

RESPUESTA MORFOGENÉTICA DE *Agave angustifolia* AL GRADIENTE AUXINA-CITOCININA DURANTE EL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS INDIRECTOS

MORPHOGENETIC RESPONSE OF *Agave angustifolia* TO THE AUXIN- CYTOKININ GRADIENT DURING THE DEVELOPMENT OF INDIRECT SOMATIC EMBRYOS

Reyes-Díaz, J.I., R.M. Nava-Becerril, A.M. Arzate-Fernández

RESPUESTA MORFOGENÉTICA DE *Agave angustifolia* AL GRADIENTE AUXINA-CITOCININA DURANTE EL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS INDIRECTOS

MORPHOGENETIC RESPONSE OF *Agave angustifolia* TO THE AUXIN-CYTOKININ GRADIENT DURING THE DEVELOPMENT OF INDIRECT SOMATIC EMBRYOS



Respuesta morfo genética de *Agave angustifolia* al gradiente auxina-citocinina durante el desarrollo de embriones somáticos indirectos

Morphogenetic response of *Agave angustifolia* to the auxin-cytokinin gradient during the development of indirect somatic embryos

Jesús-Ignacio Reyes-Díaz, Rosa María Nava-Becerril, Amaury-Martín Arzate-Fernández

RESPUESTA MORFOGENÉTICA DE *Agave angustifolia* AL GRADIENTE AUXINA-CITOCININA DURANTE EL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS INDIRECTOS

MORPHOGENETIC RESPONSE OF *Agave angustifolia* TO THE AUXIN-CYTOKININ GRADIENT DURING THE DEVELOPMENT OF INDIRECT SOMATIC EMBRYOS

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 61: 311-327. Enero 2026

DOI:

10.18387/polibotanica.61.18

Jesús Ignacio Reyes-Díaz

<https://orcid.org/0000-0001-9234-6575>

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México. Unidad Académica de Capulhuac, Universidad Tecnológica del Valle de Toluca, Capulhuac de Mirafuentes, México

Rosa María Nava-Becerril

Amaury Martín Arzate-Fernández / amaury1963@yahoo.com.mx ✉

<https://orcid.org/0000-0001-8603-0099>

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado México (UAEMéx), Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 11.5, 50200, Toluca, México

RESUMEN: *Agave angustifolia* Haw. es una especie de alto valor para la agroindustria mezcalera mexicana. Sin embargo, la creciente demanda contrasta con la escasez de germoplasma de calidad y la baja eficiencia de los métodos de propagación convencionales. En este contexto, la embriogénesis somática se presenta como una estrategia biotecnológica prometedora para la regeneración masiva de plantas élite en condiciones controladas. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de tres auxinas (2,4-diclorofenoxiacético [2,4-D], ácido indolacético [AIA] y ácido naftalenacético [ANA]) combinadas con N⁶-benciladenina (BA) sobre la inducción de embriogénesis somática en *A. angustifolia*, a partir de ejes embrionarios cigóticos. Se aplicó un diseño experimental completamente al azar para evaluar 27 combinaciones hormonales, derivadas de la interacción factorial de tres concentraciones de auxinas (13.57, 18.10 y 22.62 μM de 2,4-D; 17.13, 22.83 y 28.54 μM de AIA; 16.11, 21.48 y 26.85 μM de ANA) y tres de BA (4.44, 8.88 y 13.32 μM). Se utilizó como medio basal para inducir las masas proembriogénicas el MS al 25 % con 60 g L⁻¹ de sacarosa y vitaminas L2, cada eje embrionario cigótico se consideró como una unidad experimental. A los 60 días de cultivo, los callos obtenidos fueron transferidos a un medio MS de histodiferenciación con 0.45 μM de 2,4-D, 0.57 μM de AIA o 0.54 μM de ANA, según correspondiera, y sin BA. Todos los cultivos se mantuvieron en oscuridad por 30-60 días adicionales para favorecer la diferenciación embrionaria. Las combinaciones con 2,4-D + BA indujeron formación de callo en un 71% de los explantes, con prevalencia de estructuras embriogénicas. La combinación más efectiva fue 22.62 μM de 2,4-D + 13.32 μM de BA, con un rango de 1 a 36 embriones somáticos por explante y una eficiencia embriogénica de 17.6 ± 7.1 . Las combinaciones de ANA + BA promovieron principalmente la rizogénesis (87%), sin formación de embriones, mientras que las de AIA + BA fueron ineficaces ($\leq 10\%$), con tejidos oxidados y sin desarrollo morfo genético. Las plántulas regeneradas a partir de embriones somáticos germinaron adecuadamente y mostraron una tasa de supervivencia del 100% al ser aclimatadas en condiciones *ex vitro*. La combinación de 22.62 μM de 2,4-D y 13.32 μM de BA resultó ser la más eficiente para inducir embriogénesis somática en *A. angustifolia*. El 2,4-D demostró un efecto superior frente al ANA y AIA, consolidándose como el regulador clave para inducir la totipotencia celular. La alta tasa de aclimatación *ex vitro* valida la viabilidad práctica del protocolo propuesto, con amplias posibilidades de aplicación en conservación, mejoramiento genético y producción sustentable de agaves.

Palabras clave: Agave mezcalero, callogénesis, embrión somático, reguladores del crecimiento vegetal.

ABSTRACT: *Agave angustifolia* Haw. is a highly valuable species for the Mexican mezcal agroindustry. However, the increasing demand contrasts with the scarcity of high-quality germplasm and the low efficiency of conventional propagation methods. In this context, somatic embryogenesis emerges as a promising biotechnological strategy for the mass regeneration of elite plants under controlled conditions. The objective of this study was to evaluate the effect of three auxins (2,4-dichlorophenoxyacetic acid [2,4-D], indole-3-acetic acid [IAA], and naphthaleneacetic acid [NAA]) combined with N⁶-benzyladenine (BA) on the induction of somatic embryogenesis in *A. angustifolia*, using zygotic embryo axes as explants. A completely randomized experimental design was applied to assess 27 hormonal combinations, derived from the factorial interaction of three concentrations of auxins (13.57, 18.10 and 22.62 μM of 2,4-D; 17.13, 22.83 and 28.54 μM of IAA; 16.11, 21.48 and 26.85 μM of NAA) and three of BA (4.44, 8.88 and 13.32 μM). The induction medium for proembryogenic masses consisted of 25 % MS supplemented with 60 g L⁻¹ sucrose and L2 vitamins. Each zygotic embryo axis was considered an experimental unit. After 60 days of start of cultivation, the resulting calli were transferred to a histodifferentiation MS medium containing 0.45 μM of 2,4-D, 0.57 μM of IAA, or 0.54 μM of NAA, as appropriate, and without BA. All cultures were kept in darkness for an additional 30–60 days to promote embryonic differentiation. Combinations of 2,4-D + BA induced callus formation in 71% of the explants, with a predominance of embryogenic structures. The most effective combination was 22.62 μM of 2,4-D + 13.32 μM of BA, yielding between 1 and 36 somatic embryos per explant and an embryogenic efficiency of 17.6 ± 7.1 . Combinations of NAA + BA mainly promoted rhizogenesis (87%) with no embryo formation, while IAA + BA combinations were ineffective ($\leq 10\%$), resulting in oxidized tissues with no morphogenic development. Plantlets regenerated from somatic embryos germinated properly and exhibited a 100 % survival rate when acclimated under *ex vitro* conditions. The combination of 22.62 μM of 2,4-D and 13.32 μM of BA proved to be the most efficient for inducing somatic embryogenesis in *A. angustifolia*. Among the tested auxins, 2,4-D showed a superior effect compared to NAA and IAA, establishing itself as the key regulator for inducing cellular totipotency. The high *ex vitro* acclimatization rate confirms the practical viability of the proposed protocol, with broad potential applications in conservation, genetic improvement, and sustainable agave production.

Key words: Agave mezcalero, callogenesis, somatic embryo, plant growth regulators.

