

## Caracterización molecular de mutantes de *Agave tequilana* inducidas con radiación gamma $Co^{60}$ y su efecto en la acumulación de fructooligosacáridos

Molecular characterization of *Agave tequilana* mutants induced with gamma radiation  $Co^{60}$  and its effect in the fructooligosaccharides acumulation

Alejandro Ángeles-Espino<sup>1,3</sup>, Hilda Eréndira Dimas-Estrada<sup>1</sup>, David Ramírez-Alvarado<sup>1</sup>,  
José Manuel Cruz-Rubio<sup>1,2</sup>, Paola Andrea Palmeros-Suárez<sup>3</sup>, Juan Florencio Gómez-Leyva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular. TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Km 10 Carretera Tlajomulco a San Miguel Cuyutlán C. P. 45640, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. México. \*Correo electrónico: [jfgleyva@hotmail.com](mailto:jfgleyva@hotmail.com).

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna, Austria.

<sup>3</sup>Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). Universidad de Guadalajara.

\*Autor de correspondencia

### Resumen

La variabilidad genética en *Agave tequilana* es limitada debido a la manera clonal de reproducción en campo. En el presente trabajo se indujeron mutaciones en plantas de *Agave tequilana* micropropagadas *in vitro* vía embriogénesis indirecta empleando radiación ionizante con rayos gamma  $Co^{60}$  a las dosis de 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy y 25 Gy. Las plántulas regeneradas fueron nuevamente tratadas a 10 Gy y 20 Gy para obtener poblaciones clonales simple y doblemente irradiadas. Se evidenció variabilidad genética de las poblaciones irradiadas mediante marcadores *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) agrupándolas según la dosis de radiación. Las mutantes simples y dobles a 20 Gy aumentaron significativamente el contenido de fructosa y sacarosa en tallo, respecto al control sin irradiar, y la síntesis de fructooligosacáridos con grados de polimerización de 3, 4, 5 incrementó, lo que sugiere la inducción de los genes 1-SST y 1-FFT en las variantes de *Agave tequilana*.

**Palabras clave:** TLC; rayos gamma; ISSR; mutación; fructooligosacáridos.

### Abstract

The genetic variability in *Agave tequilana* is limited due to the clonal way of field reproduction. In the present work, mutations were induced in micropropagated *Agave tequilana* plants *in vitro* by means of indirect embryogenesis using ionizing radiation with gamma  $Co^{60}$  rays at doses of 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy, and 25 Gy; the regenerated plantlets were treated again at 10 Gy and 20 Gy to obtain simple and double irradiated clonal populations. Genetic variability of the irradiated populations was evidenced by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers by grouping them in accordance to their radiation dose. Single and double mutants at 20 Gy significantly increased the fructose and sucrose content in stem, regarding control without irradiation, and the synthesis of fructooligosaccharides with a degree polymerization of 3, 4, 5 increased, suggesting induction of genes 1-SST and 1-FFT in the variants of *Agave tequilana*.

**Keywords:** TLC; gamma rays; ISSR; mutation; fructooligosaccharides.

Recibido: 7 de mayo de 2019

Aceptado: 10 de diciembre de 2019

Publicado: 29 de enero de 2020

**Como citar:** Ángeles-Espino, A., Dimas-Estrada, H. E., Ramírez-Alvarado, D., Cruz-Rubio, J. M., Palmeros-Suárez, P. A., & Gómez-Leyva, J. F. (2020). Caracterización molecular de mutantes de *Agave tequilana* inducidas con radiación gamma  $Co^{60}$  y su efecto en la acumulación de fructooligosacáridos. *Acta Universitaria* 30, e2696. doi: <http://doi.org/10.15174/au.2020.2696>

## Introducción

México es centro de origen y diversificación del género *Agave* con el 75% de las 210 especies conocidas. Se reportan 251 especies dentro de los dos subgéneros reconocidos (*Littaea* y *Agave*), de las cuales 119 son endémicas (García- Mendoza, 2004; 2011). El cultivo de agave tequilero (*Agave tequilana* Weber var. Azul) tiene gran importancia económica debido a que sus piñas (tallos) acumulan gran cantidad de carbohidratos en forma de fructanos o agavinas (Mancilla-Margalli & López, 2006), de los que, después de un proceso de fermentación y destilación, se produce la bebida alcohólica distintiva de México conocida como *tequila*. Para abastecer esta industria actualmente existen poco más de 535 millones de plantas de *Agave tequilana* Weber variedad azul, registradas en el CRT, mismas que están establecidas en 172 000 hectáreas cultivadas dentro del territorio protegido por la Denominación de Origen Tequila (DOT) que cubre los estados de Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Nayarit y Tamaulipas, según la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994 (Pérez *et al.*, 2016). El estado de Jalisco es el que cuenta con un mayor número de plantas establecidas, más de 250 millones (Consejo Regulador del Tequila, 2017).

Aun cuando el agave tequilero ha sido cultivado durante más de dos siglos, continúan las metodologías de cultivo poco tecnificadas para mejorar la producción. Además, la propagación asexual realizada durante largos periodos de tiempo ha ocasionado un incremento en la clonación de los pocos genotipos seleccionados, disminuyendo la variación dentro de las plantaciones, lo que genera un incremento en la incidencia y proliferación de enfermedades (Gil-Vega, González-Chavira, Martínez, Simpson & Vandemark, 2001). Por otra parte, el mejoramiento genético convencional en el agave azul tequilero se dificulta debido a que presenta un ciclo de vida largo (8 a 10 años). Por lo anterior, resulta útil la adaptación de nuevas tecnologías de mejoramiento como la inducción de mutantes mediante radiaciones ionizantes, el cultivo *in vitro* y la caracterización molecular, lo cual permite explotar la variabilidad genética inducida mediante la selección de individuos con mejores características agronómicas como la concentración de azúcares, con el fin de obtener cultivos adecuados para la industria alimentaria (Rodríguez-Garay, Gutiérrez-Mora & Acosta-Dueñas, 1996).

