACGGGCAGTGCGGTAATGCCATACATCAAGACCTGCTAAACAACCCAGATTT480
Santa_Ana
CTACAACCTACGGGCAGTGCGGTAATGCTATTCATCAAGACCCGCTAAACAACCCAGATTT480
San_Ramon
CTACAACCTACGGGCAGTGCGGTAATGCTATACATCAAGACCTGCTAAACAACCCAGATTT480
```

Figura 3. Alineamiento múltiple del cambio nucleotídico en uno de los exones de las secuencias de quitinasa estudiadas

demuestran que el diseño de cebadores para amplificar por PCR un fragmento de los genes quitinasa y allinasa, los perfiles de termociclado y los procedimientos de limpieza que se realizaron en esta investigación, fueron eficaces y de alta calidad.

Por otra parte, las predicciones que se realizaron *in silico* concordaron con lo que se presentó en la práctica y que predecía una amplificación genómica de mayor tamaño en comparación con los ARNm con los que se diseñaron los cebadores. De esta manera, se esperaba amplificar un producto de más de 868 pb y 535 pb para los genes allinasa y quitinasa respectivamente, debido a que se presumía la existencia de intrones. Después de realizado el PCR, se observó en el gel una banda cercana a las 1200 pb en el caso de la allinasa y de 750 pb en el de la quitinasa. El resultado concuerda con lo esperado, debido a que se amplifican también secuencias no codificantes, es decir intrones, que se intercalan entre los exones que se transcriben en el ARNm correspondiente.

Análisis bioinformático del gen allinasa

El análisis comparativo entre la secuencia utilizada para diseñar los cebadores de la allinasa y los productos secuenciados de la zona de Miramar y del ajo chino, demostró que la región flanqueada por los imprimadores corresponde a tres intrones y dos exones completos del gen.

Las señales obtenidas por la secuenciación no presentaron patrones uniformes y en algunos amplificaciones no fue posible detectar el patrón de la secuenciación. De manera concreta fue posible detectar gran parte de la secuencia del ajo chino, mientras que la secuencia de Miramar solo mostró la región correspondiente a dos intrones y un exón

de forma completa. La dificultad de obtener una buena señal de secuenciación en la mayoría de los casos se podría deber a la presencia de copias distintas del gen allinasa y por lo tanto la imposibilidad del método de Sanger de secuenciar, ante la presencia de distintos nucleótidos para el mismo sitio.

Estudios realizados por Cavagnaro et al. (2003 y 2004), así como el de Ipek et al. (2005), reafirman esta idea al encontrar variantes de este gen. El producto de PCR amplificado en el presente estudio correspondería a una mezcla de copias de este gen. Este resultado es de gran importancia debido a la relevancia que tienen las enzimas codificadas por este gen en el sabor y aroma del ajo. El diseño de los cebadores y este resultado preliminar es elemental para la caracterización molecular del ajo costarricense con secuencias que están directamente relacionadas con el sabor; como el gen de la enzima allinasa; y por tanto son clave para diferenciar las variedades "criollas" que tienen un sabor y pungencia muy particular o distinta al ajo chino que se importa en nuestro país.

Cavagnaro y colaboradores (2004, 2005) sugieren que es probable que las diferentes copias de esta enzima resulten en variantes con actividades específicas, y que el hecho de que las isoenzimas difieran en la especificidad del sustrato podría explicar el respectivo contenido de tiosulfatos encontrados en bulbos de cebollas.

Análisis bioinformático del gen quitinasa

El BLASTn de las secuencias amplificadas reflejó que la región flanqueada por los imprimadores corresponde a un exón y dos intrones de secuencia completa, y a dos exones de forma parcial (donde se unen los cebadores).

Es importante recalcar que en ajo se han reportado dos secuencias (ADNc) de quitinasa (Carvajal & Salcedo, 2001). En la presente investigación se logró amplificar y secuenciar cinco secuencias codificantes (CDS) parciales del gen quitinasa, que incluye intrones que no han sido publicados. Este es el primer reporte de intrones en ajo. Y a pesar de la alta similitud presentada entre sí por estas secuencias, el alineamiento múltiple de las mismas mostró que hay sitios a lo largo de la misma donde existen cambios de uno o dos nucleótidos que podrían ser los responsables de dar origen a variantes de la enzima, ya que según Zou (2000), muchas quitinasas de plantas son codificadas por una pequeña familia multigénica, similar a lo que ocurre con la enzima allinasa. En el caso de la quitinasa de Santa Ana, la mutación que provoca cambio de aminoácido es importante, ya que podría utilizarse para diferenciar el material de esa zona, tomando en consideración que los intrones mostraron ser muy conservados.