INTRODUCCIÓN

La familia Asparagaceae (anteriormente Agavaceae), subfamilia Agavoideae, perteneciente al orden Asparagales, constituye un linaje monofilético de plantas monocotiledóneas ampliamente adaptadas a entornos xerofíticos a través de sofisticadas adaptaciones morfofisiológicas (García-Mendoza, 2002). Este clado agrupa sistemáticamente a nueve géneros neotropicales, entre los que destacan *Agave*, *Furcraea* y *Yucca*, con aproximadamente 300 especies, de las cuales un notable 90.6% (272 taxones) presentan distribución endémica en el territorio mexicano, lo que posiciona al país como un punto crítico de diversidad genética y centro de diversificación evolutiva para este grupo (Álvarez-Ríos *et al.*, 2020; Trejo *et al.*, 2024). Esta riqueza específica está estrechamente correlacionada con procesos de radiación adaptativa impulsados por condiciones edafoclimáticas extremas, particularmente en el Eje Neovolcánico Transversal y en zonas de transición árido-tropical, donde estas especies han desarrollado estrategias fisiológicas altamente especializadas para maximizar la eficiencia en el uso del agua y la captación de nutrientes (Dávila *et al.*, 2002).

El género *Agave* destaca por su relevancia ecológica, económica y biotecnológica. Su metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM, *Crassulacean Acid Metabolism*) y su capacidad de sintetizar y almacenar fructanos de alta masa molecular le confieren una notable resiliencia ambiental y lo hacen apto para múltiples aplicaciones industriales (Pérez-Zavala *et al.*, 2020).

Estas aplicaciones incluyen la producción de bebidas destiladas mediante hidrólisis termoenzimática de fructooligosacáridos (como el tequila y el mezcal), el desarrollo de ingredientes funcionales como prebióticos y edulcorantes, la síntesis de bioetanol de segunda generación, y la extracción de compuestos bioactivos como saponinas esteroidales con propiedades farmacológicas (Gutiérrez-Mora *et al.*, 2014; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2009). Sin embargo, la biología reproductiva del género, caracterizada por su monocarpismo, largos ciclos ontogénicos, baja viabilidad seminal y limitada propagación vegetativa espontánea, representa una barrera crítica para su conservación y explotación sostenible (Aguirre-Dugua & Eguiarte, 2013).

Particularmente, *Agave angustifolia* Haw., una especie diploide ($2n = 2x = 60$), muestra una marcada vulnerabilidad ecológica y genética, atribuible a su escaso flujo génico, alta especialización ecológica y grado elevado de domesticación (Flores-Maya *et al.*, 2015). Proyecciones recientes advierten una reducción de hasta el 68 % en sus poblaciones silvestres para el año 2040, como consecuencia de la ausencia de intervenciones de conservación efectivas y la creciente presión extractiva de la industria mezcalera. Ante esta problemática, la implementación de estrategias biotecnológicas orientadas a su propagación masiva, conservación *ex situ* y mejora genética resulta imperativa (Gutiérrez-Mora *et al.*, 2014).

La embriogénesis somática (ES) se erige como una herramienta fundamental, capaz de generar sistemas de propagación clonal eficientes, establecer bancos de germoplasma *in vitro*, facilitar la crioconservación de recursos fitogenéticos y constituirse una plataforma para la transformación genética (Aronen *et al.*, 2025; Desai *et al.*, 2022). El proceso embriogénico en *Agave* implica una compleja reprogramación celular, mediada por mecanismos epigenéticos y moleculares como la remodelación de la cromatina (vía modificaciones postraduccionales de histonas), patrones de metilación diferencial del ADN, reorganización del citoesqueleto y la generación de gradientes auxínicos mediados por reguladores del crecimiento vegetal (RCV) exógenos (Alvarez-Aragón *et al.*, 2020; Gulzar *et al.*, 2020; Reyes-Díaz *et al.*, 2017, 2018).

En continuidad con investigaciones previas sobre *A. angustifolia*, se reconoce que los sistemas desarrollados hasta ahora han contribuido significativamente al entendimiento de la embriogénesis somática en esta especie (Reyes-Díaz *et al.*, 2017, 2018). No obstante, es necesario seguir optimizando aspectos clave del proceso, como la frecuencia de inducción embrionaria, la sincronía en el desarrollo de los embriones, la estabilidad morfogénica y la conservación de la competencia embriogénica en cultivos prolongados (Aronen *et al.*, 2025). En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de tres auxinas (2,4-diclorofenoxiacético [2,4-D], ácido indolacético [AIA] y ácido naftalenacético [ANA]) combinadas con N⁶-benciladenina (BA) sobre la inducción de embriogénesis somática en *A. angustifolia*, a partir de ejes embrionarios cigóticos. La comparación del efecto de auxinas naturales y sintéticas combinadas con BA es esencial para optimizar la embriogénesis somática en *A. angustifolia*, especie clave para la producción y conservación de germoplasma. Aunque el 2,4-D es el regulador más utilizado para inducir callo proembriogénico, su respuesta depende del genotipo y puede inducir variaciones somaclonales. Alternativamente, el AIA y el ANA, con diferentes propiedades fisiológicas y estabilidad metabólica, pueden modular rutas específicas de desdiferenciación y reprogramación embriogénica. La inclusión de BA permite evaluar sinergias auxina-citocinina críticas para la adquisición de competencia embrionaria. Este enfoque permite definir condiciones hormonales óptimas para lograr altos niveles de regeneración, estabilidad genética y escalabilidad, fortaleciendo plataformas biotecnológicas para la propagación y conservación sostenible de agaves.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del área experimental

El presente estudio fue desarrollado en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, perteneciente al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento (CIEAF),

adscrito a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx).

Material biológico

Se recolectaron semillas maduras de *A. angustifolia* (Figura 1A) en poblaciones silvestres del municipio de Zumpahuacán, Estado de México (18°48'N, 99°35'W). Las semillas fueron desinfectadas mediante un lavado inicial con detergente líquido neutro complementado con Tween® 20 al 0.1% (v/v) durante 15 minutos, seguido de un enjuague con agua destilada estéril. Posteriormente, se realizó una inmersión en etanol absoluto (96% v/v) durante un minuto y, enseguida, una desinfección con hipoclorito de sodio al 2% (p/v), bajo agitación orbital constante a 100 rpm durante 15 minutos. Finalmente, las semillas fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril bajo condiciones asépticas en campana de flujo laminar. Una vez desinfectadas, se colocaron en agua estéril y refrigeración a 4-6° C en oscuridad absoluta durante 48 horas, como tratamiento de hidratación y estratificación previa. Al término de este periodo, se procedió a la disección manual de las semillas bajo microscopio estereoscópico (40×) para extraer asépticamente un total de 1620 ejes embrionarios cigóticos (EEC) maduros (Figura 1B), los cuales fueron utilizados como explantes para los experimentos de embriogénesis somática.

Inducción de callo proembriogénico (CPE)

Los EEC de *A. angustifolia* fueron establecidos en un medio de cultivo diseñado específicamente para la inducción de CPE y subsecuente histodiferenciación para la formación de embriones somáticos (ESS). El medio basal consistió en sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) al 25% de su concentración estándar, suplementado con 60.0 g L⁻¹ de sacarosa, el complejo vitamínico L2 (250.0 mg L⁻¹ de inositol, 0.5 mg L⁻¹ de piridoxina y 2.0 mg L⁻¹ de tiamina), y combinaciones específicas de RCV. El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 3×3×3, en el cual se evaluó un gradiente de concentraciones auxina-citocinina compuesto por tres auxinas, cada una en tres concentraciones: 2,4-D (13.57, 18.10 y 22.62 μM), ANA (16.11, 21.48 y 26.85 μM) y AIA (17.13, 22.83 y 28.54 μM), combinadas con tres concentraciones de BA (4.44, 8.88 y 13.32 μM), generando un total de 27 tratamientos. Cada tratamiento fue replicado tres veces, utilizando una caja Petri como repetición, en cada repetición se establecieron 20 EEC; donde cada EEC se consideró como una unidad experimental individual. El pH de los medios fue ajustado a 5.7 antes de la adición de 8.0 g L⁻¹ de agar como agente gelificante. La esterilización se realizó mediante autoclave a 121 °C y 1.1 kg·cm⁻² de presión durante 20 minutos. Las cajas fueron incubadas en oscuridad continua a 25 ± 2 °C durante un periodo de 60 días. Al finalizar este periodo (60 días después de iniciado el cultivo), se cuantificó el porcentaje de callogénesis y se clasificó el callo inducido en dos categorías morfológicas: CPE, distinguido por su textura compacta, color blanquecino brillante a amarillento translúcido, apariencia nodular y organización celular densa; y callo no proembriogénico (CNPE), caracterizado por su consistencia friable, color blanco opaco a marrón, estructura desorganizada y tendencia a la oxidación.