El *Agave tequilana*, al igual que otros agaves, presenta mecanismos de adaptación morfológicos y fisiológicos importantes como la presencia de hojas suculentas, metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC), donde cerca del 87% de la fijación de  $CO_2$  ocurre en la noche y está acompañada por un incremento en la acidificación de los tejidos (Pimienta-Barrios, Zañudo-Hernández, Nobel & García-Galindo, 2007) y la acumulación de fructanos como el principal producto fotosintético, los cuales se acumulan principalmente en el tallo (López, Mancilla-Margalli & Mendoza-Diaz, 2003). La acumulación de estos azúcares también ocurre en respuesta al estrés abiótico y biótico como la sequía, el frío, la salinidad y el incremento de la resistencia a fitopatógenos (Suárez-González *et al.*, 2016). Los fructanos son polímeros de fructosa sintetizados como carbohidratos de reserva en aproximadamente el 15% de las plantas con flores (Mancilla-Margalli & López, 2006). En *Agave tequilana* pueden alcanzar hasta el 80% en peso seco y es el principal constituyente en la elaboración del tequila (Montañez-Soto, Venegas-González, Vivar-Vera & Ramos-Ramírez, 2011). Los fructanos son sintetizados a partir de la sacarosa, contienen una glucosa terminal en su estructura química y se clasifican de acuerdo al enlace glucosídico presente de la siguiente manera (Mancilla-Margalli & López, 2006): (1) inulinas de cadena lineal con enlaces  $\beta(2,1)$ , (2) levanos con enlaces  $\beta(2,6)$ , (3) graminanos con dos tipos de enlaces  $\beta(2,1)$  y  $\beta(2,6)$ , (4) inulina neoserie, la cual contiene una glucosa entre dos unidades fructosilo extendidas por enlaces  $\beta(2,1)$ , (5) levanos neoserie, formados por enlaces  $\beta(2,6)$  en cualquiera de los dos extremos de la molécula de sacarosa y en el caso de *Agave tequilana* son llamadas (6) agavinas categorizados como graminanos y neo-fructanos ramificados con enlaces  $\beta(2,1)$  y  $\beta(2,6)$  (Banguela & Hernández, 2006; Mancilla-Margalli & López, 2006).

En la actualidad, las bases del mejoramiento de las plantas está fundada en crear variación genética, selección, evaluación, identificación y clonación de los nuevos genotipos (Tiessen, 2012). Por consiguiente, la combinación entre las técnicas de inducción de mutantes y el cultivo *in vitro* pueden ofrecer varias ventajas tales como la selección de variedades promisorias, la capacidad de generar grandes poblaciones en poco tiempo y la posibilidad de obtener clones a partir de un brote (Fuchs, González, Castroni, Díaz & Castro, 2002). Siendo las dosis de radiación el factor clave para inducir mutaciones en tejido somático y en el caso de las plantas cultivadas *in vitro*, solo se requiere irradiar algunos miligramos de tejido a bajas dosis (Ahloowalia & Maluszynski, 2001). El objetivo del presente trabajo fue generar variantes en plantas de *Agave tequilana* Weber var. Azul irradiadas con  $Co^{60}$  y su caracterización empleando marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR), así como el efecto en el perfil de carbohidratos en las líneas clonales de plántulas simple y doblemente irradiadas.

## Materiales y métodos

### Material biológico

Se utilizaron plántulas de *Agave tequilana* obtenidas a partir de yemas axilares micropropagadas *in vitro* en medio Murashigue y Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con 10 mg/L de BAP y 0.25 mg/L de 2,4-D. Una vez que alcanzaron un porte de 10 cm a 12 cm con seis hojas y contaban con raíz fueron irradiadas con rayos gamma  $Co^{60}$  en diversas dosis.

### Irradiación de plantas *in vitro* con rayos gamma $Co^{60}$

Para aplicar los tratamientos de irradiación con  $Co^{60}$ , se utilizó la metodología descrita por Ángeles-Espino et al. (2013), basándose en la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) que es donde se incrementa la probabilidad de que se presenten mutaciones favorables (Robles, 1986). Se consideraron cinco plántulas por tratamiento y tres repeticiones. En el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), se irradiaron plántulas de *Agave tequilana* utilizando un irradiador *Gammacell* Modelo 220 a una dosis de  $13.7 \text{ Gy min}^{-1}$  hasta alcanzar las siguientes dosis: 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy y 25 Gy más el control (0 Gy), obteniendo la generación  $M_1V_1$ . De las plántulas irradiadas se obtuvieron embriones somáticos siguiendo la metodología descrita por Ángeles-Espino, Sánchez-Mendoza, Dimas-Estrada, Ramírez-Alvarado & Gómez-Leyva (2018), obteniendo plántulas mutantes pertenecientes a la generación  $M_1V_2$ , por lo que son mutantes estables con las características fenotípicas de *Agave tequilana*. Para la segunda radiación se tomó una muestra de cinco plántulas de esta generación ( $M_1V_2$ ) y se irradiaron con las mismas dosis, obteniendo la generación  $M_2V_1$  (10 Gy-10 Gy, 10 Gy-15 Gy, 10 Gy-20 Gy, 10 Gy-25 Gy, 20 Gy-10 Gy, 20 Gy-15 Gy, 20 Gy-20 Gy y 20 Gy-25 Gy), donde el primer número corresponde a la dosis de la generación  $M_1$ . De estas plántulas se obtuvieron embriones somáticos siguiendo la misma metodología de embriogénesis somática de la generación  $M_1V_1$ , obteniendo plántulas que corresponden a la generación  $M_2V_2$ . El total de los tratamientos obtenidos fueron 13; cuatro para las mutantes de la primera generación (10  $M_1V_2$ , 15  $M_1V_2$ , 20  $M_1V_2$  y 25  $M_1V_2$ ) y ocho mutantes para las que se irradiaron dos veces ( $M_2V_2$ ), y el grupo control sin irradiar. Las plántulas obtenidas mediante embriogénesis somática de las dos generaciones mutantes fueron utilizadas para la caracterización molecular y cuantificación de monosacáridos y disacáridos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) y fructooligosacáridos (FOS) empleando cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, por sus siglas en inglés).

