

Análisis electrofisiológico del *Agave angustifolia* Haw

C. F. Varapizuela-Sánchez¹, A. D. Pérez-Santiago¹, M. A. Sánchez-Medina¹, C. López-León^{*1}

¹Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Oaxaca Av. Víctor Bravo Ahuja No. 125, Esq. Calz. Tecnológico de Oaxaca, Oaxaca Oax, México. CP 68030.

[*phdslopez@gmail.com](mailto:phdslopez@gmail.com)

Área de participación: Ingeniería Química

Resumen

La electrofisiología de las plantas estudia los fenómenos electroquímicos asociados a los estímulos recibidos en las plantas por su medio. Esto incluye mediciones electroquímicas tanto de corriente y potencial como respuesta a cambios en su medio, como por ejemplo: contaminantes, fertilizantes, humedad en el ambiente y cambios de temperatura. El objetivo de este estudio fue establecer una técnica confiable que permita detectar las diferentes señales generadas por los agaves ante este tipo de estímulos. Se utilizaron electrodos de Ag, Au, y Pt, y se analizaron en total 6 plantas al azar de una población de 50 provenientes de la región valle del estado Oaxaca. En los resultados se encontró que el sistema proporcionaba resultados más confiables al utilizar dos electrodos de Pt y uno de Ag después de 15 min de estabilización. Estos resultados proporcionan pruebas para un estudio más amplio de la electrofisiología del *Agave angustifolia* Haw.

Palabras clave: *Agave angustifolia* Haw, electrofisiología, electroquímica.

Abstract

*The electrophysiology of plants studies the electrochemical phenomena associated with the stimuli received in plants by their means. This includes electrochemical measurements of both current and potential and response to changes in their environment, such as: pollutants, fertilizers, humidity in the environment and changes in temperature. The objective of this study is to establish a reliable technique that allows us to detect the different signals generated by the agaves before this type of stimuli. A total of 6 plants were analyzed from a population of 50 from the valley region of the state of Oaxaca and collected in the year 2018. Results in the different agaves used showed that when using different electrodes of Ag, Au, and Pt, the system showed more reliable results when a system comprised mainly of two electrodes of Pt and one of Ag after 15 minutes of stabilization of the system was used principally. These results open the door to a broader study of the electrophysiology of *Agave angustifolia* Haw.*

Key words: *Agave angustifolia* Haw, electrophysiology, electrochemistry.

Introducción

Una parte fundamental de los organismos está relacionada con la continua acumulación de la información del medio en el que se encuentran y dependiendo de ella, optimizarán los recursos con el fin de mejorar sus procesos para mostrar un buen desempeño de sus acciones dentro de estos nuevos medios [1]. En este contexto, las plantas son excitadas por el medio que las rodea, generando señales eléctricas que pueden ser detectadas (semejantes a las del sistema nervioso en el cuerpo humano) [2]. Estudiando el tipo de intensidad de las señales eléctricas que se llevan a cabo en las células de las plantas es posible determinar los efectos que tiene el medio sobre ellas (estrés por falta de agua, déficit de irrigación, ciclos de luz y daños en su estructura, etc.) [3, 4].

El agave es una planta perenne conocida comúnmente como maguey, posee hojas alargadas y suculentas dispuestas en espiral sobre un tallo corto, formando una roseta. México es el centro de origen y diversidad natural del género *Agave* y cuenta con 150 de las más de 200 especies que existen, distribuidas principalmente en ecosistemas áridos [5, 6]. Su importancia ecológica radica en el número de especies animales y vegetales con las cuales establece asociaciones y en su capacidad de retención de suelos [7, 8]. Uno de sus usos más conocidos y tradicionales es la obtención de bebidas alcohólicas y recientemente, su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales que contienen inulina y sus derivados por su alta concentración en este tipo de azúcares [9, 10, 11].

