



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**Establecimiento de un protocolo eficiente para la
regeneración de planta de *Agave* spp., mediante
embriogénesis somática directa.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES**

PRESENTA

LAURA ACOSTA VILLAGRAN

COMITÉ DE TUTORES:

DR. AMAURY MARTÍN ARZATE FERNÁNDEZ

DR. JERICO JABIN BELLO BELLO

DR. JOSE LUIS PIÑA ESCUTIA

EL CERRILLO PIEDRAS BLANCAS, TOLUCA, MÉXICO. AGOSTO, 2024

RESUMEN

Agave cupreata es una especie que solo se puede reproducir por semillas y llega a tardar hasta 15 años en obtenerse la floración colocándose en riesgo de extinción debido a su explotación agroindustrial para la producción de mezcal. Como objetivo se evaluó el tipo de explante, el complejo vitamínico y concentraciones de 2,4-D sobre la respuesta embriogénica directa. En la metodología se evaluaron los explantes de secciones de hoja, raíz y tallo. También, las vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) y L2 (Phillips y Collins, 1979), cinco concentraciones de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), (0.0, 0.1, 0.3, 0.6 y 0.9 mg L⁻¹) y seis concentraciones de ácido indol-3-acético (AIA), (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mg L⁻¹) fueron evaluadas para la expresión de embriones somáticos de manera directa. **Resultados:** El explante de hoja, el complejo vitamínico L2, y las concentraciones de 0.9 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ de AIA resultaron ser los más eficientes para la formación de masas pro-embriogénicas y la expresión de embriones somáticos directos en estado globular. **Conclusiones:** Por primera vez, se evidenció la expresión exitosa de embriones somáticos directamente a partir de explantes en *A. cupreata*.

ABSTRACT

Agave cupreata is a species that can only reproduce by seeds and takes up to 15 years to obtain flowering, placing it at risk of extinction due to its agroindustrial exploitation for the production of mezcal. The objective was to evaluate the type of explant, the vitamin complex and 2,4-D concentrations on the direct embryogenic response. In the methodology, explants of leaf, root and stem sections were evaluated. Also, vitamins MS (Murashige and Skoog, 1962) and L2 (Phillips and Collins, 1979), five concentrations of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), (0.0, 0.1, 0.3, 0.6 and 0.9 mg L⁻¹) and six concentrations of indole-3-acetic acid (IAA), (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 and 3.0 mg L⁻¹) were evaluated for the expression of somatic embryos directly. **Results:** The leaf explant, the vitamin L2 complex, and the concentrations of 0.9 mg L⁻¹ of 2,4-D and 0.5 mg L⁻¹ of IAA turned out to be the most efficient for the formation of pro-embryogenic masses and the expression of direct somatic embryos in the globular state. **Conclusions:** For the first time, the successful expression of somatic embryos directly from explants in *A. cupreata* was evidenced.

CONTENIDO

Contenido

Establecimiento de un protocolo eficiente para la regeneración de planta de agave spp. Mediante embriogénesis somática directa.	1
RESUMEN	2
DEDICATORIA.....	¡Error! Marcador no definido.
AGRADECIMIENTOS	¡Error! Marcador no definido.
CONTENIDO	4
1. LISTA DE TABLAS E ILUSTRACIONES.....	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	8
2.1 Antecedentes	8
2.2 Características de la especie	8
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. HIPÓTESIS.....	10
5. OBJETIVOS	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS	12
6.1 Origen del material biológico	12
6.2 Desinfección de semillas.....	12
6.3 Germinación y establecimiento (G y E).....	12
6.4 Inducción de masas pro-embriogénicas (IMPE)	13
6.5 Expresión de embriones somáticos directos (EESD).....	13
6.6 Análisis estadístico	14
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
7.1 Efecto del explante sobre la expresión embriogénica directa en <i>A. cupreata</i>	15
7.2 Efecto del complejo vitamínico sobre la expresión embriogénica directa en <i>A. cupreata</i>	16
7.3 Efecto del 2,4-D sobre la expresión de masas pro-embriogénicas en <i>A. cupreata</i>	17
7.4 Efecto del AIA sobre la expresión de embriones somáticos directos en <i>A. cupreata</i>	18
8.- CONCLUSIÓN	19
9.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
10.ANEXO.....	22