## Extracción de DNA genómico

El DNA genómico de las plántulas de *Agave tequilana* se extrajo siguiendo la metodología descrita por Doyle & Doyle (1989). Para ello se utilizaron 100 mg de tejido de hoja de tres plantas por tratamiento, el tejido fue congelado en nitrógeno líquido y macerado hasta obtener un polvo fino; después, se transfirió a un microtubo con 500 µL de buffer de extracción precalentado (CTAB 3%, 2-mercaptoetanol 0.2%). Las muestras fueron incubadas a 65 °C durante 60 min y se homogenizaron utilizando 950 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v), las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y el DNA fue precipitado con un volumen igual de isopropanol frío incubando en hielo por 5 min. Posteriormente, el tubo se centrifugó durante 5 min a 8000 rpm y el sobrenadante fue eliminado por decantación. La pastilla de DNA se lavó con etanol 70%, seguido de un paso de centrifugación por 5 min a 8000 rpm, descartando el sobrenadante. El DNA fue resuspendido en 50 µL de agua Milli Q estéril.

## Marcadores moleculares mediante PCR-ISSR

Para la amplificación de marcadores moleculares ISSR se evaluaron 15 oligonucleótidos (marca Sigma) y, una vez obtenidos los perfiles de amplificación, se eligieron tres de ellos para continuar el análisis de polimorfismo. Las reacciones fueron preparadas en un volumen final de 25 µL que contenían: Buffer 1X (10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.08% (v/v) Nonidet P40), 0.2 mM dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 U de *Taq* DNA Polimerasa (*Thermo Scientific*®), 10 pM de cada oligonucleótido y 20 ng de DNA. La amplificación se realizó en un termociclador (Techne®) comenzando con una desnaturalización a 94 °C durante cuatro minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, un minuto a la temperatura de alineamiento correspondiente a cada oligonucleótido; 49 °C, (GACA)<sub>3</sub>YR; 53 °C, (CA)<sub>8</sub>RT y 44 °C para (AG)<sub>8</sub>YC, y 2 min a 72 °C, finalizando con un ciclo de 7 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron observados mediante electroforesis en amortiguador SB (Borato de Sodio 10 mM), empleando un gel de agarosa de 15 cm × 20 cm al 2% (p/v), teñidos con bromuro de etidio y visualizados en luz UV.

## Separación y cuantificación de carbohidratos mediante HPLC y HPTLC

La extracción de carbohidratos se realizó a partir de 100 mg de tejido obtenidos de la parte central del tallo de plántulas de *Agave tequilana*; se maceró el tejido y se suspendió en agua destilada (1:10 p/v). Las muestras se mantuvieron a 70 °C por 15 min; posteriormente, se centrifugaron a 12 000 rpm durante 15 min y el sobrenadante obtenido se empleó para el análisis de carbohidratos y FOS. La glucosa, fructosa y sacarosa se cuantificaron mediante HPLC. Se inyectaron 20 µL de muestra en un cromatógrafo de líquidos marca Varian, con bomba binaria, auto muestreador, horno de columna y detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD, por sus siglas en inglés), empleando una columna Unison UK-amino a 40 °C. La fase móvil consistió en un gradiente isocrático de acetonitrilo:agua 70:30 (v/v) a un flujo de 1 mL/min. Para la cuantificación, se realizaron curvas de calibración basadas en el área bajo la curva de estándares de glucosa, fructosa y sacarosa a diferentes concentraciones en el rango de 5 µg/mL a 150 µg/mL.

Por otra parte, se aplicó 1 µL de extracto en una placa de sílica Gel 60 (*Whatman*) de alta resolución empleando una fase móvil con butanol/propanol/agua (2:1:1 v/v/v). La placa de HPTLC se corrió hasta un centímetro antes del final y fue asperjada con el revelador (anilina 2% (v/v), difenilamina 2% (w/v), ácido fosfórico 15% (v/v), en acetona) para obtener la visualización de los carbohidratos (Suárez-González et al., 2016). Los estándares empleados fueron los monosacáridos: fructosa (Sigma) y glucosa (Sigma), el disacárido: sacarosa (DP2), y oligosacáridos; 1-kestosa (DP3, Megazyme), 1,1-kestotetraosa (DP4, Megazyme), 1,1,1-kestopentosa (DP5, Megazyme). La cuantificación se realizó con base en una interpolación en un rango de concentración de 1.5 mg/mL de cada carbohidrato estándar. El análisis

densitométrico se elaboró empleando del programa *UTSCH Image Tool V3.0 (The University of Texas Health Science Center in San Antonio)*, en el cual se utilizó la imagen digitalizada del cromatograma para obtener los valores de unidades relativas de intensidad de cada carbohidrato.

## Análisis de datos

Para el análisis de la diversidad genética mostrada en el PCR-ISSR, se obtuvo una matriz con los fragmentos de amplificación obtenidos (bandas) que fueron codificados de acuerdo con un marcador dominante, donde: 1 = producto presente y 0 = producto ausente. Los datos moleculares resultantes se utilizaron para generar un análisis de agrupamiento de los agaves mutantes y control. La similitud genética se calculó utilizando el coeficiente de similitud Jaccard con el software *NTSYSpc ver. 2.2 (Applied Biostatistics, Inc.)*. La agrupación se llevó a cabo empleando el algoritmo *UPGMA (Método de grupo de pares no ponderados usando promedio aritmético)*. El análisis de componentes principales (ACP) para ubicar los grupos de mutantes se ejecutó con base a la matriz de correlaciones generada a partir de las frecuencias alélicas, usando el programa *Statgraphics Centurion XVI v16.1.11 (Statpoint Technologies, 2009)*. Para el contenido de carbohidratos se realizó un análisis de varianza y, posteriormente, una comparación de medias de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

## Resultados y Discusión

### Generación de mutantes de *Agave tequilana*

En agave, existen pocos reportes para especies irradiadas con rayos gamma. Por ejemplo, González *et al.* (2007) determinaron para henequén (*Agave fourcroydes*) la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) en 20 Gy, con lo cual los explantes incrementaron su masa fresca en relación con el control en un 49.6%, mientras que en *Agave tequilana* Ángeles-Espino *et al.* (2013) determinaron la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) entre 15 Gy y 25 Gy para inducir la obtención de mutantes favorables, disminuyendo significativamente la viabilidad de las plántulas con dosis mayores a estas. Cabe mencionar que ningún mutante de *Agave tequilana* obtenido por esta vía había sido caracterizado hasta el presente trabajo.