Histodiferenciación de ESS

Los CPE, con una incipiente formación de ESS en estadio globular, fueron subsecuentemente transferidos a un medio de histodiferenciación, diseñado para promover la progresión a los estadios escutelar y coleoptilar. Este medio consistió en sales MS al 50% de su concentración original, vitaminas MS, 30.0 g L⁻¹ de sacarosa y suplementado con 0.45 μM de 2,4-D, 0.54 μM de ANA o 0.57 μM de AIA, según correspondiera, en todos los casos sin la adición de BA. Las condiciones de incubación se mantuvieron en oscuridad absoluta a 25 ± 2 °C durante un periodo adicional de 60 días, alcanzando un total de 120 días. La completa histodiferenciación fue evaluada cuantificando el número de ES coleoptilares generados por callo al término del periodo.

Germinación de ESS, conversión a plántulas y adaptación de plántulas a condiciones *ex vitro*

Para evaluar la conversión embrionaria a plántula, por tratamiento, se seleccionaron aleatoriamente diez ESS en el estadio coleoptilar. La selección aleatoria se realizó con el

propósito de evitar sesgos asociados a la elección subjetiva de estructuras con diferente grado de desarrollo o vigor, garantizando así la representatividad biológica de la muestra dentro de cada tratamiento. Este procedimiento asegura que las variaciones observadas en la tasa de conversión reflejen de manera más objetiva el efecto de los RCV y las condiciones de cultivo, en lugar de diferencias atribuibles a la selección de los explantes.

Estos embriones en estado coleoptilar fueron transferidos a un medio de germinación, MS al 50% sin adición de RCV, bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad y a 25 ± 2 °C, hasta que la plántula alcanzara una altura promedio de 5 cm. Las plántulas regeneradas se extrajeron cuidadosamente de los frascos de cultivo *in vitro*, eliminando los restos de medio de cultivo mediante enjuagues suaves con agua destilada estéril para evitar contaminación. Posteriormente, se seleccionaron aquellas con raíces bien desarrolladas, turgentes y sin signos de necrosis. Cada plántula se trasplantó en una maceta individual previamente esterilizada, que contenía una mezcla homogénea de perlita, composta y suelo agrícola en proporciones 1:1:1, previamente autoclavada para garantizar la asepsia del sustrato. Las macetas se colocaron en un invernadero con temperatura y humedad controladas, bajo luz difusa, y se mantuvieron cubiertas con plástico transparente durante la primera semana para conservar una alta humedad relativa y reducir el choque hídrico. Durante las tres semanas de aclimatación, las cubiertas se retiraron gradualmente para favorecer la adaptación de las plántulas a condiciones *ex vitro*, hasta alcanzar su total exposición al ambiente del invernadero.

Variables evaluadas

Las variables morfogenéticas cuantificadas incluyeron:

- a) Porcentaje de callos proembriogénicos (%): proporción de explantes que desarrollaron estructuras callogénicas respecto al total de explantes cultivados a los 60 días después de iniciado el cultivo (ddic), expresada como porcentaje.
- b) Densidad embriogénica: número de embriones somáticos coleoptilares por callo, cuantificados a los 120 ddic mediante conteo directo bajo microscopio óptico en cámara de Neubauer.
- c) Eficiencia embriogénica: promedio de embriones somáticos coleoptilares generados por tratamiento a los 120 ddic, expresado como el número total de embriones somáticos coleoptilares dividido entre el número total de explantes (eje embrionario cigótico) por tratamiento.
- d) Tasa de aclimatación (%): proporción de plántulas viables y completamente adaptadas a condiciones ambientales *ex vitro* a los 202 ddic, respecto al total de plantas transferidas desde condiciones *in vitro*.

Análisis estadístico

Los datos cuantitativos obtenidos para las variables morfogenéticas, porcentaje de CPE, densidad embriogénica, eficiencia embriogénica y tasa de aclimatación, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), empleando el software MENU versión 2.5, con el objetivo de identificar diferencias significativas entre los tratamientos. En los casos en que se detectaron diferencias estadísticas significativas (F test, $P < 0.05$), se procedió a realizar una comparación de medias mediante la prueba de rango múltiple de Tukey con un nivel de confianza del 95%. Los resultados fueron expresados como medias \pm error estándar.

RESULTADOS

Inducción de CPE

La formación de CPE en EEC de *A. angustifolia* dependió de la interacción entre auxinas y citocininas, con una respuesta claramente modulada por el tipo de auxina aplicada. La desdiferenciación celular fue un evento temprano y evidente desde los 5 ddic (Figura 1C). A partir de los 20 ddic (Figura 1D) y hasta los 60 ddic, las masas callosas alcanzaron un desarrollo significativo, permitiendo distinguir visualmente diferencias morfológicas entre CPE y CNPE.