El estado de Oaxaca, una zona que se dedica en gran parte a la producción y comercialización internacional del mezcal debido a la calidad de sus agaves, tiene como reto actual el generar agaves de buena calidad. El principal reto existente a la fecha es el que establecer cultivos de este tipo de plantas en campo tiene poco éxito, haciendo que la mayoría de los agaves utilizados en la producción de mezcal sean de origen silvestre principalmente con

el impacto de una población mermada debido al sobre aprovechamiento de la misma. En consecuencia, las condiciones climáticas extremas de la región y las características biológicas propias de la especie generan un agave con características muy variadas dependiendo de la zona de donde son recolectados [12, 13, 14]. El presente estudio forma parte de un proyecto con el cuál se pretende mejorar la calidad y producción del *Agave angustifolia* Haw en cultivos en campo, llevando a cabo técnicas electrofisiológicas que garanticen la mejor calidad del agave posible, potencializando a futuro su comercialización y en consecuencia favorecer la tendencia de nuevos mercados internacionales.

Metodología

Agaves

Cincuenta agaves *Angustifolia* de 4 meses de edad fueron comprados en un vivero de la ciudad de Oaxaca. Se conservaron de forma individual en contenedores de 30 cm de diámetro en condiciones ambientes, con periodos de exposición a la luz y a la oscuridad de aproximadamente 12:12 horas, se regaron con agua de la red pública cada 4 días y sometidas a experimentación después de un periodo de adaptación de 1 mes en sus respectivos contenedores.

Electrodos

Todas las mediciones fueron realizadas en el laboratorio que se encontraba a 25 °C. Se utilizaron electrodos de Ag, Pt y Au, los cuales constaban de una punta de 0.5 cm de largo y 0.25 cm de diámetro. Los electrodos estaban embebidos en un cuerpo de vidrio con una conexión eléctrica de cobre en su interior, antes de su utilización fueron limpiados con etanol para eliminar las grasas que pudieran estar presentes, enjuagados con agua destilada y secados con un paño de papel. Los electrodos fueron insertados a una profundidad de 5 mm directamente en las hojas de los agaves.

Reactivos

Se utilizó agua destilada tanto para la limpieza de los electrodos como para su estimulación.

Registro de los datos

Se utilizó un equipo Potenciostato/Galvanostato (Orygalis, OGF500, Francia) para la detección de las lecturas electroquímicas. Los datos fueron almacenados por el software OrigaMaster 5 (compatible con Windows 10) y el graficado de las señales fue mediante la utilización del software Originlab 8.1 (2009). El estudio tuvo como primer paso la identificación de las partes de la hoja de la planta en los cuales los electrodos serían ubicados. Posteriormente los filtros y velocidad de muestreo del sistema. A continuación, el tiempo de estabilización del sistema. Ya con el sistema detector montado, el agave fue estimulado con agua destilada para determinar la sensibilidad del sistema ante este tipo de estímulos.

Resultados y discusión

Localización de los electrodos

El arreglo de los electrodos en el *Agave Angustifolia* se llevó a cabo inicialmente como se muestra en la Figura 1. Se introdujeron dos sensores (negros) en las hojas del agave a una distancia no mayor a un centímetro entre ellos para una mejor detección de las señales y disminución de la resistencia eléctrica del medio. El electrodo de pseudo - referencia (rojo) se localizó en la tierra que contiene al agave. Se decidió utilizar este arreglo ya que generalmente la literatura establece que este tipo de acomodo de los electrodos puede detectar la mayoría de los estímulos a los que se someten las plantas estudiadas.

Se probaron diferentes configuraciones (Cuadro 1). Cabe señalar que debido a la experiencia se utilizó el electrodo de Pt como referencia en todos los casos, ya que se obtienen señales de buena calidad, por lo mismo, se descartaron las configuraciones Au-Au, Ag-Ag y Au-Ag. Después de insertar los electrodos se dejó estabilizar el sistema por un lapso de 2 horas y se observó que al término de este lapso de tiempo, había una gran inestabilidad del sistema y una alta resistencia al paso de las señales eléctricas.

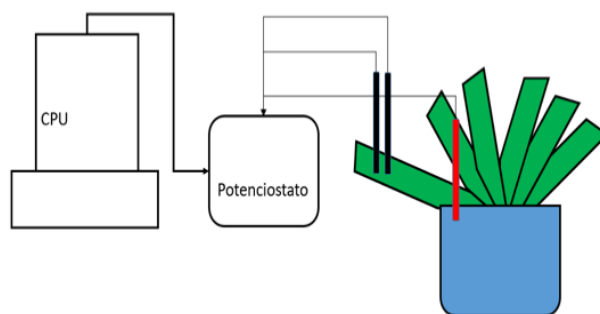


Figura 1. Conexión inicial de los electrodos en el agave *Angustifolia*.

