



Food interest *Agave salmiana's fructans obtention* using plant tissue culture techniques

Obtención de fructanos de *Agave salmiana* utilizando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales

Claudia del Rosario Sánchez-Madrid^{1*}, Sergio Zavala-Castillo¹, Margarita Ivonne Garrido-Gutierrez¹.

¹Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Zacatecas (UPIIZ) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Blvd. del Bote S/N Cerro del Gato Ejido La Escondida, Col. Ciudad Administrativa, C.P. 98160, Zacatecas, Zac. México.

*cmadrid.alimentos@gmail.com.

ABSTRACT

The objective of this work was to establish the disinfection protocol for *Agave salmiana* *in vitro* culture, to be able to submit the explants to different vegetal growing regulation concentrations for callus induction and the later obtaining of fructans. The explants were incubated in Murashige & Skoog media, different types of 2,4-D and BAP combinations were used and it was solidified with phytigel. The explants submitted to low lightning conditions and low concentrations of vegetal growing regulators (VGR) were oxidized faster than the ones that were submitted to darkness and higher concentrations of VGR. In closer concentrations between 2,4-D and BAP, traces of callus were observed and root traces in the ones with higher concentration of 2,4-D. The explants used as control behaved differently, in *Agave tequilana* the explant increased in size compared to *Agave salmiana* without the formation of viable callus, and for the asparagus, callus was already observed. Histological study was made of the explants of *Agave salmiana*, the explant of immature leaves contained few core cells, important for the formation of the desired callus.

Keywords: *Agave salmiana*, callus, fructans.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue establecer el protocolo de desinfección para el cultivo *in vitro* de *Agave salmiana* para poder someter los explantes a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal para la inducción de callo y la posterior obtención de fructanos. Los explantes se incubaron en medio de cultivo de Murashige & Skoog, se utilizaron diferentes combinaciones de 2,4-D y BAP y fue solidificado con phytigel. Los explantes sometidos a condiciones de luz y bajas concentraciones de Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV) se oxidaron más rápido que los que fueron sometidos a oscuridad y a mayores concentraciones de RCV. A concentraciones más cercanas entre 2,4-

D y BAP se observó indicios de callo y en los que se tuvo una mayor concentración de 2,4-D indicios de raíz. Los explantes utilizados como control se comportaron distinto, en el *Agave tequilana* el explante aumento de tamaño en comparación con el de *Agave salmiana* sin la formación de callo viable y para el caso del espárrago si se observó formación del mismo. Se hizo un estudio histológico de los explantes de *Agave salmiana*, los explantes de hoja inmaduras contenían escasas células medulares, importantes para la formación de callo deseada en este trabajo.

Palabras clave: *Agave salmiana*, callo, fructanos.

1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos que ingerimos tienen una relación directa sobre nuestra salud y los consumidores cada vez son más conscientes de eso (Ulloa *et al.*, 2010), por esa razón es una tendencia actual el consumo de alimentos funcionales (Hernández-Carranza & Jiménez-Munguía, 2010), estos además de su aporte nutricional tienen un efecto benéfico sobre la salud y reducen el riesgo de padecer enfermedades (Roberfroid, 2002). Los fructanos son ingredientes alimentarios funcionales conocidos principalmente por su efecto prebiótico y por considerarse fibra dietética (Kathleen *et al.*, 2013), además de que presentan una serie de características fisicoquímicas que los hacen muy útiles en la industria alimentaria, como modificadores de textura lo que les permite ser utilizados como sustitutos de grasa y como edulcorantes naturales (Hernández-Carranza & Jiménez-Munguía, 2010). La demanda de este tipo de ingredientes se encuentra en crecimiento (González, 2013) y existe un especial interés por los fructanos presentes en los agaves, ya que son los principales productos fotosintéticos generados por este grupo vegetal de los más representativos de México, sin embargo existen diferentes factores limitantes en el cultivo de estas plantas que hacen difícil su multiplicación masiva por métodos convencionales, como su largo periodo de crecimiento, problemas de polinización y viabilidad de las semillas (Domínguez *et al.*, 2008), también el sistema de propagación por hijuelos de rizoma se ha considerado principio de proliferación de enfermedades (Portillo & Santacruz-Ruvalcaba, 2006), así como la falta de una buena selección del material vegetal y escasas e inadecuadas siembras han provocado su deterioro genético, incluso en el caso particular del *Agave salmiana* (especie cultivada en zacatecas) la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha declarado la planta en peligro de extinción (Flores-Morales *et al.*, 2009). A partir de lo anterior se propone la obtención de fructanos de *Agave salmiana* utilizando la tecnología de cultivo de tejidos vegetales con el fin de que puedan ser aprovechados de manera potencial para el futuro desarrollo de nuevos productos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron explantes de hoja de *Agave Salmiana* donado por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Zacatecas.