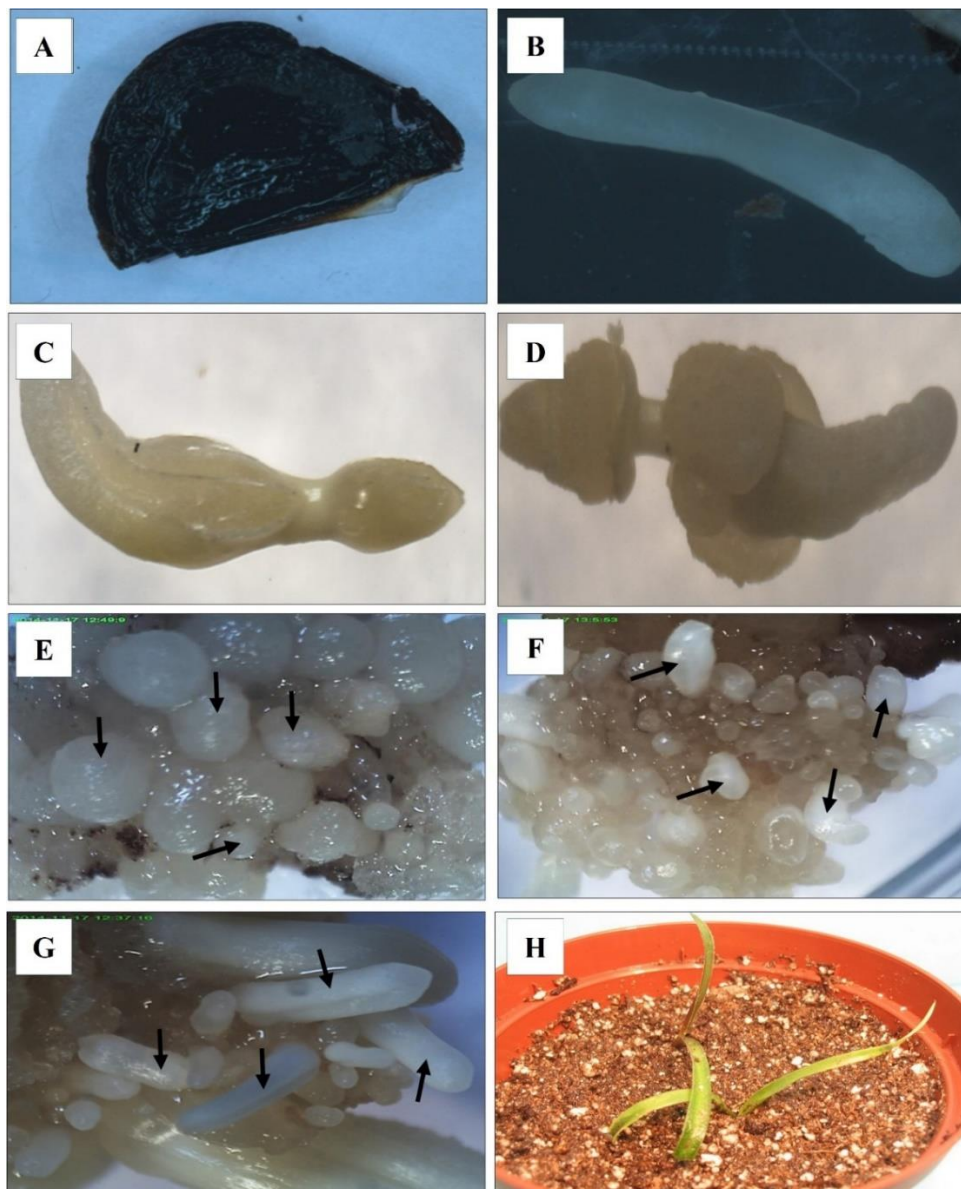


Figura 1. Proceso de embriogénesis somática en *A. angustifolia* a partir de ejes embrionarios cigóticos: A. Semilla madura de *A. angustifolia*. B. Eje embrionario cigótico aislado como explante inicial. C. Inicio de la dediferenciación celular a los 5 ddc. D. Formación de callo proembriogénico compacto de color amarillo perlado a los 40 ddc. E. Desarrollo de estructuras globulares indicativas de embriones somáticos globulares tempranos (flechas). F. Embriones somáticos en transición de estadios globular a escutelar (flechas), con morfología definida. G. Producción de embriones somáticos en estadio coleoptilar a los 100 ddc, en el tratamiento que contenía 22.62 μM de 2,4-D y 13.32 μM de BA. H. Plántulas completamente desarrolladas y exitosamente aclimatadas a condiciones *ex vitro* en invernadero, a los 202 ddc.

Figure 1. Somatic embryogenesis process in *A. angustifolia* from zygotic embryo axes: A. Mature seed of *A. angustifolia*. B. Isolated zygotic embryo axis used as the initial explant. C. Onset of cellular dedifferentiation at 5 days after culture initiation (daci). D. Formation of compact, pearl-yellow proembryogenic callus at 40 daci. E. Development of globular structures indicative of early globular somatic embryos (arrows). F. Somatic embryos transitioning from globular to scutellar stages (arrows), showing defined morphology. G. Production of coleoptile-stage somatic embryos at 100 daci, in the most efficient treatment (25% MS with 60 g L⁻¹ sucrose, 22.62 μM of 2,4-D, and 13.32 μM of BA). H. Fully developed plantlets successfully acclimatized to *ex vitro* conditions in the greenhouse at 202 daci.

Entre las combinaciones evaluadas, los tratamientos que incluyeron 2,4-D junto con BA fueron los únicos eficientes para la formación de CPE (Tabla 1). Destacó particularmente la combinación de 18.10 μM de 2,4-D y 4.44 μM de BA, la cual alcanzó una callogénesis del $97.8 \pm 1.6\%$, significativamente superior al resto de los tratamientos de acuerdo con el análisis estadístico. Este tratamiento promovió la formación de callos con rasgos característicos de competencia embriogénica (CPE), incluyendo textura friable, color amarillo perlado, superficie homogénea y la presencia de estructuras globulares compatibles con embriones somáticos en estadios tempranos, en concordancia con lo señalado por Reyes-Díaz *et al.*, (2017, 2018). En contraste, los CNPE, mostraron una morfología irregular, con tejidos gelatinosos, oxidación evidente y estructura heterogénea.

Tabla 1. Porcentaje de callogénesis y tipo de callo generado a partir de ejes embrionarios cigóticos de *A. angustifolia* cultivados en medio suplementado con distintas combinaciones de auxinas (2,4-D, ANA o AIA) y N⁶-benciladenina (BA), a los 60 ddc.

Table 1. Percentage of callogenesis and type of callus generated from zygotic embryo axes of *A. angustifolia* cultured on medium supplemented with different combinations of auxins (2,4-D, NAA, or IAA) and N⁶-benzyladenine (BA), at 60 daci.

Tratamiento (μM)		Callogénesis (%) (media \pm EE)		Tipo de Callo
Auxina	Citocinina			
2,4-D	BA			
	4.44	58.7 \pm 4.5	b	CPE - CNPE
13.57	8.88	52.3 \pm 3.9	bc	CPE - CNPE
	13.32	62.1 \pm 5.1	b	CNPE
	4.44	97.8 \pm 1.6	a	CPE - CNPE
18.10	8.88	63.4 \pm 4.8	b	CPE - CNPE
	13.32	78.9 \pm 3.7	ab	CPE - CNPE
	4.44	94.3 \pm 2.2	a	CNPE
22.62	8.88	81.5 \pm 3.1	ab	CPE - CNPE
	13.32	59.7 \pm 5.5	b	CPE - CNPE
ANA	BA			
	4.44	91.4 \pm 3.2	a	CNPE
16.11	8.88	98.6 \pm 1.0	a	CNPE
	13.32	89.3 \pm 4.1	a	CNPE
	4.44	79.8 \pm 3.9	ab	CNPE
21.48	8.88	82.6 \pm 3.5	ab	CNPE
	13.32	97.1 \pm 1.7	a	CNPE
	4.44	68.9 \pm 5.2	bc	CNPE
26.85	8.88	83.7 \pm 3.3	ab	CNPE
	13.32	99.2 \pm 0.5	a	CNPE
AIA	BA			
	4.44	8.4 \pm 1.7	d	CNPE
17.13	8.88	9.2 \pm 2.0	d	CNPE
	13.32	6.8 \pm 1.2	e	CNPE
	4.44	10.0 \pm 2.5	d	CNPE
22.83	8.88	7.5 \pm 1.8	de	CNPE
	13.32	6.2 \pm 1.0	e	CNPE

Tratamiento (μM)		Callogénesis (%) (media \pm EE)		Tipo de Callo
Auxina	Citocinina			
	4.44	9.7 \pm 2.3	d	CNPE
28.54	8.88	5.9 \pm 1.1	e	CNPE
	13.32	8.1 \pm 1.5	d	CNPE

CPE: Callo proembriogénico, CNPE: Callo no proembriogénico. Letras distintas (a, b, c, d, e) indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Los valores corresponden a la media de tres repeticiones \pm error estándar (EE).

Particularmente, los tratamientos con ANA también indujeron altos porcentajes de formación de callo (frecuentemente superiores al 80%); sin embargo, la morfología resultante difirió notablemente. Los callos presentaron textura compacta a semisólida, tonalidades verde-crema y apariencia heterogénea, sin estructuras nodulares ni masas proembriogénicas bien definidas. En estos cultivos se registró una elevada frecuencia de organogénesis indirecta, reflejada en la aparición de raíces adventicias y brotes emergentes desde el tejido calloso (Figura 2A). No se observaron estructuras compatibles con embriones somáticos en ninguno de los tratamientos basados en ANA, clasificándose como callos no proembriogénicos (CNPE).