Cuadro 1. Configuración de los electrodos para detección de las señales eléctricas en el agave.

Número de configuración	Par de electrodos detectores	Electrodo de pseudo referencia
1	Pt – Ag	Pt
2	Pt – Pt	Pt
3	Pt – Au	Pt

Después de múltiples intentos se decidió cambiar el electrodo de pseudo referencia y ponerlo cerca de los electrodos que se encontraban en la hoja del agave (Figura 2). Al hacer esta configuración se detectó que se disminuía la señal de resistencia del sistema y este se tornaba estable.

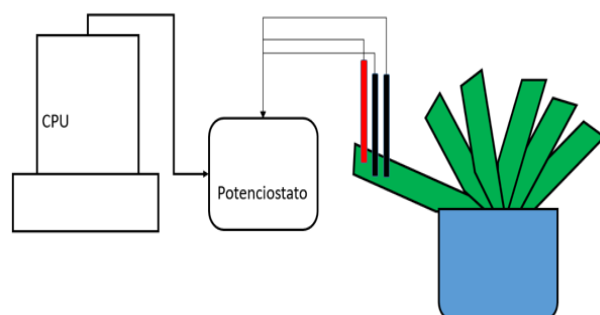


Figura 2. Arreglo de los electrodos definitivo para el estudio electrofisiológico del agave *Angustifolia*.

Filtros y velocidad de muestreo

Una vez que se consiguió tener buen contacto eléctrico, se estudió la velocidad de muestreo y filtro a utilizar para el tratamiento de datos. Al analizar los datos obtenidos con los diferentes filtros, se encontró que al utilizar filtros con tiempos de detección muy cortos, el sistema se volvía inestable y generaba señales de ruido únicamente (Cuadro 2). Al aumentar el paso del filtro fue posible detectar las señales generadas por estímulos tanto químicos (cambio de la atmósfera en la que se encuentra el agave) como mecánicos (daños a la estructura física del agave).

Cuadro 2. Respuesta de los filtros utilizados

FILTRO UTILIZADO	RESPUESTA
1 μ s	Ruido
10 μ s	Ruido
100 μ s	Ruido
1 ms	Ruido
10 ms	Ruido
100 ms	Señal
1 s	Señal

Una vez seleccionado el filtro a utilizar, se realizó la selección de la velocidad de muestreo. En esta parte se utilizaron 4 velocidades: 0.1, 0.3, 0.5 y 1.0 segundos. Al hacer el análisis de los resultados se observó que en sí no había una diferencia significativa en la velocidad de muestreo, ya que como se observó en la figura 3 hay una variación de 5 mV entre el máximo y mínimo de la señal sensada en todos los casos. Es necesario aclarar que en esta parte no se presentan los datos de 0.3 y 0.5 segundos por su similitud con los datos aquí presentados.

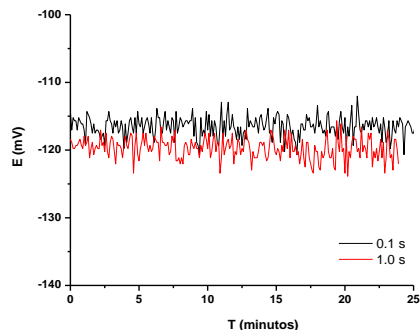


Figura 3. Lecturas de potencial con diferentes tiempos de muestreo.

Tiempo de estabilización y configuración del sistema sensor

Se determinó el tiempo en el que el agave regresa a su estado inicial sin estrés después de haber sido manipulado. Algunos autores han propuesto que es necesario esperar hasta dos horas para empezar a experimentar con las plantas. En consecuencia, se decidió empezar a censar el sistema desde el comienzo de la manipulación del agave para determinar su tiempo de estabilización. De igual manera se estudiaron diferentes configuraciones de pares de electrodos sensores para la determinación de cuál era la que podría detectar todos los cambios por estímulos efectuados en el agave (Cuadro 1).