Las hojas fueron sometidas a dos tratamientos para su desinfección. Para el primer tratamiento fue lavada superficialmente con agua y jabón, se cortó un segmento del basal de la hoja aproximadamente de 7cm de largo, se sumergió en etanol al 70% durante 1 minuto, seguido de una solución de cloro comercial al 1% más 1 gota de detergente líquido durante 15 minutos, se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril con agitación vigorosa, se cortó el tejido para obtener un segmento de 5 cm aproximadamente, se esterilizó nuevamente con cloro comercial al 0.6% por 5 minutos, posteriormente de 3 lavados con agua estéril destilada y se hizo la disección en una solución de ascorbato de sodio 1 % para obtener los explantes de 0.5 cm² (Robert *et al.*, 1987).

Para el segundo tratamiento la hoja fue lavada con agua y jabón, fue sumergida en etanol a 70%, seguida de una solución de cloro comercial al 10% por 30 min, se enjuagó con agua destilada estéril y se hizo la disección en una solución de ascorbato de sodio 1 % para obtener los explantes de 0.5 cm² (Toribio, 2005).

Los explantes fueron cultivados en medio Murashige y Skoog (MS) SIGMA suplementado con tiamina (0.1 mg/L), ácido nicotínico y piridoxina HCl (0.5 mg/L), azúcar morena (30 g/L), se utilizaron diferentes combinaciones de 2,4-D y BAP y fue solidificado con phytigel (2g/L). El pH del medio fue de 5.7. El medio se esterilizó en un autoclave a 121°C durante 15 minutos. Como control en el tratamiento 4 se utilizó una planta del mismo género, *Agave tequilana* y otra diferente, espárrago (*Asparagus officinalis*).

Con el objetivo de caracterizar las células que se sembraron en los diferentes tratamientos de reguladores vegetales empleados, se hizo un estudio histológico de los explantes usados para el establecimiento de los cultivos *in vitro* de *Agave salmiana*. Se hicieron preparaciones en fresco con cortes de aproximadamente 0.5 mm, teñidas con azul de metíleno para dar contraste a las células y fueron observadas con un microscopio estereoscópico.

Una vez que se obtenga callo, se establecerá el cultivo de células en suspensión y se someterán a estrés utilizando diferentes concentraciones de sustrato (sacarosa) y ABA, se realizará la evaluación de la acumulación de fructanos que se determinará a través de cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Vizcaíno-Rodríguez *et al.*, 2012).

3. RESULTADOS

Tabla 1. Evaluación de la inducción de callo en medio MS con diferentes combinaciones de RCV.

Tratamiento	2,4-D (mg/L)	BAP (mg/L)	Fotoperiodo 16 hrs luz (2 semanas)	Oscuridad (2 semanas)	Control Agave <i>tequilana</i>	Control Espárrago
1	0.1 1x	0.1 1x				
2	1 3x	0.3 2x				
3	3 5x	0.3 2x				
4	2 4x	1 3x				

2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), 6-bencilaminopurina (BAP).

En la tabla 1 se observan los cultivos a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal (RCV), mostrando que los que son sometidos a condiciones de luz artificial y bajas concentraciones de RCV se oxidan más rápido que los que son sometidos a oscuridad y a mayores concentraciones de RCV. A concentraciones más cercanas entre 2,4-D y BAP se observó indicios de callo como se muestra en la figura 1, y en los que tienen una mayor concentración de 2,4-D indicios de raíz. Los explantes utilizados como control se comportaron distinto, en el *Agave tequilana* el explante aumento de tamaño en comparación con el de *Agave salmiana* sin la formación de callo viable y para el caso del espárrago si se observó formación del mismo. Mostrando que en el genero *Agave* la adaptación *in vitro* es más difícil que en otras especies en las condiciones experimentales actuales.



Fig. 1. Explante de *Agave salmiana* tratamiento 4.

Los explantes de hoja inmaduras contenían células vasculares de tipo xilema en abundante proporción (fig. 2), en comparación con las escasas células medulares, importantes para la formación de callo deseada en este trabajo. Las hojas jóvenes bien desarrolladas mostraron una médula abundante de células parenquimatosas poliédricas, los paquetes celulares primarios localizados en la periferia de tipo floema e incipiente xilema distribuido en el corte (fig. 3). Esta misma morfología celular se presentó en los explantes obtenidos del cilindro central de la planta, salvo que las células parenquimáticas se observaron casi redondas, no angulosas, indicativo de escasa diferenciación. (fig. 4).



Fig. 2. Corte histológico de hojas de *Agave salmiana* vista a 2X en microscopio estereoscópico. Tejidos de izquierda a derecha: epidermis azul, clorenquima de color verde, médula de color azul con numerosos tubos de xilema, epidermis azul.



Fig. 3. Corte histológico de una hoja inmadura con células parenquimatosas poliédricas (flecha). Imagen amplificada 2x y obtenida en un microscopio estereoscópico.

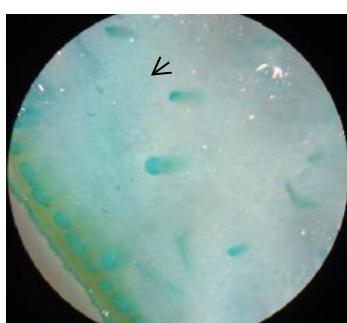


Fig. 4. Corte histológico del cilindro central de *Agave salmiana* usado para obtener explantes. Las células del parénquima son casi redondas (indicadas por la flecha). Imagen obtenida en un microscopio estereoscópico amplificada 1X.