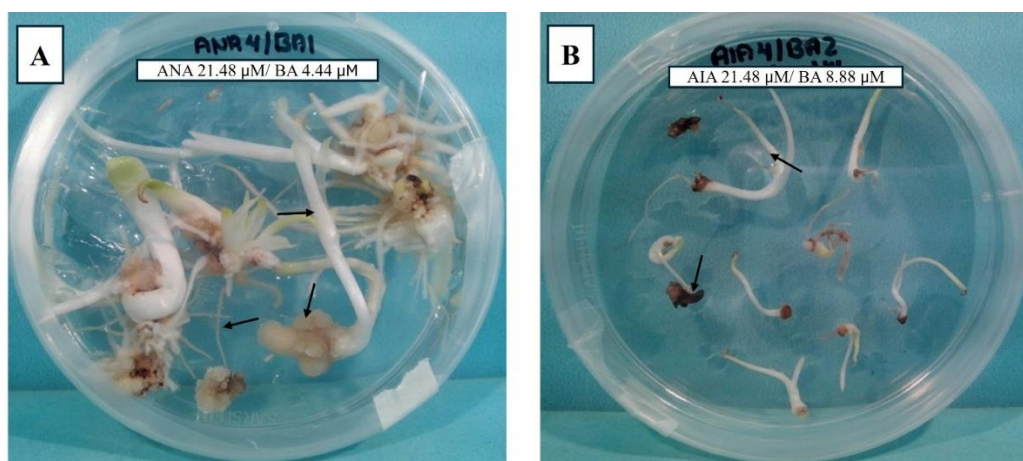


Figura 2. Respuesta morfogénica no embriogénica en explantes de *A. angustifolia* cultivados con ANA o AIA en combinación con BA: A. Formación de callo no proembriogénico con desarrollo de raíces (1.5 cm) y brotes adventicios (3.0 cm) a los 20 ddic, en tratamientos con ácido naftalenacético (ANA) más BA. Las flechas indican estructuras diferenciadas. B. Callo parcialmente oxidado observado entre los 20 y 60 ddic, con brotes de hasta 3.0 cm de longitud formados a los 50 ddic (flechas), en tratamientos suplementados con ácido indolacético (AIA) más BA. Esta respuesta sugiere una vía rizogénica o adventicia alternativa, sin evidencia de embriogénesis somática.

Figure 2. Non-embryogenic morphogenic response in *A. angustifolia* explants cultured with NAA or IAA in combination with BA: A. Formation of non-embryogenic callus with root development (1.5 cm) and adventitious shoots (3.0 cm) at 20 days after culture initiation (daci), in treatments with naphthaleneacetic acid (NAA) plus BA. Arrows indicate differentiated structures. B. Partially oxidized callus observed between 20 and 60 daci, with shoots up to 3.0 cm in length formed at 50 daci (arrows), in treatments supplemented with indoleacetic acid (IAA) plus BA. This response suggests an alternative rhizogenic or adventitious pathway, with no evidence of somatic embryogenesis.

Aún más limitada fue la respuesta obtenida con AIA, donde la callogénesis fue escasa (8.0 \pm 1.7% en promedio), sin evidencia de formación de CPE (Tabla 1). No obstante, en algunos explantes tratados con AIA se observó la aparición espontánea de brotes, aunque sin desarrollo embriogénico claro (Figura 2B).

Histodiferenciación de ESS

La histodiferenciación de ESS en *A. angustifolia* se presentó exclusivamente en los tratamientos que incluyeron la combinación de 2,4-D con BA, lo que evidencia una alta especificidad hormonal para inducir embriogénesis somática en esta especie.

De los nueve tratamientos empleados con 2,4-D (Tabla 2), siete lograron inducir la formación de ESS (Figuras 1E y 1F), aunque con eficiencias variables tanto en número como en frecuencia de aparición. El tratamiento más eficiente fue 22.62 μ M de 2,4-D combinado con 13.32 μ M de BA siendo significativamente superior al resto de los tratamientos, con una eficiencia embriogénica promedio de 17.6 ± 7.1 ES por explante (Figura 1G), alcanzando hasta 36 embriones en estadio coleoptilar por explante (Tabla 2). Estos embriones emergieron directamente a partir de los CPE.

Tabla 2. Densidad y eficiencia embriogénica en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* cultivados inicialmente en medio suplementado con distintas combinaciones de 2,4-D y BA, a los 120 ddic.

Table 2. Embryogenic density and efficiency in zygotic embryo axes of *Agave angustifolia* initially cultured on medium supplemented with different combinations of 2,4-D and BA, at 120 daci.

Tratamiento (μ M)		Densidad embriogénica	Eficiencia embriogénica (media \pm EE)	
Auxina	Citocinina			
2,4-D	BA			
	4.44	8 - 11	9.5 ± 0.4	b
13.57	8.88	4	4.0 ± 0.0	c
	13.32	-	-	-
	4.44	9 - 11	10.0 ± 0.6	b
18.10	8.88	2 - 6	4.0 ± 0.7	c
	13.32	2 - 25	13.5 ± 3.5	ab
	4.44	-	-	-
22.62	8.88	6	6.0 ± 0.0	bc
	13.32	1 - 36	17.6 ± 7.1	a

La densidad embriogénica representa el rango mínimo y máximo de embriones somáticos coleoptilares observados por explante. La eficiencia embriogénica corresponde al número promedio de embriones somáticos coleoptilares por explante \pm error estándar (EE). Letras distintas (a, b, c) indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, según la prueba de Tukey ($P < 0.05$). El guion (-) indica ausencia de respuesta embriogénica en ese tratamiento. La identificación de los ESS se realizó mediante observación morfológica a los 60 ddic, destacando su forma globular o escutelar, así como su tonalidad más brillante y definida respecto al callo circundante. Esta distinción permitió su aislamiento y posterior transferencia a medio de histodiferenciación para favorecer su maduración hacia estadios más avanzados, principalmente el cotiledonar o coleoptilar, hacia los 120 ddic.

Otros tratamientos con respuesta embriogénica considerable fueron 18.10 μ M de 2,4-D + 13.32 μ M de BA y 18.10 μ M de 2,4-D + 4.44 μ M de BA, con eficiencias de 13.5 ± 3.5 y 10.0 ± 0.6 ES por explante, respectivamente. En contraste, la combinación 13.57 μ M de 2,4-D + 8.88 μ M de BA produjo escasa cantidad de ESS (4.0).

En cambio, ninguno de los tratamientos que emplearon ANA o AIA fue capaz de inducir embriones somáticos, a pesar de que ambos RCV promovieron una callogénesis abundante (Tabla 1). Los tejidos generados bajo estas condiciones correspondieron exclusivamente a CNPE, sin evidencia de histodiferenciación embrionaria.

Germinación de ESS, conversión a plántulas y adaptación de plántulas a condiciones *ex vitro*

Los ESS obtenidos a partir de CPE fueron transferidos a un medio de germinación libre de RCV para inducir su conversión en plántulas completas. Este paso resultó fundamental para evaluar la funcionalidad de las estructuras embrionarias generadas. La mayoría de los ESS avanzó hacia la diferenciación de ejes radiculares y meristemas caulinares, presentando características morfológicas típicas de embriones cigóticos en desarrollo, como simetría bilateral, formación de hipocótilo y apertura del coleóptilo. La tasa de conversión fue elevada (96%), especialmente en aquellos tratamientos hormonales donde se observaron densidades embriogénicas más altas y estructuras más organizadas (como en la combinación de 22.62 μM de 2,4-D con 13.32 μM de BA), lo que indica un proceso de embriogénesis somática funcional y eficiente.

Posteriormente, las plántulas regeneradas fueron exitosamente transferidas y aclimatadas a condiciones *ex vitro*, utilizando un sustrato compuesto en proporciones iguales de perlita, composta, y suelo agrícola (1:1:1) (Figura 1H). Esta formulación ofreció una textura, aireación y retención hídrica adecuadas, permitiendo una transición gradual desde el ambiente *in vitro*, altamente controlado y estéril, hacia un entorno más complejo y variable. El proceso de aclimatación fue progresivo, iniciando con condiciones de humedad relativa elevada y sombra parcial, y reduciendo estos factores de forma escalonada a lo largo de 3 semanas. El resultado fue una tasa de supervivencia del 100%, lo que representa un indicador de la viabilidad fisiológica y estructural de las plántulas.