En la Figura 4 se muestra el análisis de estabilización del medio utilizando tres configuraciones. En la configuración 1: a) la señal inicialmente se dirige a potenciales negativos; b) después de haber alcanzado un mínimo, este tiende a potenciales positivos para posteriormente c) estabilizarse. En este tipo de arreglo se puede argumentar que la estabilización del sistema se lleva a cabo después de 15 min de haber introducido los electrodos en las hojas del agave. Es necesario comentar en esta parte que este tipo de comportamiento de decaimiento de potencial y posteriormente incremento hasta estabilizarse está muy bien documentado en diferentes plantas a las cuales se les han efectuado estudios de este tipo [15]. Al utilizar la configuración 2, como se observa, no existe la parte de decaimiento de potencial (zona a de detección de señales "a") ni estabilización del sistema (zona a de detección de señales "c") como se ha observado previamente y como está reportado en la literatura [15]. Al llevar a cabo pruebas con la configuración número 3 sí se pueden observar estas etapas en el cambio de señales del sistema; pero todos estos cambios fueron detectados a una escala muy pequeña. En consecuencia, es necesario hacer un estudio extra de sensibilidad del sistema para determinar cuál es el más idóneo para llevar a cabo el estudio de detección de las señales del agave.

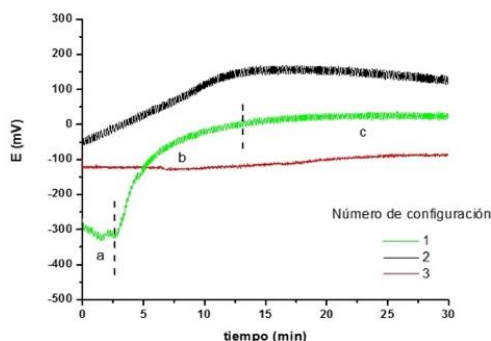


Figura 4. Tiempo de estabilización del agave después de haber sido manipulado. Utilizando electrodos de 1) Pt-Ag, 2) Pt-Pt y 3) Pt-Au como sensores, referidos a un pseudo electrodo de referencia de Pt.

Sensibilidad del sistema a cambios de humedad en la zona en la que se encuentran confinados. Todos estos análisis fueron llevados a cabo después de 30 min de haber insertado los electrodos en las hojas de los agaves. Los agaves utilizados en esta parte fueron regados por última vez tres días antes de llevar a cabo la experimentación. Los resultados en esta parte comprenden un análisis promedio de seis plantas analizadas. Los estímulos químicos fueron hechos añadiendo 100 mL de agua destilada en la tierra en la que se encontraba el agave. En total fueron tres estimulaciones consecutivas, cada una de ellas después de observar que el sistema había alcanzado su equilibrio:

a) Arreglo Pt-Ag. Al hacer el estudio con el arreglo de sensores número 1 (Pt-Ag), se observó que el potencial de estabilidad del sistema inicial era de -20 ± 10 mV. Al hacer las dos dosificaciones se observó de manera clara que el agave generaba señales de detección de humedad en el suelo en cada caso (Figura 5).

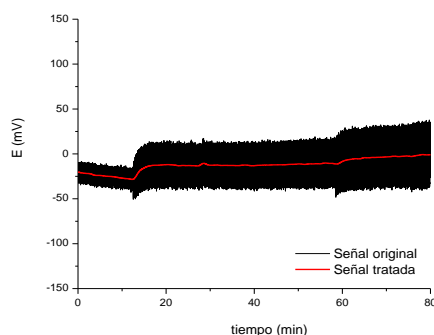


Figura 5. Respuesta del agave utilizando 100 mL de agua purificada. Sensores de Pt-Ag.

Al graficar la primera derivada de las señales generadas para determinar de una manera más clara los cambios en la señal obtenida, es posible observar los cambios de pendiente en cada caso al estimular la planta con agua (Figura 6). Aquí, las señales de agregar agua a las plantas generaron las 3 señales características obtenidas por una estimulación (parte 3 de resultados: Tiempo de estabilización y configuración del sistema sensor). El tiempo entre la detección y estabilización del sistema fue de aproximadamente 4 min, con un cambio de potencial de 15 ± 5 mV hacia potenciales más positivos. El tiempo entre agregar el agua y detectar el cambio en las señales fue de aproximadamente 1 minuto.