4. DISCUSIONES

Los explantes de *Agave salmiana* no presentaron callo viable con las combinaciones de RCV utilizadas, sin embargo a concentraciones más altas se obtuvo mayor reacción, otros autores han logrado inducir callo en otras especies de *Agave* con bajas concentraciones de estos reguladores de crecimiento, utilizando tejido de tallo como explante. (Robert, 1987).

Para el caso del *Agave salmiana* se ha encontrado que en combinaciones de Kinetina (K) y 2,4-D se obtiene formación de callo en el explante entre el tallo y la raíz (Flores-Morales *et al.*, 2009), tambien se han obtenido callos en *Agave tequilana Weber var. azul* y *Agave inaequidens* para biosintesis *in vitro* de fructanos, en los tres casos utilizando semillas. (Vizcaíno-Rodríguez *et al.*, 2012). Lo que nos indica que cuando se utiliza base de hoja como explante es menor la reacción, sin embargo tambien depende la especie utilizada, los RCV y la edad del explante.

Las células parenquimatosas son las que reaccionan a las combinaciones de los reguladores vegetales incluidos en el medio de cultivo dado su carácter de escasa diferenciación celular. Esta condición les facilita dirigirse a rutas celulares distintas a la que presentan al momento de su extracción de la planta (cuando son empleadas como explante para los cultivos *in vitro*). Mientras más poligonal se observe la célula, más diferenciada y por ende su respuesta en a los tratamientos de los reguladores de crecimiento vegetal será reducida o nula. Lo que explica los resultados que se obtuvieron al usarlas como explantes.

La presente investigación no ha concluido, se continuará con las combinaciones de RCV hasta la obtención callo viable y se ensayarán condiciones de estrés diversas para estimular la producción de fructanos. Por el momento podemos concluir lo siguiente:

El segundo tratamiento fue el más eficiente para la desinfección del explante.

Se observó indicios de callo y la aparición de raíz.

Después de tres semanas todos los cultivos se oxidan, primeramente los que fueron sometidos a condiciones de luz. Los explantes utilizados como control se comportaron distinto, obteniendo mayor respuesta para el caso de *Agave tequilana* y la obtención de callo de espárrago.

Los explantes de hoja inmaduras contenían escasas células medulares, importantes para la formación de callo deseada en este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Zacatecas por facilitar instalaciones y equipo.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Domínguez-Rosales M., González-Jiménez M., Rosales-Gómez C., Quiñones-Valles C., Delgadillo-Díaz de León S., Mireles-Ordaz S. & Pérez-Molphe Balch E. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género Agave. Investigación y ciencia de la universidad autónoma de Aguascalientes., 41, pp. 53-57.
- Flores-Morales, A., Castañeda-Hidalgo, E., Sánchez-Pérez, F. J., Aguilar-Romero, L., & Ruiz-Luna, J. 2009. Mecanismos de conservación y uso del maguey pulquero *Agave salmiana* en el altiplano mexicano.
- González Hernández, L. H. 2013. Obtención de los nutracéuticos presentes en la piña del Agave Tequilero mediante dilución diferencial. CIIDIR-IPN, Michoacán.
- Hernández-Carranza, P., & Jiménez-Munguía, M. 2010. Propiedades funcionales y aplicaciones industriales de los fructooligosacáridos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 1-8.
- Kathleen L., Escott S. & Raymond J. 2013. Krause Dietoterapia. Elsevier España: GEA Consultoría Editorial, S.L.
- Roberfroid MB. 2002. Concepts and application to inulin and oligofructose. Brussels: Université Catholique de Louvain.
- Robert M. L; Herrera J. L; Contreras F. & Scorer K. N. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes Lem.* (Henequen). Plant Cell, Tissue Culture.
- Toribio Romero H. 2005. Comportamiento de explantes de Agave Pulquero (*Agave atrovirens*) en la interacción de dos reguladores de crecimiento. Tesis de maestría, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada.
- Ulloa, J. A., Espinosa Andrews, H., Cruz Rodríguez, G. K., Rosas Ulloa, P., Ulloa Rangel, B. E., & Ramírez Ramírez, J. C. 2010. Los fructanos y su papel en la promoción de la salud . *Revista Fuente*, 57-62.
- Vizcaíno-Rodríguez, L., Rodríguez-Mendiola, M., & Arias-Castro, C. 2012. Estimulación de la biosíntesis de fructanos en cultivo de células en suspensión de *Agave inaequidens* mediante la adición de glucosa y fructosa. *Gayana Bot.*(69), 75-81.
- Vizcaíno-Rodríguez, L., Rodríguez-Mendiola, M., Mancilla-Margalli, N., Avila-Miranda, M., Osuna-Castro, J., & Arias-Castro, C. 2012. Biosíntesis *in vitro* de oligofructanos: inulinas y neoinulinas por fructosiltransferasas de *Agave tequilana Weber var. azul* y *Agave inaequidens*. *Gayana Bot.* (69), 66-74.