Los mutágenos físicos como la irradiación gamma (10 nm) causan daño directo al DNA, ya que se generan radicales reactivos de hidroxilo debido a la interacción que tienen con el agua (Esnault, Legue & Chenal, 2010). Estos radicales pueden dañar o modificar componentes importantes de las células vegetales y cambiar la morfología, anatomía, bioquímica y fisiología de las plantas (Kovalchuk, Molinier, Yao, Arkhipov & Kovalchuk, 2007). En plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), Ulukapi & Ozmen (2018) determinaron que la irradiación gamma a dosis bajas estimulaba tanto el peso fresco y seco del tallo y la raíz, mientras que al incrementar la dosis de irradiación disminuye considerablemente el porcentaje de germinación, lo que podría ser el resultado en una reducción en la cantidad de reguladores de crecimiento interno.

### Análisis ISSR-PCR de agaves irradiados

La diversidad genética de las líneas clonales de agaves irradiados en una primera y segunda ronda de exposición fue evaluada con los marcadores ISSR. Se generaron un promedio de 28 fragmentos por oligonucleótido, con un porcentaje de polimorfismo del 96%. El tamaño de los productos amplificados se presentó en un intervalo de 200 pb a 2000 pb (datos no mostrados). Con el resultado anterior, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) basado en los ISSR. La figura 1 muestra que las líneas irradiadas se separaron en tres grupos representativos y dos de ellos con mayor diversidad: *Rhus* sp. (control externo)

y M<sub>1</sub>-25 Gy. El primer grupo estuvo conformado por aquellas plántulas que recibieron las dosis de M<sub>1</sub>-10 Gy, M<sub>2</sub>-20-20 Gy y M<sub>2</sub>-20-25 Gy; el segundo agrupa las plántulas que recibieron las dosis de M<sub>2</sub>-10-10 Gy, M<sub>2</sub>-10-25 Gy, M<sub>2</sub>-20-10 Gy y M<sub>2</sub>-20-15 Gy; y el tercer grupo estuvo conformado por las dosis M<sub>1</sub>-20 Gy, M<sub>2</sub>-10-15 Gy y M<sub>2</sub>-10-20 Gy. El porcentaje de polimorfismo indicó que las dosis de radiación ionizante recibida por el tejido en cada tratamiento indujo mutaciones; esto explica el 72.1% de la varianza en el ACP, lo cual indica que las diferentes dosis de radiación ionizante recibida por el tejido en cada tratamiento indujo mutaciones.

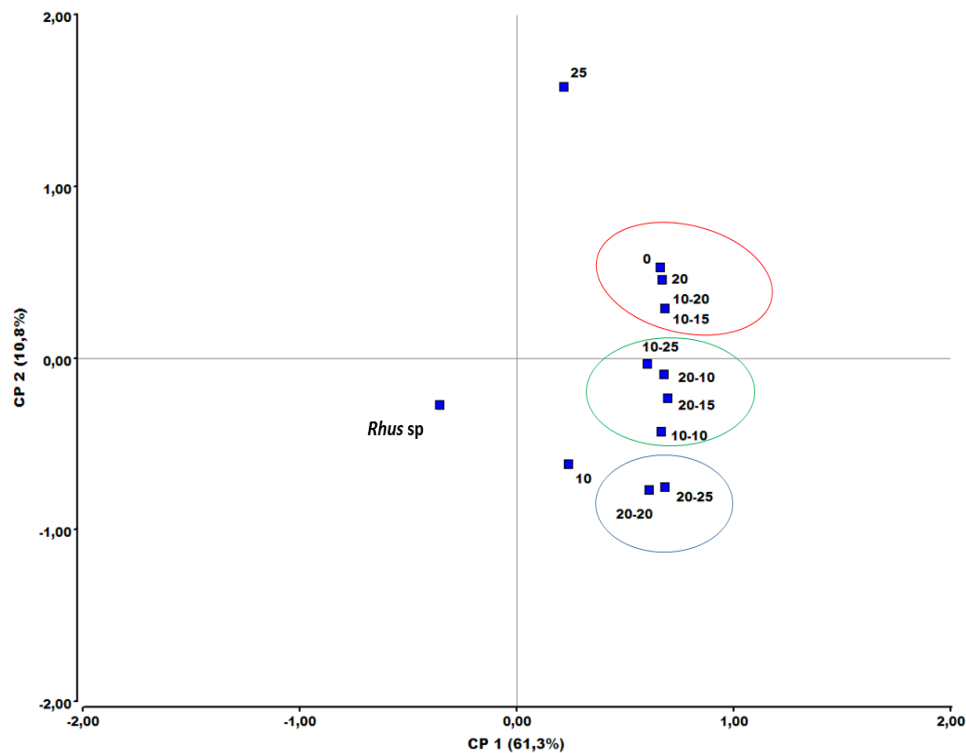


Figura 1. Análisis de componentes principales (ACP) derivado de tres oligonucleótidos ISSR en poblaciones de *A. tequilana* irradiadas con rayos gamma de Co<sup>60</sup> a diferentes dosis. Los números indican la dosis en Grey (Gy) simple y doblemente irradiadas.  
 Fuente: Elaboración propia.