1. LISTA DE TABLAS E ILUSTRACIONES

Tabla 1. Efecto del explante sobre la expresión embriogénica directa en <i>A. cupreata</i>.....	18
Tabla 2. Efecto de dos complejos vitamínicos sobre la expresión embriogénica directa en <i>A. cupreata</i>.....	19
Tabla 3. Efecto del 2,4-D sobre la formación de masas pro-embriogénicas en <i>A. cupreata</i>.....	19
Tabla 4. Efecto del AIA sobre la expresión de embriones somáticos directos en <i>A. cupreata</i>.....	20
Figura 1. Obtención de explantes para la expresión embriogénica directa en <i>A. cupreata</i>.	15
Figura 2. Expresión embriogénica directa en <i>A. cupreata</i>.	17

INTRODUCCIÓN

El uso diversificado de las especies de *Agave* en México es de gran importancia, comúnmente conocidas como magueyes, ya que se emplean en una variedad de aplicaciones que van desde la alimentación hasta la construcción, pasando por la producción de fibras, medicamentos, mieles y jarabes, así como en la elaboración de bebidas fermentadas y destiladas como el mezcal, entre otros usos (Vázquez-Delfin *et al.*, 2022).

En el Estado de Guerrero, una de las principales especies de *Agave* empleada para la producción de mezcal es el *Agave cupreata*, caracterizado por su incapacidad para generar hijuelos, lo que implica que su reproducción se limita exclusivamente a partir de semillas (Urbina *et al.*, 2018). Sin embargo, estos agaves requieren un periodo de entre 7 y 15 años para alcanzar la madurez sexual y, al ser semélparos, florecen una sola vez en su ciclo de vida, pereciendo después de este proceso (Ch *et al.*, 2015). Esta situación ha colocado al *A. cupreata* en una posición vulnerable y en peligro de extinción, lo que ha motivado un creciente interés en el desarrollo de tecnologías que faciliten su manejo, mejoramiento y propagación masiva.

Entre las alternativas prometedoras se encuentra la aplicación de técnicas derivadas de la biotecnología vegetal, como la embriogénesis somática (ES), que constituye un método alternativo para la propagación masiva de plantas. La ES permite la regeneración de plantas *in vitro* mediante la totipotencia celular, lo que posibilita que las células vegetales somáticas cultivadas *in vitro* puedan formar embriones de manera similar a la embriogénesis cigótica (Ossai *et al.*, 2024).

Los embriones somáticos pueden originarse a partir de células que han pasado por un proceso de desdiferenciación, como en el caso de callos o suspensiones celulares, lo que se conoce como embriogénesis somática indirecta (ESI), o bien, sin pasar por dicho proceso de desdiferenciación, en lo que se denomina embriogénesis somática directa (ESD) (Von Arnold *et al.*, 2002). En este último caso, los embriones somáticos se desarrollan directamente sobre el tejido de la planta.

Durante la ES, los eventos celulares y morfogenéticos están controlados por una serie de condiciones de cultivo y efectos genéticos (Fambrini *et al.*, 2022). Un factor crucial que determina la capacidad embriogénica del cultivo *in vitro* es el tipo de explante, dado que

cualquier tejido somático vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión mediante la manipulación de las condiciones de cultivo y la aplicación de reguladores del crecimiento vegetal (RCV), los cuales son considerados como los mensajeros químicos responsables de la formación y el crecimiento de los diferentes órganos vegetales (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016). Entre estos reguladores se encuentran las auxinas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cuya respuesta está modulada por su biosíntesis, degradación, conjugación, transporte e interacción con otros RCV.

Teniendo en cuenta estos aspectos, se llevó a cabo el presente estudio con el objetivo de determinar el tipo de explante, complejo vitamínico y las concentraciones adecuadas de 2,4-D y AIA para establecer la respuesta embriogénica directa en *A. cupreata*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes

El *Agave cupreata*, también conocido como maguey de hoja ancha, es una especie endémica de México, particularmente de la región de Guerrero y Michoacán. Esta planta es reconocida por su importancia económica, especialmente en la producción de mezcal, un destilado tradicional que ha ganado popularidad tanto a nivel nacional como internacional. La distribución de *A. cupreata* es restringida, ya que se encuentra principalmente en la cuenca del Río Balsas, lo que la hace vulnerable a la sobreexplotación y a la pérdida de hábitat. (Mendoza et al., 2015)

2.2 Características de la especie

Agave cupreata es una planta perenne que presenta un crecimiento en roseta. Sus hojas son grandes, suculentas y terminan en espinas. A diferencia de otros agaves, esta especie no se reproduce fácilmente de manera vegetativa, lo que significa que su reproducción depende en gran medida de la polinización por animales, como murciélagos y aves. La floración ocurre entre febrero y marzo, y la planta puede tardar de 7 a 15 años en alcanzar la madurez reproductiva. (Avedaño et al 2015).