DISCUSIÓN

Inducción de CPE

La inducción de callo en *A. angustifolia* mostró una respuesta diferencial según la auxina utilizada, lo que indica que este proceso no depende únicamente del tipo de regulador exógeno, sino del equilibrio entre las concentraciones internas de auxinas y las condiciones fisiológicas del explante. Esta interacción sugiere que la competencia celular para responder a los estímulos hormonales está modulada por la sensibilidad tisular y el estado metabólico del tejido, más que por la naturaleza química de la auxina añadida al medio (Aronen *et al.*, 2025). La interacción entre auxinas y citocininas, particularmente la combinación de 2,4-D con BA, resultó ser determinante para la inducción de CPE, como también ha sido reportado en otros sistemas embriogénicos en *A. angustifolia* (Reyes-Díaz *et al.*, 2017, 2018). La eficacia de este tratamiento no solo se reflejó en tasas elevadas de inducción, sino también en la calidad morfológica del callo generado, caracterizado por una organización celular compatible con estados embrionarios tempranos reportados previamente por (Reyes-Díaz *et al.*, 2017, 2018). Estos rasgos, se correlacionan con una arquitectura celular organizada y meristemática, con núcleos prominentes, abundante citoplasma y baja vacuolización, condiciones necesarias para la totipotencia celular (Desai *et al.*, 2022).

Desde una perspectiva fisiológica, el 2,4-D se comporta como un potente inductor debido a su estabilidad metabólica y su afinidad con receptores clave de la señalización auxínica, modulando la expresión de genes relacionados con la desdiferenciación celular y la transición al estado embrionario (Gulzar *et al.*, 2020), lo cual podría explicar la mayor proporción de CPE observados en los tratamientos con esta auxina. A su vez, la citocinina BA complementa este efecto al promover divisiones celulares controladas, favoreciendo la formación de estructuras meristemáticas organizadas necesarias para el establecimiento de estructuras embriogénicas (Schaller *et al.*, 2015).

En cambio, los CNPE observados en tratamientos con menor eficacia o con auxinas distintas, presentaron una morfología desorganizada y características como textura gelatinosa y oxidación, lo que sugiere un crecimiento caótico y una insuficiente reprogramación génica para iniciar la embriogénesis. Esta distinción entre CPE y CNPE no solo es morfológica, sino funcional, ya que la presencia de CNPE en un cultivo puede interferir con la maduración de embriones somáticos verdaderos, al competir por recursos y espacio. Adicionalmente, la coexistencia de CPE y CNPE dentro de un mismo sistema de cultivo constituye un fenómeno fisiológico relevante, asociado a

la plasticidad de los tejidos bajo condiciones hormonales inductivas. Esta coexistencia se interpreta como la expresión simultánea de rutas morfogenéticas competitivas, donde la porción de tejido con reorganización meristemática adquiere potencial embriogénico, mientras que el tejido no competente expresa vías organogénicas o proliferativas desorganizadas. Esta dinámica ha sido señalada como característica en sistemas con alta presión auxínica, particularmente con 2,4-D, y se reconoce su implicación funcional al influir en la disponibilidad de recursos y en la eficiencia global de la embriogénesis. (Radoeva *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2022).

En contraste con el 2,4-D, el ANA mostró una elevada capacidad de callogénesis (superior al 90%), pero los tejidos inducidos carecieron de potencial embriogénico. Su tendencia a promover rizogénesis y brotación adventicia sugiere que el ANA favorece rutas de desarrollo unipolar, inhibiendo la formación de estructuras embrionarias bipolares (Teale y Palme, 2018). Esta respuesta puede atribuirse a la mayor estabilidad química del ANA, que evita su degradación rápida pero también impide el establecimiento de gradientes hormonales dinámicos, los cuales son necesarios para activar rutas embriogénicas (Ascough y Fennell, 2004; Schaller *et al.*, 2015). Aún más limitada fue la respuesta observada con el uso de AIA, lo que puede atribuirse a su baja estabilidad fisiológica y, por ende, a una disponibilidad reducida de auxina activa en el medio de cultivo (Azizi *et al.*, 2015). A diferencia de otras auxinas sintéticas como el 2,4-D o el ANA, el AIA, de naturaleza endógena, es susceptible a una rápida degradación por procesos de oxidación fotoinducida o por conjugación enzimática con azúcares y aminoácidos, lo que reduce su vida media incluso bajo condiciones controladas de cultivo; en consecuencia, la limitada estabilidad del AIA podría explicar su escasa eficacia en la inducción de desdiferenciación celular. La aparición esporádica de brotes adventicios en algunos explantes tratados con esta auxina sugiere, más bien, la activación de vías morfogenéticas preexistentes de tipo organogénico, en ausencia de una señal embriogénica específica (Jing y Strader, 2019; Węgrzynowicz-Lesiak *et al.*, 2013). Un elemento adicional para considerar es el papel del estrés oxidativo moderado como señal inductora de embriogénesis. Se ha propuesto que el 2,4-D genera niveles controlados de especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales pueden actuar como señales para activar vías de desarrollo alternativas (Fehér, 2015). En este contexto, se ha reportado que la incapacidad del ANA y el AIA para inducir una señal ROS adecuada o en el momento preciso podría explicar su limitada eficacia embriogénica y su tendencia a dirigir el desarrollo hacia rutas organogénicas (Desai *et al.*, 2022; Schaller *et al.*, 2015).

En conjunto, estos resultados subrayan la importancia del tipo y concentración de RCV, así como de sus propiedades fisicoquímicas, para la inducción exitosa de CPE. Además, refuerzan la necesidad de establecer condiciones hormonales óptimas que promuevan no solo la proliferación celular, sino también su organización funcional hacia una ruta embrionaria específica.

Histodiferenciación de ESS

La histodiferenciación de ESS en *A. angustifolia* demuestra una marcada especificidad hormonal que evidencia la selectividad funcional de los RCV en la inducción y desarrollo de estructuras embrionarias completas. La exclusividad de la combinación de 2,4-D y BA para promover la formación de ES destaca la importancia crítica de la interacción sinérgica entre auxinas sintéticas y citocininas en la modulación de rutas señaladoras y epigenéticas que reprograman células somáticas hacia estados de totipotencia (Radoeva *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2007).

El análisis diferencial de las respuestas embriogénicas a distintas concentraciones de 2,4-D refleja un patrón clásico de dosis-respuesta no lineal, donde un rango óptimo de concentración es determinante para el equilibrio entre proliferación celular desorganizada y la inducción de programas genéticos específicos para la embriogénesis (Su *et al.*, 2011). Este equilibrio se ve comprometido cuando las concentraciones de auxinas o citocininas están fuera de este rango, lo que puede generar inhibición por supraestimulación o insuficiente activación de vías críticas (Schaller *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2011).

El papel del 2,4-D como un regulador clave en la embriogénesis somática está respaldado por su capacidad para inducir modificaciones epigenéticas dinámicas, incluyendo la metilación del ADN y modificaciones de histonas que resultan en la activación de genes maestros de identidad embrionaria (Zhang *et al.*, 2025), tales como LEC1 (*LEAFY COTYLEDON 1*), BBM (*BABY*

BOOM), *WUS* (*WUSCHEL*) y *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTORS LIKE KINASE*) (Gulzar *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022; Zeng *et al.*, 2007). Estos genes forman parte de redes transcripcionales que coordinan la desdiferenciación, proliferación y la posterior organización espacial y funcional de células meristemáticas (Gulzar *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2020). En este contexto, la BA potencia la señalización celular mediante la promoción de divisiones celulares ordenadas y la polarización tisular, fundamentales para la formación de estructuras bipolares características de embriones somáticos coleoptilares maduros (Cárdenas-Aquino *et al.*, 2023; Domínguez-Rosales *et al.*, 2008). Esta morfología coincide con modelos anatómicos y ultraestructurales reportados en otras monocotiledóneas donde la diferenciación embrionaria somática refleja la organización histológica de embriones cigótico (Bai *et al.*, 2000). Por otro lado, la incapacidad de los tratamientos con ANA y AIA para inducir ESS, a pesar de su capacidad para estimular callogénesis, evidencia la complejidad del metabolismo hormonal y la señalización celular. El ANA, por su alta estabilidad y menor degradación oxidativa, tiende a mantener concentraciones supraóptimas que promueven rutas unipolares como la rizogénesis y la formación de brotes adventicios, probablemente por mantener gradientes hormonales poco dinámicos, esenciales para la embriogénesis (Abas *et al.*, 2021; Teale y Palme, 2018). En cuanto al AIA, su rápida degradación vía AIA-oxidasa y conjugación limita la persistencia del estímulo auxínico necesario para la reprogramación celular, provocando en su lugar la activación de rutas vegetativas preformadas (Batista-Silva *et al.*, 2024).