Lo que se denota del análisis es que el ajo costarricense es altamente similar al asiático.

Conclusiones

El diseño de los cebadores fue exitoso en todos los casos y permitió la posterior secuenciación de los fragmentos amplificados de los genes quitinasa y allinasa.

El presente estudio es el primer reporte que se realiza en el país sobre los genes allinasa y quitinasa en ajo costarricense y constituye el primer informe de la existencia de intrones en la quitinasa del ajo. Se encontraron dos intrones altamente conservados para el germoplasma costarricense y el material de referencia asiático.

Bibliografía

- AGP (Angiosperm Phylogeny Group). (2009). Obtenido desde: <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>. Consultado 06 de julio de 2011.
- Barboza, K.; Hernández, A.; Zúñiga, C. (en prensa). *Semejanzas entre el ajo (Allium sativum) costarricense y el asiático según secuencias de ADN ribosomal.*
- Brenes, J. & Zúñiga, C. (comp.) (en prensa). *Cultivo del ajo en Costa Rica.* Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Carvajal, E. & Salcedo, R. (2001). *Amplificación por PCR de genes de quitinasa de ajo (Allium sativum L.).* México, Universidad de Guanajuato, *Acta universitaria* 11(3): 39-85.
- Cavagnaro, P., Masuelli, R. & Simon, P. (2003). *Molecular data suggest multiple members comprising the alliinase gene family in garlic.* Am. Soc. Hort. Sci. Centennial Conf. *HortScience* 38(5): 804.
- Cavagnaro, P., Galmarini, C., Masuelli, R. & Simon, P. (2004). *5' sequence characterization of alliinase gene family members in garlic.* En: Proceedings of the Plant and Animal Genome XII Conference (San Diego, CA), p. 112.
- Cavagnaro, P., Galmarini, C. & Simon, P. (2005). *Evaluación de caracteres ligados al sabor y a características nutraceuticas de una colección de 162 clones de ajo.* Resúmenes del XII Congreso Latinoamericano y XXVIII Congreso Argentino de Horticultura (6-8 septiembre 2005. General Roca, Río Negro), p. 267.
- Cavagnaro, P. & Galmarini, C. (2007). *Garlic.* En: Kole, C. (ed.). *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants.* Vol. 5, p. 349-364. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Friesen, N., Fritsch, R. & Blattner, F. (2006). *Phylogeny and new intrageneric classification of Allium L. (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences.* *Aliso* 22: 372-395.
- Hall, T. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT.* *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Higgins, D., Thompson, J. & Gibson, T. (1994). *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.* *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Ipek, M., Ipek, A., Almquist, S. & Simon, P. (2005). *Demonstration of linkage and development of the first low-density genetic map of garlic, based on AFLP markers.* *Theor. Appl. Genet.* 110: 22-236.
- Kalendar, R., Lee, D. & Schulman, A. (2009). *FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search.* *Genes, Genomes and Genomics* 3(1): 1-14.
- Lee, H., Eom, E., Lim, Y., Bang, J. & Lee, D. (2003). *Construction of a garlic BAC library and chromosomal assignment of BAC clones using the FISH technique.* *Genome* 46: 514-520.
- Maass, H., Klaas, M. (1995). *Intraspecific differentiation of garlic (Allium sativum L.) by isozyme and RAPD markers.* *Theor. Appl. Genet.* 91: 89-97.
- Molina, G. & Rosales, F. (2007). *Diversidad de poblaciones de ajo (Allium sativum L.) cultivadas en Guatemala, definida por marcadores de ADN.* *Agronomía Mesoamericana* 18(1): 85-92.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2011). Obtenido desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000). *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.* En: Krawetz, S. & Misener, S. (eds). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (p. 365-38). Totowa, NJ: Humana Press.
- Zou, X. (2000). *Characterization of chitinase activity and gene expression in muskmelon seeds.* Tesis Dr. Blacksburg, Virginia. Virginia Polytechnic Institute and State University. 169 p.