La embriogénesis somática en *Agave cupreata* no solo contribuye a la producción de plantas con características deseables, sino que también ofrece una alternativa viable para la conservación de esta especie, que enfrenta amenazas debido a la explotación comercial y la pérdida de hábitat. La capacidad de generar plantas idénticas a la planta madre a través de este proceso es fundamental para mantener la diversidad genética y asegurar la sostenibilidad de su uso en la producción de mezcal. (López et al., 2020)

La investigación sobre la embriogénesis somática en *Agave cupreata* es prometedora y podría jugar un papel crucial en la conservación y mejora de esta especie. A medida que se desarrollan y optimizan los protocolos de cultivo in vitro, se espera que estas técnicas contribuyan a la sostenibilidad de las poblaciones de *Agave cupreata* y a la economía de las comunidades que dependen de su producción.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, existe un número limitado de trabajos de investigación utilizados para propagar *Agave cupreata*, mediante embriogénesis somática directa (ESD), debido a que tiene una tasa menor de proliferación comparada con la forma indirecta, sin embargo esta última presenta cambios genéticos en las plantas regeneradas, también llamada variación somaclonal, esto le da una ventaja a la ESD, pues su estabilidad genética se mantiene y se puede regenerar en un menor tiempo, Además, el uso de reguladores como el ácido indolacético (AIA) endógeno está demostrando ser crucial para inducir eficazmente la ESD. Esta técnica promete ser una alternativa eficiente y confiable para la propagación y conservación de *A. cupreata*, respondiendo a la necesidad de mantener la uniformidad genética y la adaptabilidad.

4. HIPÓTESIS

El tipo de tejido como fuente de explante, las concentraciones de 2,4- D , las vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979) y MS (Murashige y Skoog, 1962), el Ácido Indol Acético (AIA), tienen un efecto para estimular la expresión embriogénica en tejidos de *Agave cupreata*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Obtener la expresión de embriones somáticos directos en *A. cupreata*

5.2 Objetivos específicos

- Determinar el tipo de explante con mayor potencial embriogénico.
- Evaluar el efecto de las vitaminas MS y L2, en el medio de cultivo para la expresión de masas proembriogénicas directas.
- Evaluar la mejor concentración de auxina 2,4-D en la expresión de masas proembriogénicas
- Evaluar AIA en diferentes concentraciones sobre la respuesta embriogénica de *Agave cupreata*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Origen del material biológico

Las semillas de *A. cupreata* utilizadas en este estudio fueron recolectadas en la Sierra de Chilpancingo, Estado de Guerrero.

6.2 Desinfección de semillas

Para garantizar condiciones asépticas, las semillas se sometieron a un riguroso proceso de desinfección. Primero, se sumergieron en una solución de agua estéril y jabón líquido Antibenzil NF[®] durante 5 minutos, con la adición de dos gotas de Tween 20. Luego, se trataron con etanol al 70% durante un minuto, seguido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂ 3%) durante 10 minutos. Posteriormente, se sumergieron en hipoclorito de calcio (CaClO 8%) durante 15 minutos y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. A continuación, se expusieron a hipoclorito de sodio (NaClO 1%) durante 15 minutos y se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril. Todos estos procedimientos se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar para mantener condiciones asépticas. Finalmente, las semillas se dejaron reposar en peróxido de hidrógeno (H₂O₂ 1%) a 4°C durante 24 horas.

6.3 Germinación y establecimiento (G y E)

Las semillas desinfectadas se sembraron para su germinación en recipientes de vidrio con un volumen de 250 ml (Figura 1A). Se utilizó un medio de cultivo compuesto por sales inorgánicas MS al 25% (Murashige y Skoog, 1962), 30 g L⁻¹ de sacarosa y 0.5 g L⁻¹ de carbón activado (Sigma), sin la presencia de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) y gelificado con agar al 5 g L⁻¹. Este medio se esterilizó en una autoclave vertical a 121°C y 1.1 kg/cm² de presión durante 20 minutos. El pH del medio se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH o HCl 1.0 N o 0.1 N. Las semillas se mantuvieron bajo condiciones de luz (fotoperiodo de 16 h) y una intensidad lumínica de 33 μmol⁻² s⁻¹ a 25°C hasta su germinación y desarrollo a plántula.