Se ha reportado que la tasa de variabilidad genética de agave establecido en campo es baja. Gil-Vega *et al.* (2001) reportaron estudios que demuestran que entre 40 selecciones de *Agave tequilana* var. Azul hechas en campo, 1 de 124 individuos (0.8 %) fue polimórfico y 39 de 40 fueron completamente isogénicos; siendo uno de los niveles de polimorfismo más bajos detectado en un cultivo. En las especies de reproducción asexual y de ciclo de vida muy largo (como el agave), la inducción de mutaciones mediante la exposición de tejido somático a irradiación ionizante a bajas dosis ocasiona cambios en el DNA de las células como una posible fuente significativa para la obtención de variabilidad genética (Robles, 1986). El conocimiento del nivel de variabilidad genética obtenida por las mutaciones inducidas coadyuva a la definición de estrategias para la selección de individuos élite en el establecimiento de plantaciones, como los resultados obtenidos por Sen & Alikamanoglu (2012) en el que obtuvieron hijuelos de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) tolerantes a sequía en cultivo de tejidos mediante la inducción de mutantes con dosis de 15 Gy y 20 Gy de rayos gamma. La utilización de marcadores ISSR y PAGE en los hijuelos de remolacha mostraron las distancias genéticas entre las plantas mutantes y plantas control en estado temprano de desarrollo, demostrando el potencial de este tipo de análisis.

## Efectos de la irradiación con $Co^{60}$ en la acumulación de carbohidratos

A pesar de que existen trabajos en los que someten diversos cultivos a la inducción de mutaciones por rayos gamma, en ellos solo se reporta la dosis letal ( $DL_{50}$ ), incremento en la tasa de germinación y cambios en la morfología de las plantas (Ángeles-Espino *et al.*, 2013; González & Nakayama, 2015; Harding, Johnson, Taylor, Dixon & Turay, 2012). Los resultados encontrados en este estudio muestran que las mutaciones también tienen efecto en la acumulación de monosacáridos y disacáridos como glucosa, fructosa y sacarosa. El análisis por HPLC de los carbohidratos de tallo en las diferentes líneas (figura 2) demuestra que plántulas sometidas al tratamiento con  $M_2-20-20$  Gy presentaron el mayor contenido de glucosa, seguido de  $M_1-25$  Gy y de la dosis  $M_2-20-10$  Gy, superando al tratamiento control en 107%, 84% y 57%, respectivamente (tabla 1 y figura 1). Las dosis de radiación simple aplicadas mostraron una correlación positiva para la concentración de fructosa y sacarosa con una  $r^2$  de 0.70 y 0.72, respectivamente, siendo irregular para las dobles irradiadas, ya que no se observó una tendencia definida, debido a que en unas dosis el contenido de estos carbohidratos se incrementó y en otras disminuyó. Esto explica, por una parte, la significancia estadística de la interacción entre las generaciones mutantes y las dosis de radiación, así como la aleatoriedad de las mutaciones y, por otra parte, que estas no siguen un patrón establecido, produciendo cambios positivos o negativos de acuerdo al genotipo que recibe la radiación ionizante (Fuchs, González, Castroni, Díaz & Castro, 2002). Este comportamiento sugiere que en los tratamientos evaluados se indujeron cambios en el DNA que de manera aleatoria afectaron la vía metabólica de síntesis y degradación de los carbohidratos.

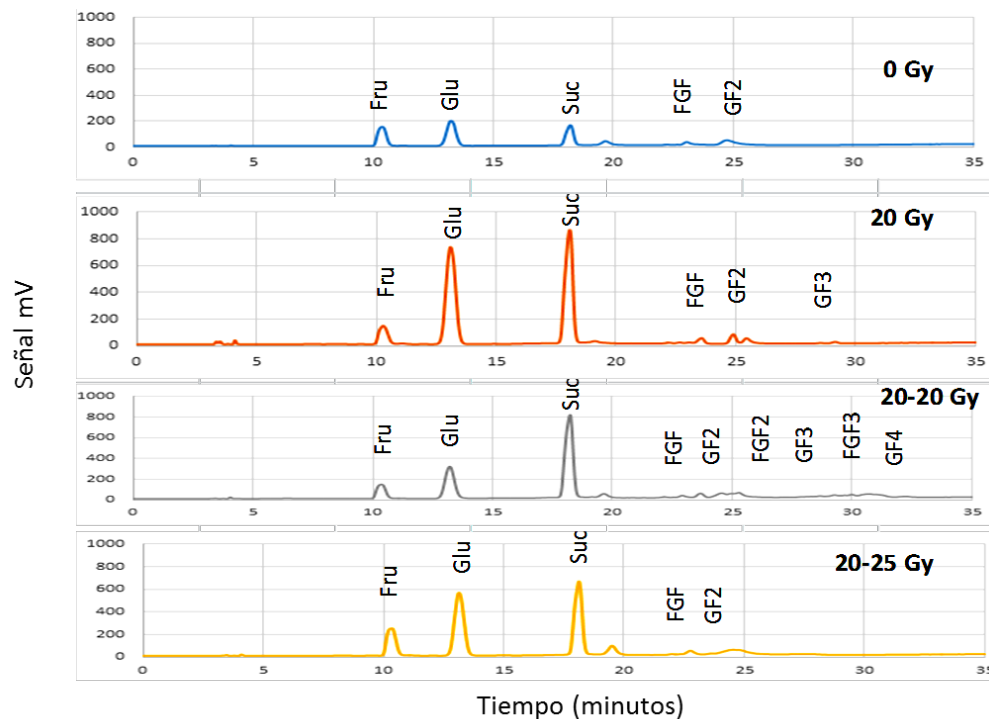


Figura 2. Perfil cromatográfico por HPLC de carbohidratos encontrados en tallos de *Agave tequilana* control (0 Gy) y las mutantes 20 Gy, 20-20 Gy y 20-25 Gy. Fructosa (Fru), Glucosa (Glu), Sacarosa (Suc), neoKestosa (FGF), 1-Kestosa (GF2), Nistosa (GF3).