La dinámica de la señalización hormonal se ve complementada por la reducción progresiva de 2,4-D durante la fase de histodiferenciación (0.45 μM), que actúa como un desencadenante epigenético para la maduración de ESS. Este proceso de “reversión hormonal” facilita la transición de un estado proliferativo a uno de diferenciación morfogénica ordenada, promoviendo la polarización celular y la formación de tejidos organizados, un mecanismo fundamental para la obtención de ESS fisiológicamente competentes (Batista-Silva *et al.*, 2024; Bouchez *et al.*, 2024). En suma, la embriogénesis somática en *A. angustifolia* es un proceso multifactorial que requiere la coordinación precisa de señales hormonales, modificaciones epigenéticas y dinámicas celulares. La combinación de 2,4-D y BA no solo promueve la desdiferenciación, proliferación e histodiferenciación, sino que también induce la expresión de redes génicas embrionarias necesaria para la formación y maduración de embriones somáticos funcionales. Los resultados obtenidos aportan evidencia sobre los mecanismos fisiológicos y morfogenéticos asociados al proceso de embriogénesis somática en *Agave angustifolia*. En particular, destacan la respuesta diferencial de los explantes frente a distintas auxinas y citocininas, así como su influencia en la inducción de callo y la formación de estructuras embriogénicas. Estos hallazgos permiten comprender con mayor precisión las condiciones que favorecen la regeneración somática en esta especie, contribuyendo al establecimiento de un sistema eficiente de propagación *in vitro* dentro del contexto experimental del presente estudio.

Germinación de ESS, conversión a plántulas y adaptación de plántulas a condiciones *ex vitro*

La transferencia de ESS obtenidos a partir de CPE a un medio libre de RCV representa un paso crítico para la evaluación funcional y fisiológica de las estructuras embriogénicas generadas. La alta tasa de conversión observada (96 %) evidencia que las condiciones hormonales y nutricionales previas favorecieron la formación de ESS plenamente competentes, capaces de completar la diferenciación de ejes radicales y meristemas caulinares, emulando con precisión el desarrollo morfológico de embriones cigóticos. Esta simetría bilateral, junto con la formación de hipocótilo y la apertura del coleóptilo, indica una correcta polarización y organización tisular, elementos fundamentales para la viabilidad y funcionalidad post-germinativa (Azizi *et al.*, 2015). El éxito en la aclimatación *ex vitro*, con una tasa de supervivencia del 100 %, confirma la calidad morfofisiológica y la integridad estructural de las plántulas regeneradas. La formulación del sustrato, con proporciones balanceadas de perlita, composta y suelo agrícola, proporcionó las condiciones físicas óptimas para asegurar una transición gradual y eficaz desde el ambiente *in vitro*, altamente regulado y estéril, hacia un entorno *ex vitro* caracterizado por una mayor variabilidad ambiental. La aplicación de un protocolo progresivo de aclimatación, que inicia con

alta humedad relativa y sombra parcial, es congruente con estrategias recomendadas para minimizar el estrés hídrico y fotooxidativo durante la adaptación inicial (Li y Pritchard, 2009). Estos resultados resaltan que la embriogénesis somática, cuando es inducida bajo un régimen hormonal adecuado, no solo asegura la formación de embriones viables, sino que también contribuye significativamente a la correcta diferenciación de sistemas vasculares funcionales y tejidos especializados, elementos clave para la resiliencia fisiológica en condiciones *ex vitro*. La conservación de órganos como raíces funcionales y meristemas apicales activos durante la fase de aclimatación indica que la calidad del desarrollo embriogénico impacta positivamente en la capacidad de establecimiento autónomo, eliminando la necesidad de tratamientos adicionales para la adaptación.

Asimismo, se puede inferir que la configuración hormonal empleada, particularmente la combinación de 2,4-D y BA durante las etapas iniciales, influye más allá de la inducción embrionaria, modulando la calidad estructural y fisiológica final de las plantas regeneradas. Este efecto refleja la importancia no solo de la presencia de RCV, sino también de su estabilidad metabólica, interacción sinérgica y efectos epigenéticos acumulativos, factores que deben ser considerados para el diseño y optimización de protocolos eficientes de propagación *in vitro* (Aronen *et al.*, 2025).

En suma, el protocolo basado en 2,4-D y BA no solo constituye un método eficiente para la inducción de estructuras embriogénicas, sino que establece un modelo hormonal integralmente competente que guía con éxito el proceso regenerativo completo, desde la inducción, maduración y germinación, hasta la aclimatación *ex vitro* de plántulas viables y fisiológicamente funcionales.

CONCLUSIONES

La embriogénesis somática en *A. angustifolia* fue inducida exitosamente a partir de ejes embrionarios cigóticos, utilizando medios enriquecidos con RCV específicos. De los tratamientos evaluados, la combinación más eficiente consistió en el medio suplementado con 22.62 μM de 2,4-D y 13.32 μM de BA, la cual promovió la formación de callo embriogénico y la posterior diferenciación de embriones somáticos bien estructurados (17.6 ± 7.1).

Los resultados evidencian una fuerte especificidad hormonal en el proceso embriogénico, con el 2,4-D como el inductor más efectivo de totipotencia celular y la BA como modulador esencial en la organización meristemática. A diferencia del 2,4-D, las auxinas AIA y ANA no promovieron embriogénesis, confirmando su baja eficacia en este sistema. La eficiencia embriogénica mostró una clara dependencia de la concentración y combinación hormonal, con una correlación positiva entre las dosis de 2,4-D/BA y el número de embriones por explante.

Tras la germinación *in vitro* de los embriones somáticos en medio libre de RCV, las plántulas desarrolladas presentaron morfología y funcionalidad completas. Su transferencia a condiciones *ex vitro*, empleando un sustrato equilibrado, resultó en una tasa de supervivencia del 100 %, lo que valida la robustez del protocolo y el alto potencial regenerativo de los embriones inducidos. En conjunto, estos hallazgos posicionan al sistema 2,4-D/BA como una herramienta biotecnológica eficiente para la propagación masiva, conservación y mejoramiento genético de *A. angustifolia*, con aplicaciones concretas en agricultura sustentable y restauración ecológica.