Después de 3 meses, las plántulas obtenidas, con un promedio de 6 cm de altura, se utilizaron como fuente de explante (Figura 1B).



Figura 1. Obtención de explantes para la expresión embriogénica directa en *A. cupreata*. A) Semillas germinadas a los 15 días. B) Plántula a las 12 semanas después de la germinación. C) Explantes de hoja, tallo y raíz.

6.4 Inducción de masas pro-embriogénicas (IMPE)

Para inducir la formación de embriones somáticos directos, se emplearon tres tipos de explantes: se tomaron secciones de hoja (0.5 - 1.0 cm), secciones de raíz (1.0 - 1.5 cm) y tallos (seccionados a la mitad de forma transversal) como explante para el siguiente paso del proceso (Figura 1C).

Estos explantes se transfirieron a un medio de cultivo formulado con sales MS al 25%, suplementado con cinco concentraciones de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0.0, 0.1, 0.3, 0.6 y 0.9 mg L⁻¹), complejo vitamínico L2 (Phillips y Collins, 1979) o MS, 60 g L⁻¹ de sacarosa y gelificado con agar al 8 g L⁻¹. Todos los cultivos se mantuvieron en condiciones de total oscuridad durante 60 días a 25°C. La observación de la presencia de masas pro-embriogénicas o divisiones asimétricas y la ausencia de callo en los explantes indicó el inicio de la embriogénesis somática.

6.5 Expresión de embriones somáticos directos (EESD)

Después de 60 días, las masas pro-embriogénicas obtenidas en la fase de IMPE se trasladaron a un medio de cultivo para la expresión de embriones somáticos, compuesto por sales MS al 50%, 30 g L⁻¹ de sacarosa y gelificado con agar al 7 g L⁻¹. En esta etapa, se evaluaron seis concentraciones de ácido indolacético (AIA) (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mg L⁻¹). Los explantes se mantuvieron en condiciones de total oscuridad durante 60 días a 25°C,

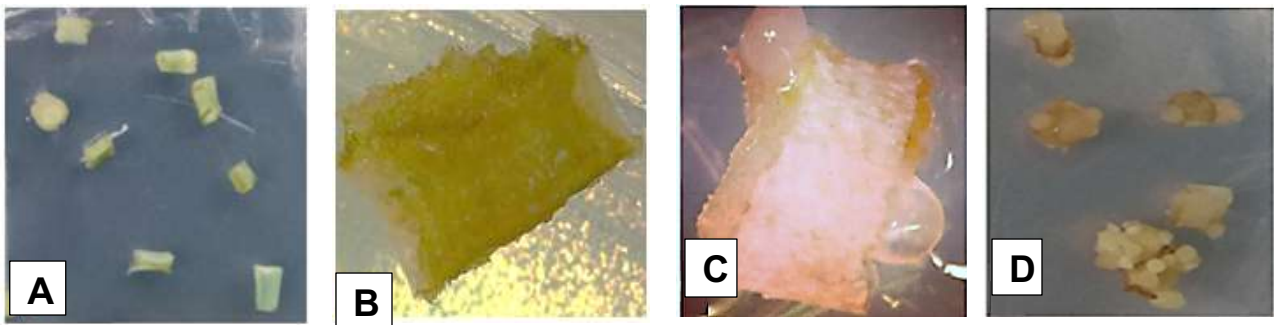
hasta obtener los embriones somáticos globulares.

6.6 Análisis estadístico

Para la etapa de IMPE el experimento consistió en un diseño completamente aleatorizado con arreglo trifactorial (explante x complejo vitamínico x 2,4-D) (3x2x5), con tres repeticiones para cada factor. En la fase de EESD el experimento tuvo un diseño completamente al azar con tres repeticiones por cada concentración de AIA. Para todos los casos los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico InfoStat, versión 2017.