Fuente: Elaboración propia.



**Tabla 1.** Valores promedio en el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en tallos de plántulas mutantes de *Agave tequilana* inducidas por irradiadas con radiación gamma de Co<sup>60</sup> a diferentes dosis.

Generación	Dosis Co <sup>60</sup> (Gy)	Glucosa		Fructosa		Sacarosa	
		mg/mL	% <sup>§</sup>	mg/mL	% <sup>§</sup>	mg/mL	% <sup>§</sup>
(Control)	0	311.3 <sup>de*</sup>	100	230.3 <sup>cd</sup>	100	222.6 <sup>bc</sup>	100
M <sub>1</sub>	10	320.7 <sup>de</sup>	103	261.3 <sup>cd</sup>	113	168.7 <sup>dc</sup>	76
M <sub>1</sub>	15	268.6 <sup>de</sup>	86	272.0 <sup>cd</sup>	118	191.6 <sup>cd</sup>	86
M <sub>1</sub>	20	246.6 <sup>de</sup>	79	278.0 <sup>cd</sup>	121	390.3 <sup>ab</sup>	175
M <sub>1</sub>	25	572.3 <sup>ab</sup>	184	372.6 <sup>b</sup>	162	337.3 <sup>ab</sup>	151
M <sub>2</sub> -10	10-10	286.6 <sup>de</sup>	92	226.6 <sup>cd</sup>	98	298.6 <sup>ab</sup>	134
M <sub>2</sub> -10	10-15	296.0 <sup>de</sup>	95	298.0 <sup>bc</sup>	129	219.0 <sup>bc</sup>	98
M <sub>2</sub> -10	10-20	216.3 <sup>de</sup>	69	204.6 <sup>de</sup>	89	194.6 <sup>cd</sup>	87
M <sub>2</sub> -10	10-25	363.0 <sup>cd</sup>	117	300.3 <sup>bc</sup>	130	308.6 <sup>bc</sup>	139
M <sub>2</sub> -20	20-10	490.3 <sup>bc</sup>	157	325.6 <sup>bc</sup>	141	316.0 <sup>ab</sup>	142
M <sub>2</sub> -20	20-15	280.0 <sup>de</sup>	90	275.6 <sup>cd</sup>	120	273.6 <sup>bc</sup>	123
M <sub>2</sub> -20	20-20	645.6 <sup>a</sup>	207	542.6 <sup>a</sup>	236	417.0 <sup>a</sup>	187
M <sub>2</sub> -20	20-25	435.0 <sup>cd</sup>	140	368.0 <sup>b</sup>	160	294.0 <sup>ab</sup>	132

\*Tratamientos con misma letra no difieren estadísticamente por Tukey a  $p \leq 0.05$ .

<sup>§</sup> Porcentaje de azúcares con relación al tratamiento control sin irradiar = 100%.

Fuente: Elaboración propia.

Así mismo los resultados mostraron que las dosis de radiación aplicadas indujeron mutaciones en las plantas *in vitro* de *Agave tequilana* que afectaron la acumulación de los fructooligosacáridos en los tallos de las generaciones mutantes evaluadas. Al realizar el análisis por HPTLC, se observó que la concentración de glucosa disminuyó en las dosis de 10 Gy, 15 Gy y 20 Gy en plántulas correspondientes a las generaciones M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>-10, aumentando a los 25 Gy, alcanzando en la M<sub>1</sub> un incremento significativo y estadísticamente igual a la dosis M<sub>2</sub>-20-20 (figura 3), mientras que esta generación tuvo un incremento en la concentración de fructosa, diferenciándose estadísticamente del resto de las dosis evaluadas. Por otra parte, en la generación M<sub>1</sub> el incremento no fue significativo respecto al tratamiento control en las dosis de 10 Gy, 15 Gy y 20 Gy; y para la generación M<sub>2</sub>-10 Gy no hubo diferencia estadística en las dosis de radiación y el testigo. En la concentración de sacarosa se presentó un comportamiento similar en las dosis de 20 Gy en las generaciones M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>-20. En general se observó que las plantas de *Agave tequilana* irradiadas a 20 Gy y posteriormente sometidas a una segunda dosis de 10 Gy a 25 Gy fueron las más sobresalientes al acumular en un intervalo aproximado de una a dos veces más glucosa, 1.4 a 2.6 veces más fructosa y 1.4 a 1.9 veces más sacarosa, lo cual se aprecia en el perfil de separación por HPTLC, coincidente con los valores de la tabla 1. No se descarta el incremento en alguna invertasa, de la actividad de la sacarosa sintasa, incluso una fructanohidrolasa para justificar el incremento en estos carbohidratos, por lo que se requieren futuros estudios detallados en las diferentes actividades enzimáticas en el metabolismo de los carbohidratos para estas mutantes. La síntesis de fructanos comienza con las enzimas fructosiltransferasas (FT). La enzima sacarasa: sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST) transfiere una unidad de fructosa de una molécula de sacarosa a otra, sintetizando la 1-kestosa (DP<sub>3</sub>: G-F-F). Posteriormente, la fructano:fructano 1-fructosiltransferasa (1-FFT) es capaz de incorporar una fructosa para incrementar el grado de polimerización. Enseguida, la enzima fructano:fructano 6G-fructosiltransferasa (6G-FFT) es la enzima clave para la síntesis de la neoserie de fructanos produciendo neokestosa (DP<sub>3</sub>: F-G-F), característica de las agavinas y que se observan claramente en la separación de FOS mediante HPLTC de la doble mutante M<sub>2</sub>-20-20 (figura 4), lo que sugiere una elevada actividad de las enzimas FT, siendo esto altamente deseable para la industria. La línea clonal doblemente irradiada con 20 Gy (M<sub>2</sub> 20-20) fue el único lote de plantas que presentó una acumulación sobresaliente de FOS, además de mayor contenido de glucosa, fructosa y sacarosa (figura 4), observando los isómeros de la neoserie en los grados de polimerización GP: 3, 4 y 5 previamente identificados por nuestro grupo de trabajo para *Agave tequilana* (Suárez-González *et al.*, 2016).