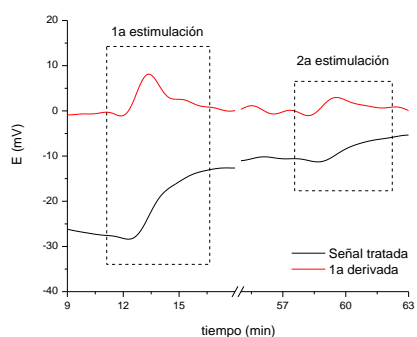


Figura 6. Respuesta tratada del agave utilizando 100 mL de agua purificada. Sensores de Pt-Ag.

b) Arreglo Pt-Pt. Al hacer el estudio con el arreglo de sensores número 2 (Pt-Pt), se observó que el sistema nunca alcanzó un potencial estable realmente ya que este continuaba disminuyendo conforme pasaba el tiempo. Al agregar agua a la tierra en la que se encontraba el agave, este generó una respuesta muy ligera que duró 25 min; al provocar una segunda señal no se supo realmente en que momento dejaba de generar la respuesta a la excitación (Figura 7).

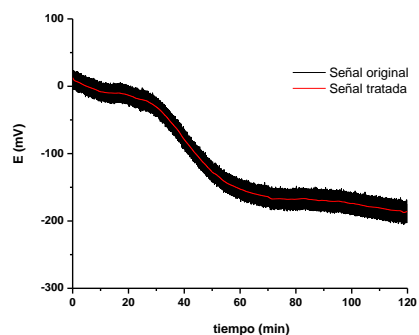


Figura 7. Respuesta del agave utilizando 100 mL de agua purificada. Sensores de Pt-Pt.

En el análisis de las señales generadas utilizando el principio de la primera derivada (Figura 8), al hacer la primera excitación a los primeros 15 min de haber comenzado el experimento, la señal de la primera derivada muestra efectivamente el inicio de la detección de la señal generada por el agua. A los 70 min se hizo la segunda excitación y el sistema volvió a detectar la señal de respuesta de la planta a la presencia del agua en su seno. Usando esta técnica de análisis es posible determinar hasta cierto punto el inicio de la detección de las señales generadas por el agua; su desventaja radica en el hecho que utilizando este arreglo de electrodos sensores las señales generadas son de muy baja intensidad y pueden ser confundidas fácilmente con el ruido de la señal original.

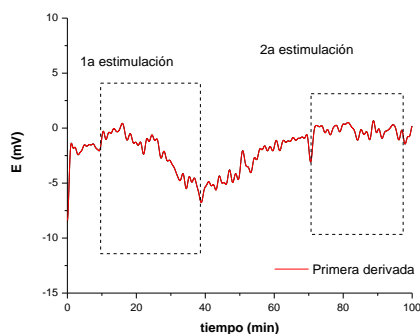


Figura 8. Respuesta tratada del agave utilizando 100 mL de agua purificada. Sensores de Pt-Pt.

c) Arreglo Pt-Au. El arreglo de electrodos sensores número 3 (Pt-Au) aunque parecía haber alcanzado la estabilidad del medio relativamente rápido, en realidad era un arreglo que casi no detectaba los cambios en el medio estudiado ya que como se puede ver en la Figura 9, entre las señales detectadas y el ruido del medio no existe una diferencia significativa entre ellas. Al hacer el análisis de la primera derivada a estos datos (Figura 10), se corrobora nuevamente lo encontrado previamente con los datos sin analizar, las estimulaciones no logran ser detectadas eficientemente por este arreglo de electrodos por la incapacidad de los mismos a sensar los más ligeros cambios en el medio.

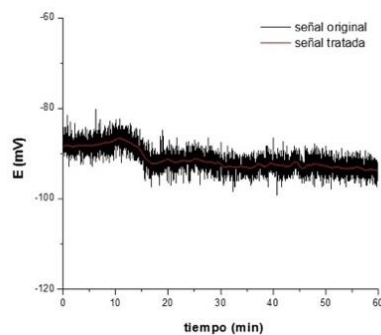


Figura 9. Respuesta del agave utilizando 100 mL de agua purificada. Sensores de Pt-Au.