7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los explantes de hoja de *A. cupreata* (Figura 2A) se observó la formación de masas proembriogénicas (Figura 2B) a partir de las cuales se obtuvo la expresión de embriones globulares de coloración transparente (Figura 2C) que se desarrollaron cambiando su coloración y consistencia (Figura 2D, 2E), los cuales, una vez desprendidos del explante inicial (Figura 2F), mostraron un aumento gradual en su tamaño a lo largo del tiempo, superando los 2 mm en los primeros 20 días (Figura 2G) después de ser transferidos al medio EESD hasta alcanzar su tamaño máximo de 3.7 mm a 4 mm a los 60 días transferidos al medio EESD (Figura 2H).



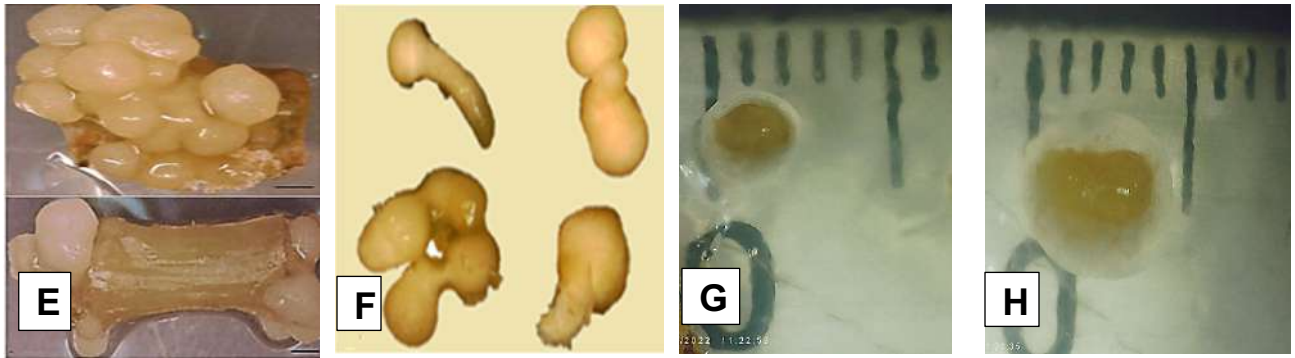


Figura 2. Expresión embriogénica directa en *A. cupreata*. A) Explantes de hoja. B) Explante de hoja con formación de masa pro-embriogénica. C, D y E) Expresión de embriones somáticos directos en estado globular en explantes de hoja. F) Embriones somáticos directos en forma globular separados del explante. G) Embrión globular con un tamaño de 2 mm (20 días después de transferirse al medio para EESD). H) Embrión globular con un tamaño de 4 mm (60 días después de transferirse al medio EESD).

Es importante destacar que estos embriones se formaron de manera directa, es decir, sin pasar por la formación previa de callo, este fenómeno de formación de embriones globulares coincide con la etapa de desarrollo globular reportada para otras especies de *Agave*, como *A. fourcroydes* (Monja-Mio y Robert, 2013) y *A. victoria-reginae* (Rodríguez-Garay *et al.*, 1996). Sin embargo, hasta el momento, la expresión embriogénica directa en *A. cupreata* no había sido documentada, lo que convierte a este estudio en el primer reporte de expresión embriogénica directa para esta especie.

7.1 Efecto del explante sobre la expresión de masas proembriogénicas directas en *A. cupreata*

La embriogénesis somática, es un proceso clave en la propagación vegetal *in vitro*, el cual ha sido objeto de numerosos estudios en diversas especies de *Agave*. Se ha demostrado que la elección adecuada de explantes es fundamental para inducir este fenómeno tanto de manera directa como indirecta. En este contexto, diferentes tejidos han sido explorados con éxito para este propósito, investigaciones previas han utilizado explantes de tallo para inducir embriogénesis somática en especies como *A. victoria-reginae* (Rodríguez-Garay *et al.*, 1996), *A. sisalana* (Nikam *et al.*, 2003) y *A. fourcroydes* (Monja-Mio y Robert, 2013). Sin embargo, en el presente estudio, se amplió esta exploración evaluando explantes de hoja, tallo y raíz en *A. cupreata* (Figura 1C) para la inducción de la formación de embriones somáticos directos.