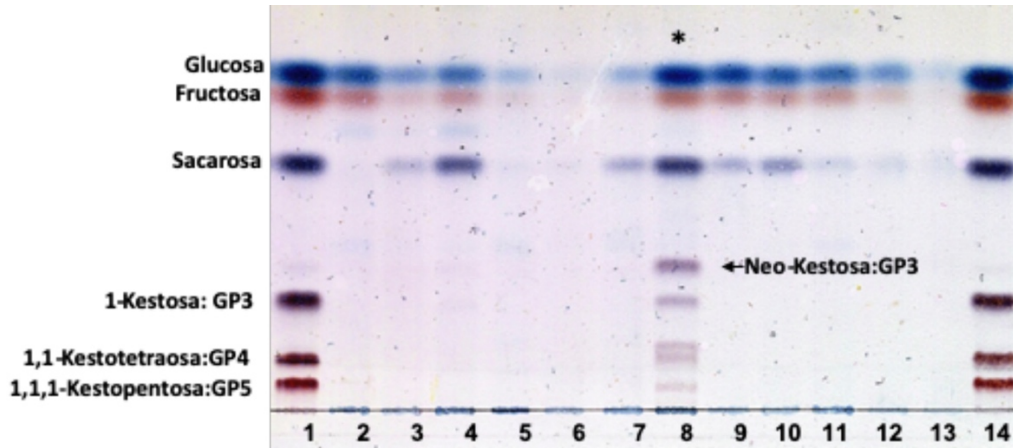


Figura 3. Separación de carbohidratos mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) de las diferentes líneas clonales M20 de *Agave tequilana* sometidas a segunda ronda de radiación de rayos gamma de  $Co^{60}$  a diferentes dosis. Carriles 1 y 14, estándares; 2, control planta sin irradiar; 3 y 4, 20-10 Gy; 5, 6 y 7, 20-15 Gy; 8, 9 y 10, 20-20 Gy; 11, 12 y 13, 20-25 Gy. \*Línea clonal doble mutante 20-20 Gy, altamente acumuladora de fructooligosacáridos.

Fuente: Elaboración propia.

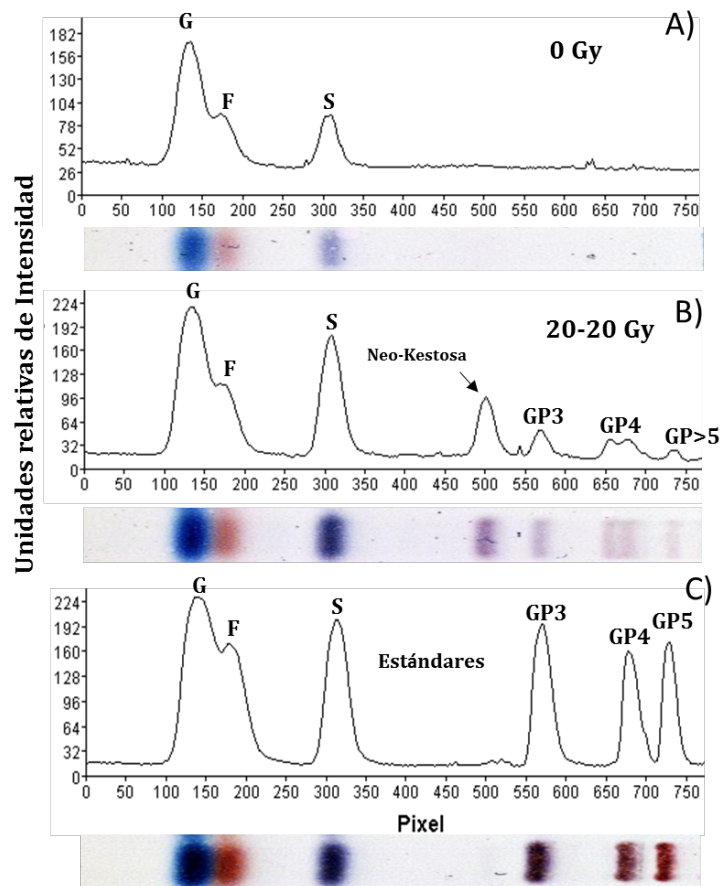


Figura 4. Análisis del perfil de carbohidratos en tallo de *Agave tequilana*, a partir de la separación mediante HPTLC. A) control sin irradiar (0 Gy). B) doble mutante (M<sub>2</sub> 20-20 Gy). C) Mezcla de estándares: Glucosa (G), Fructosa (F), Sacarosa (S), 1-Kestosa (GP3), 1,1-Kestotetraosa (GP4) y 1,1,1-Kestopentosa (GP5).

Fuente: Elaboración propia.

## Conclusiones

La inducción de mutantes mediante la aplicación de dosis bajas de rayos gamma Co<sup>60</sup> en plantas *in vitro* de *Agave tequilana* representa una alternativa viable para inducir variabilidad genética y estimular la síntesis de fructooligosacáridos. Los estudios realizados en este trabajo permitieron la identificación de mutantes empleando marcadores moleculares ISSR y su relación con el perfil de fructooligosacáridos. El fenómeno de doble irradiación originó mutaciones que incrementaron la acumulación de glucosa, fructosa y sacarosa, considerando la doble irradiación a 20-20 Gy como óptima para incrementar la acumulación de carbohidratos. El presente trabajo aporta por primera vez un modelo prometedor para el estudio del metabolismo de carbohidratos en *Agave tequilana* y la posibilidad de establecer cultivares élite para plantaciones comerciales.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada al Dr. Alejandro Ángeles-Espino para su estancia posdoctoral en el ITT. Proyecto apoyado por TecNM: 6199.17-P.