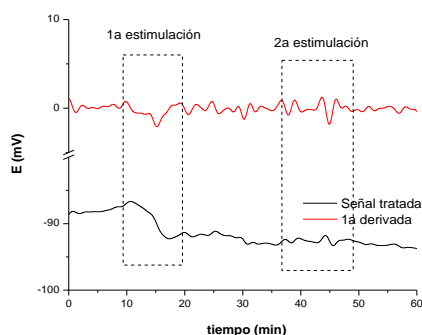


Figura 10. Respuesta tratada del agave utilizando 100 mL de agua purificada. Sensores de Pt-Au.

Conclusiones

Ha sido posible generar el protocolo de detección de señales en el *Agave angustifolia* de donde la configuración de electrodos sensores que se ajustan mejor para el proyecto es la de Pt-Ag, con un pseudo electrodo de referencia de Pt. Los electrodos deben de estar cercanos entre sí para una mejor detección de todas las señales eléctricas presentes en el agave y eliminación del ruido presente en las señales sensadas. También se determinó que los datos podían ser obtenidos a partir de 15 min de manipulación de las plantas. Es necesario remarcar que estos resultados preliminares abren la puerta a pruebas donde diferentes estímulos serán aplicados a l.

Referencias

- [1] A. G. Volkov, *Plant Electrophysiology*. 1a. Ed. New York: Springer Heidelberg New York Dordrecht London, 2012.
- [2] J. Fromm and S. Lautner, "Electrical signals and their physiological significance in plants", *Plant, Cell and Environment*, no. 30, pp. 249–257, December 2006.
- [3] V. S. Markin, A. G. Volkov and E. Jovanov, "Historical Overview on Plant Neurobiology", *Plant signaling & Behavior*, vol. 1, no. 1, pp. 6-8, 2006.
- [4] J. Chaparro, "Instrumentación en electrofisiología celular vegetal", *Actividad eléctrica en plantas*, 2001.
- [5] L. Núñez and V. Salazar, "La producción y comercialización de bacanora como estrategia de desarrollo regional en la sierra sonorense", *Estud. Soc.*, vol. 17, pp. 205-219, noviembre 2009.
- [6] A. Delgado-Lemus, A. Casas and O. Téllez, "Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorum* in the Tehuacán Valley, Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products", *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, vol. 10, no. 63, September 2014.
- [7] E.J. García-Herrera, S. de J. Méndez-Gallegos. and D. Talavera-Magaña, "El género *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica", *Revista salud pública y nutrición*, no. 5, pp. 109-129, 2010.
- [8] A. García, "Distribution of the genus *Agave* (*Agavaceae*) and its endemic species in Mexico", *Cactus and Succulent Journal*, no. 74, pp. 177-187, 2002.
- [9] A. J. García, "Los agaves de México", *Ciencias*, no. 87, pp. 14-23, 2007.
- [10] L. A. Espinosa. "Generalidades e importancia de los agaves en México", *Herbario CICY*, no. 7, pp- 161-164, Octubre 2015.
- [11] E. Pérez, M. C. Chávez and C. González, "Revisión del agave y el mezcal", *Rev. Colomb. Biotecnol*, vol. 18, no.1, pp. 148-164, 2016.
- [12] D. Aguirre and L. Eguiarte, "Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico", *Journal of Arid Environments*, vol. 90, pp. 36-44, March 2013.
- [13] M. Cházaro, O. Valencia and M. Hernández, "Agaves silvestres usados en la elaboración de bebidas alcohólicas. Agaves del Occidente de México. Guadalajara, México" *CUCBA-CUCSH*, pp. 123-126, 2007.
- [14] G. Hernández, M. Cházaro and E. Flores, "Inventario, distribución y hábitat del género *Agave* en Jalisco, Agaves del Occidente de México. Guadalajara, México", *CUCBA-CUCSH*, pp. 6-12, 2007.
- [15] A. G. Volkov, "Signaling in electrical networks of the Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis)", *Bioelectrochemistry*, vol. 125, pp. 25-32, February 2019.