Los resultados obtenidos revelaron diferencias altamente significativas entre los diferentes tipos de explantes (Tabla 1), destacando que los explantes de hoja mostraron la mayor eficacia en la producción de embriones, con un promedio de 5 embriones por explante. Estos hallazgos coinciden con investigaciones previas en otras especies de *Agave*, como *A. victoria-reginae*, donde también se observó que los explantes foliares son propicios para la expresión directa de embriones somáticos (Martínez-Palacios, 2003). Esta respuesta favorable podría atribuirse a la presencia de segmentos intermedios dentro de las hojas, donde se concentra la zona de elongación celular cuyas células se encuentran en un estado activo de división y al ser una región fotosintéticamente activa, las células tienen una tasa metabólica alta y pueden adaptarse mejor a las condiciones del medio de cultivo (Ferreira *et al.*, 2022), lo que podría favorecer la proliferación y desarrollo de embriones somáticos.

Tabla 1. Efecto del explante sobre la expresión de masas proembriogénicas directas en *A. cupreata*.

Explante	Expresión de masas pro-embriogénicas (%)	Embriones somáticos directos por explante*
Hoja	50.0	5 ^a
Tallo	30.0	3 ^b
Raíz	20.0	2 ^b

*Letras iguales no hay diferencias significativas

7.2 Efecto del complejo vitamínico sobre la expresión proembriogénicas directa en *A. cupreata*

La evaluación de complejos vitamínicos en la embriogénesis somática directa emerge como un aspecto crucial en la optimización de este proceso en cultivos de tejidos vegetales. Los resultados de la prueba de Tukey revelaron que las vitaminas L2 demostraron ser las más eficaces para la expresión de masas pro-embriogénicas (60%) y la formación directa de embriones somáticos, alcanzando una media de 108 embriones por explante, en contraste con las vitaminas MS, que solo permitieron la formación de 72 embriones somáticos. Estos hallazgos se alinean con la investigación de (Reyes-Díaz *et al.*, 2020), quienes destacan la importancia de la formulación del complejo vitamínico L2 y el impacto positivo de la adición

de tiamina al medio de cultivo para estimular la producción de un mayor número de embriones somáticos en *A. angustifolia*. Se ha descrito que durante la embriogénesis somática, las células en desarrollo requieren una cantidad significativa de energía para crecer y diferenciarse (Von Arnold *et al.*, 2002), al respecto, la tiamina podría influir de manera positiva en este proceso debido a que se ha reportado como un cofactor enzimático fundamental que participa en reacciones de descarboxilación oxidativa e interviene en el metabolismo de carbohidratos proporcionando ATP a las células (Al-Khayri, 2001). Además, se le ha atribuido a la tiamina funciones específicas en la regulación de la expresión genética primordial en la etapa de reproducción celular (Goyer, 2010). Asimismo, estas observaciones respaldan los resultados previamente documentados en otras especies de *Agave*, como *A. angustifolia* (Reyes-Díaz *et al.*, 2017), *A. fourcroydes* (Monja-Mio y Robert, 2013) y *A. victoria-reginae* (Rodríguez-Garay *et al.*, 1996), donde la utilización de las vitaminas L2 en el medio de inducción para la embriogénesis somática, tanto en su modalidad directa como indirecta, ha demostrado ser efectiva.

Este hallazgo resalta la importancia de considerar cuidadosamente la composición del medio de cultivo, particularmente la formulación de vitaminas, como un factor determinante en la eficiencia y el éxito de la embriogénesis somática directa en *A. cupreata*.

Tabla 2. Efecto de dos complejos vitamínicos sobre la expresión embriogénica directa en *A. cupreata*.

Complejo vitamínico	Expresión de masas pro-embriogénicas (%)	Embriones somáticos directos por explante*
L2	60.0	108 ^a
MS	40.0	72 ^b

*Letras iguales no hay diferencias significativas

7.3 Efecto del 2,4-D sobre la expresión de masas pro-embriogénicas en *A. cupreata*

La concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en el medio de cultivo es considerada como un factor crítico que ejerce una influencia significativa en la embriogénesis somática directa. Este compuesto puede desempeñar un papel clave al estimular la división celular y la proliferación de células mediante la producción endógena de ácido abscísico (Kikuchi *et al.*, 2006), lo que lo convierte en un elemento esencial para la optimización del

proceso de embriogénesis somática. Reportes previos han reportado la eficiencia del 2,4-D para la formación de embriones somáticos directos en *A. victoria-reginae* (0.3 mg L⁻¹) (Rodríguez-Garay *et al.*, 1996) y en *A. fourcroydes* (0.1 a 1.0 mg L⁻¹) (Monja-Mio y Robert, 2013). En el presente estudio, el análisis estadístico reveló diferencias altamente significativas entre las concentraciones de 2,4-D y su influencia en la expresión embriogénica directa, de acuerdo con los resultados obtenidos, solo la concentración de 0.9 mg L⁻¹ de 2,4-D permitió la formación eficiente de masas pro-embriogénicas (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto del 2,4-D sobre la formación de masas pro-embriogénicas en *A. cupreata*.