## Referencias

- Ahloowalia, B. S., & Maluszynski, M. (2001). Induced mutations - A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, 118(2), 167-173. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1004162323428>.
- Ángeles-Espino, A., Valencia-Botín, A. J., Virgen-Calleros, G., Ramírez-Serrano, C., Paredes-Gutiérrez, L., & Hurtado-De la Peña, S. (2013). Determinación de la dosis letal (DL<sub>50</sub>) con Co<sup>60</sup> en vitroplántulas de *Agave tequilana* var. Azul. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(4), 381-386.
- Ángeles-Espino, A., Sánchez-Mendoza, L., Dimas-Estrada, H. E., Ramírez-Alvarado, D., & Gómez-Leyva, J. (2018). Two auxins evaluation in the embryogenic callus induction in vitro plantlets of *Agave Tequiliana* Weber cultivar blue. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 21(2), 225–234.
- Banguela, A., & Hernández, L. (2006). Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Bioteconología Aplicada*, 23, 202-210.
- Consejo Regulador del Tequila (2017). *Reporte Anual 2016*. Comité Técnico Agronómico. Recuperado el 1 octubre 2019 de <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1989). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1), 13-15.
- Esnault, M. A., Legue, F., & Chenal, C. (2010). Ionizing radiation: Advances in plant response. *Environmental and Experimental Botany*, 68(3), 231–237. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.01.007>
- Fuchs, M., González, V., Castroni, S., Díaz, E., & Castro, L. (2002). Efecto de la radiación gamma sobre la diferenciación de plantas de caña de azúcar a partir de callos. *Agronomía Tropical*, 52(3), 311-323.
- García-Mendoza, A. J. (2004). Agavaceas. In: A. J. García-Mendoza, M. J. Ordóñez, & M. Briones-Salas (Eds.), *Biodiversidad de Oaxaca* (pp. 159-169). México: Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la conservación de la naturaleza-Wold Wildlife Fund.
- García-Mendoza, A. J. (2011). Agavaceae. En R. Medina Lemos (Ed.), *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán* (Fascículo 88) (p.95). México: Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto de Biología.
- Gil-Vega, K., González-Chavira, M., Martínez-de la Vega, O., Simpson, J., & Vandemark, G. (2001). Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica*, 119(3), 335–341. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1017553107303>

- González, G., Alemán, S., Garriga, M., Ortiz, R., & de la Fe, C. (2007). Radiosensitivity to gamma rays (<sup>60</sup>Co) in shoot tips of henequen. *Biotecnología Vegetal*, 7(2), 115-117.
- González, M. C., & Nakayama, H. D. (2015). Radioestimulación de la germinación en *Stevia rebaudiana* cultivar KH-IAN VC-142 (Eireté), mediante el empleo de rayos gamma <sup>60</sup>CO. *Cultivos Tropicales*, 36(4), 117-119.
- Harding, S. S., Johnson, S. D., Taylor, D. R., Dixon C. A., & Turay, M. Y. (2012). Effect of gamma rays on seed germination, seedling height, survival percentage and tiller production in some rice varieties cultivated in Sierra Leone. *American Journal of Experimental Agriculture*, 2(2), 247-255. doi: <https://doi/10.9734/AJEA/2012/820>
- Kovalchuk I., Molinier, J., Yao, Y., Arkhipov, A., & Kovalchuk, O. (2007). Transcriptome analysis reveals fundamental differences in plant response to acute and chronic exposure to ionizing radiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 624(1-2), 101–113. doi: <https://doi/10.1016/j.mrfmmm.2007.04.009>
- López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., & Mendoza-Díaz, G. (2003). Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7835-7840. doi: <https://doi/10.1021/jf030383v>
- Mancilla-Margalli, N. A., & López, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliirion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7832-7839. doi: <https://doi/10.1021/jf060354v>
- Montañez-Soto, J., Venegas-González, J., Vivar-Vera, M., & Ramos-Ramírez, E. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del *Agave tequilana* Weber azul. *Bioagro*, 23(3), 199-206.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Pérez, H. E., Chávez P. M. del C., & González H., J. C. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología* 18, 148-164.
- Pimienta-Barrios, E., Zañudo-Hernández, J., Nobel, P. S., & García-Galindo, J. (2007). Ecofisiología del agave azul (*Agave tequilana* Weber). En: P. Colunga-GarcíaMarín, L. Eguiarte., A. Larqué & D. Zizumbo-Villarreal (Eds.). *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves* (pp. 67-82). Mérida, Yucatán, México: Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- Robles, S. R. (1986). *Genética elemental y fitomejoramiento práctico*. México: Editorial Limusa
- Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A., & Acosta-Dueñas, B. (1996). Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46, 85-87. doi: <https://doi/10.1007/BF00039700>
- Sen, A., & Alikamanoglu, S. (2012). Analysis of drought-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) mutants induced with gamma radiation using SDS-PAGE and ISSR markers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 738-739, 38–44. doi: <https://doi/10.1016/j.mrfmmm.2012.08.003>
- Suárez-González, E. M., Palmeros-Suárez, P. A., Cruz-Rubio, J. M., Martínez-Gallardo, N. A., Cisneros-Hernández, I., Délano-Frier, J. P., & Gómez-Leyva, J. F. (2016). Differential fructan accumulation and expression of fructan biosynthesis, invertase and defense genes is induced in *Agave tequilana* plantlets by sucrose or stress-related elicitors. *Agri Gene*, 2, 17-28. doi: <https://doi/10.1016/j.aggene.2016.09.003>
- Statpoint Technologies (2009). *STATGRAPHICS® Centurion XVI User Manual*. Warrenton, VA, USA: Statpoint Technologies.
- Tiessen, A. (2012). *Fundamentos de mejoramiento genético vegetal*. España: Editorial Academia Española
- Ulukapi, K., & Ozmen, S. F. (2018). Study of the effect of irradiation (<sup>60</sup>Co) on M<sub>1</sub> plants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars and determined of proper doses for mutation breeding. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 11(2), 157-161. doi: <https://doi/10.1016/j.jrras.2017.12.004>