LITERATURA CITADA

- Abas, L., Kolb, M., Stadlmann, J., Janacek, D. P., Lukic, K., Schwechheimer, C., Sazanov, L. A., Mach, L., Friml, J., & Hammes, U. Z. (2021). Naphthylphthalamic acid associates with and inhibits PIN auxin transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(1), e2020857118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2020857118>
- Aguirre-Dugua, X., & Eguiarte, L. E. (2013). Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in

- Mexico. *Journal of Arid Environments*, 90, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2012.10.018>
- Alvarez-Aragón, C., Arzate-Fernandez, A.-M., Martínez-Martínez, S.-Y., & Martínez-Velasco, I. (2020). Regeneración de plantas de *Agave marmorata* RoezL, vía embriogénesis somática. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(2). <https://doi.org/10.56369/tsaes.3117>
- Álvarez-Ríos, G. D., Pacheco-Torres, F., Figueredo-Urbina, C. J., & Casas, A. (2020). Management, morphological and genetic diversity of domesticated agaves in Michoacán, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 16(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s13002-020-0353-9>
- Aronen, T., Varis, S., & Tikkinen, M. (2025). Somatic embryogenesis: concept, principles, and applications. En *Forest Microbiology* (pp. 373–388). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-21903-0.00022-9>
- Ascough, G. D., & Fennell, C. W. (2004). The regulation of plant growth and development in liquid culture. *South African Journal of Botany*, 70(2), 181–190. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30234-9](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30234-9)
- Azizi, P., Rafii, M. Y., Maziah, M., Abdullah, S. N. A., Hanafi, M. M., Latif, M. A., Rashid, A. A., & Sahebi, M. (2015). Understanding the shoot apical meristem regulation: A study of the phytohormones, auxin and cytokinin, in rice. *Mechanisms of Development*, 135, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2014.11.001>
- Bai, S., Chen, L., Yund, M. A., & Sung, Z. R. (2000). Mechanisms of plant embryo development. *Current Topics in Developmental Biology*, 50, 61–88. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(00\)50004-0](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(00)50004-0)
- Batista-Silva, W., de Paiva Gonçalves, J., Siqueira, J. A., Martins, A. O., Ribeiro, D. M., Nunes-Nesi, A., Zsögön, A., & Araújo, W. L. (2024). Auxin metabolism and the modulation of plant growth. *Environmental and Experimental Botany*, 226, 105917. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2024.105917>
- Bouchez, D., Uyttewaal, M., & Pastuglia, M. (2024). Spatiotemporal regulation of plant cell division. *Current Opinion in Plant Biology*, 79, 102530. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2024.102530>
- Cárdenas-Aquino, M. D. R., Camas-Reyes, A., Valencia-Lozano, E., López-Sánchez, L., Martínez-Antonio, A., & Cabrera-Ponce, J. L. (2023). The Cytokinins BAP and 2-iP Modulate Different Molecular Mechanisms on Shoot Proliferation and Root Development in Lemongrass (*Cymbopogon citratus*). *Plants*, 12(20), 3637. <https://doi.org/10.3390/plants12203637>
- Dávila, P., Arizmendi, M. D. C., Valiente-Banuet, A., Villaseñor, J. L., Casas, A., & Lira, R. (2002). Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Biodiversity and Conservation*, 11(3), 421–442. <https://doi.org/10.1023/A:1014888822920>
- Desai, P., Desai, S., Rafaliya, R., & Patil, G. (2022). Plant tissue culture: Somatic embryogenesis and organogenesis. En *Advances in Plant Tissue Culture* (pp. 109–130). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00006-0>
- Domínguez-Rosales, M. S., Alpuche-Solís, Á. G., Vasco-Méndez, N. L., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2008). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(4), 317. <https://doi.org/10.35196/rfm.2008.4.317>
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis — Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(4), 385–402. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>
- Flores-Maya, S., Vargas-Jurado, M. Á., Suárez-Mota, M. E., & Barrera-Escorcia, H. (2015). Análisis cariotípico de *Agave marmorata* y *A. peacockii* (Agavaceae) ubicados en las terrazas aluviales del río Zapotitlán, Puebla, México. *Polibotánica*, 0(40). <https://doi.org/10.18387/polibotanica.40.7>
- García-Mendoza, A. (2002). *Distribution of agave (Agavaceae) in México*. *Cactus and Succulent Journal*, 74(4), pp. 177-188.

- Gulzar, B., Mujib, A., Malik, M. Q., Sayeed, R., Mamgain, J., & Ejaz, B. (2020). Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00047-5>
- Gutiérrez-Mora, A., Rodríguez-Garay, B., Contreras-Ramos, S. M., Kirchmayr, M. R., & González-Ávila, M. (2014). *Sustainable and integral exploitation of agave*. CIATEJ-CONACYT, México
- Jing, H., & Strader, L. C. (2019). Interplay of auxin and cytokinin in lateral root development. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 486. <https://doi.org/10.3390/ijms20030486>
- Li, D. Z., & Pritchard, H. W. (2009). The science and economics of *ex situ* plant conservation. *Trends in Plant Science*, 14(11), 614–621. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2009.09.005>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Pérez-Zavala, M. D. L., Hernández-Arzaba, J. C., Bideshi, D. K., & Barboza-Corona, J. E. (2020). Agave: a natural renewable resource with multiple applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(15), 5324–5333. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10586>
- Radoeva, T., Vaddepalli, P., Zhang, Z., & Weijers, D. (2019). Evolution, initiation, and diversity in early plant embryogenesis. *Developmental Cell*, 50(5), 533–543. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.07.011>
- Reyes-Díaz, J. I., Arzate-Fernández, A. M., & Piña-Escutia, J. L. (2018). Fuentes de sacarosa y nitrógeno orgánico influyen en la embriogénesis somática de *Agave angustifolia*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(7), 1508–1513. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i7.1676>
- Reyes-Díaz, J. I., Arzate-Fernández, A. M., Piña-Escutia, J. L., & Vázquez-García, L. M. (2017). Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw. *Industrial Crops and Products*, 108, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.021>
- Schaller, G. E., Bishopp, A., & Kieber, J. J. (2015). The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development. *The Plant Cell*, 27(1), 44–63. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133595>
- Su, Y. H., Liu, Y. B., & Zhang, X. S. (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. En *Molecular Plant* (Vol. 4, Número 4, pp. 616–625). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr007>
- Teale, W., & Palme, K. (2018). Naphthylphthalamic acid and the mechanism of polar auxin transport. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 303–312. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx323>
- Tian, R., Paul, P., Joshi, S., & Perry, S. E. (2020). Genetic activity during early plant embryogenesis. *Biochemical Journal*, 477(19), 3743–3767. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190161>
- Trejo, L., Soriano, D., Romano-Grande, E., Sánchez-Carmona, B., & Dávila-Navarro, D. E. (2024). Diversity of reproductive characters, seed set, and viability of *Agave* seeds used for pulque production and their wild relatives in Tlaxcala, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 71(6), 2877–2903. <https://doi.org/10.1007/s10722-023-01803-5>
- Wang, F.-X., Shang, G.-D., & Wang, J.-W. (2022). Towards a hierarchical gene regulatory network underlying somatic embryogenesis. *Trends in Plant Science*, 27(12), 1209–1217. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.06.002>
- Węgrzynowicz-Lesiak, E., Góraj, J., Miyamoto, K., Ueda, J., & Saniewski, M. (2013). Effects of auxin polar transport inhibitors on the growth of the excised fourth internode in tulips. *Journal of Horticultural Research*, 21(2), 31–39. <https://doi.org/10.2478/johr-2013-0019>
- Zeng, F., Zhang, X., Cheng, L., Hu, L., Zhu, L., Cao, J., & Guo, X. (2007). A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic

Recibido:
11/julio/2025

Aceptado:
5/diciembre/2025

- embryogenesis. *Genomics*, 90(5), 620–628. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.07.007>
- Zhang, W., Zhang, L., Jiang, W., Yang, H., Yang, T., Zhao, Y., Zhang, Z., & Ma, Y. (2025). DNA methylation regulates somatic stress memory and mediates plasticity during acclimation to repeated sulfide stress in *Urechis unicinctus*. *Journal of Hazardous Materials*, 487, 137264. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2025.137264>
- Zizumbo-Villarreal, D., González-Zozaya, F., Olay-Barrientos, A., Platas-Ruiz, R., Cuevas-Sagardí, M., Almendros-López, L., & Colunga-GarcíaMarín, P. (2009). Archaeological Evidence of the Cultural Importance of *Agave* spp. in Pre-Hispanic Colima, Mexico. *Economic Botany*, 63(3), 288–302. <https://doi.org/10.1007/s12231-009-9092-5>