2,4-D mg L ⁻¹	Expresión de masas pro-embriogénicas (%)
0.9	90.0 ^a
0.6	5.0 ^b
0.3	5.0 ^b
0.1	0.0 ^c
0.0	0.0 ^c

*Letras iguales no hay diferencias significativas

7.4 Efecto del AIA sobre la expresión de embriones somáticos directos en *A. cupreata*

Se ha reportado que la cantidad de ácido indol-3-acético (AIA) presente en el medio de cultivo influye significativamente en procesos celulares como la división, elongación y diferenciación (Martín *et al.*, 2000). El análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas entre las distintas concentraciones de AIA y su efecto en la expresión directa de los embriones somáticos. Según los resultados obtenidos, únicamente la concentración de 0.5 mg L⁻¹ de AIA favoreció la formación eficaz de embriones somáticos (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto del AIA sobre la expresión de embriones somáticos directos en *A. cupreata*.

AIA mg L ⁻¹	Embriones somáticos directos por explante*
3.0	0 ^b
2.0	0 ^b
1.0	0 ^b
0.5	7 ^a
0.1	0 ^b
0.0	0 ^b

*Letras iguales no hay diferencias significativas

8.- CONCLUSIÓN

Por primera vez, se está reportando la expresión exitosa de embriones somáticos directamente a partir de explantes en *A. cupreata*, este experimento reveló que los explantes de hoja, el complejo vitamínico L2, la concentración de 0.9 mg L⁻¹ de 2,4-D y de 0.5 mg L⁻¹ de AIA demostraron ser los más eficientes en la producción de embriones somáticos directos.

En conjunto, estas conclusiones subrayan la importancia de estos factores en la embriogénesis somática directa, proporcionando información valiosa para la optimización de este proceso y para futuras investigaciones en la propagación *in vitro* de esta especie, asimismo es necesario continuar con el trabajo de investigación para favorecer la germinación de los embriones somáticos hasta alcanzar la regeneración de plántulas.

9.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Khayri, J. M. (2001). Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37(4), 453–456. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0079-x>
- Avendaño-Arrazate, C. H., et al. (2015). Caracterización morfológica de *Agave cupreata*, especie endémica de Guerrero, México. *Fyton*, 84(1), 148-162. Recuperado de <https://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v84n1/v84n1a22.pdf>
- Ch, A.-A., Iracheta-Donjuan, L., Gódinez-Aguilar, J., López-Gómez, P., & Barrios-Ayala, A. (2015). Morphological characterization of endemic *Agave cupreata* species of Mexico. *Phyton*, 84(1), 148–162. <https://doi.org/10.32604/phyton.2015.84.148>
- Fambrini, M., Usai, G., & Pugliesi, C. (2022). Induction of Somatic Embryogenesis in Plants: Different Players and Focus on WUSCHEL and WUS-RELATED HOMEBOX (WOX) Transcription Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15950. <https://doi.org/10.3390/ijms232415950>
- Ferreira, J. C. B., De Araújo Silva-Cardoso, I. M., Meira, R. O., Da Silva Costa, F. H., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2022). Towards development of an efficient somatic embryogenesis protocol for the palm tree *Euterpe precatoria* (Mart.) from leaf tissues of adult plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 58(5), 750–768. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10310-8>
- Goyer, A. (2010). Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry*, 71(14–15), 1615–1624. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.06.022>
- Kikuchi, A., Sanuki, N., Higashi, K., Koshiba, T., & Kamada, H. (2006). Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta*, 223(4), 637–645. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0114-y>
- López, A. M., et al. (2020). *Efecto de citocininas en la propagación in vitro de Agave cupreata*. Revista Fitotecnia Mexicana, 43(1), 1-10. <https://revfitotecnia.mx/index.php/RFM/article/view/700>
- Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (Eds.). (2016). *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0>
- Martín, J. P., Pintos, B., Rebordinos, I., Villalobos, N., Guerra, H., & Martín, L. (2000). Embryogenic response in different *Medicago arborea* L. Explants Depending on Cytokinin/Auxin Balances. *Journal of Plant Physiology*, 156(5–6), 801–804. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80251-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80251-5)
- Martínez-Palacios, A. (2003). Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(2),

135–142. <https://doi.org/10.1023/A:1023933123131>

Mendoza Celino, S., Rodríguez-Trejo, D. A., Granados Sánchez, D., Carrasco Hernández, V., Mohedano Caballero, L., & Tchikoué, H. (2015). *Agave cupreata* (Trel. & A. Berger) (Asparagaceae). Recuperado de https://rngr.net/publications/semillas-de-especies-forestales/monografias/agave-cupreata-trel.-a.-berger-asparagaceae/at_download/file

Monja-Mio, K. M., & Robert, M. L. (2013). Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49(5), 541–549. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9535-7>

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Nikam, T. D., Bansude, G. M., & Aneesh Kumar, K. C. (2003). Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex. Engelm). *Plant Cell Reports*, 22(3), 188–194. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0675-9>

Ossai, C. O., Balogun, M. O., & Maroya, N. G. (2024). Status and prospects of yam somatic embryogenesis: A pathway for biotechnology applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. <https://doi.org/10.1007/s11627-024-10413-4>

Phillips, G. C., & Collins, G. B. (1979). In Vitro Tissue Culture of Selected Legumes and Plant Regeneration from Callus Cultures of Red Clover ¹. *Crop Science*, 19(1), 59–64. <https://doi.org/10.2135/cropsci1979.0011183X001900010014x>

Reyes-Díaz, J. I., Arzate-Fernández, A. M., Piña-Escutia, J. L., & Norman-Mondragón, T. H. (2020). The effect of inositol, pyridoxine, and thiamine on somatic embryogenesis of *Agave angustifolia*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(1). <https://doi.org/10.56369/tsaes.3007>

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>

Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A., & Acosta-Dueñas, B. (1996). Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46(1), 85–87. <https://doi.org/10.1007/BF00039700>

Urbina, C. J. F., Casas, A., Martínez-Díaz, Y., Santos-Zea, L., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2018). Domestication and saponins contents in a gradient of management intensity of agaves: *Agave cupreata*, *A. inaequidens* and *A. hookeri* in central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65(4), 1133–1146. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0601-6>

Vázquez-Delfin, P., Casas, A., & Vallejo, M. (2022). Adaptation and biocultural conservation of traditional agroforestry systems in the Tehuacán Valley: Access to resources and livelihoods strategies. *Heliyon*, 8(7), e09805. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09805>

Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 233–249. <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>

10. ANEXO

The certificate features logos for AGRICULTURA (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural), CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), and CIATEJ at the top. The background is a light green pattern of agave leaves. The text is centered and reads: 'El Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Otorgan el presente RECONOCIMIENTO a Laura Acosta-Villagrán Por su participación con la ponencia oral "Efecto del ácido indol-acético en la expresión de embriones somáticos directos en Agave cupreata" Mérida, Yucatán 12 al 14 de octubre del 2022'. Below the text is a signature in blue ink and the name 'Dra. Rosa María Camacho Ruíz' with her title 'Presidenta V Simposio Internacional de Agave'. The bottom right corner has the logo for the 'V ISA' (International Symposium on Agave).

AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

CIATEJ

El Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología
y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

Laura Acosta-Villagrán

Por su participación con la ponencia oral "Efecto del ácido
indol-acético en la expresión de embriones somáticos
directos en *Agave cupreata*"

Mérida, Yucatán 12 al 14 de octubre del 2022


Dra. Rosa María Camacho Ruíz
Presidenta V Simposio Internacional de
Agave

V ISA
International
Symposium on Agave



Otorga la presente

Constancia

A la

Ing. Laura Acosta Villagrán
Facultad de Ciencias Agrícolas

Por su participación en las **Catas de mezcal y pulque** en el marco del **Primer Seminario-Taller de Ciencia y Biotecnología del Agave y sus derivados Gastronómicos**, realizada el día 8 de junio del presente año, en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. Evento realizado para el acceso al conocimiento social con el objetivo de propiciar un intercambio de saberes entre la comunidad científica y productores.

Toluca de Lerdo, junio del 2023

Patria, Ciencia y Trabajo
"2023, Conmemoración de los 105 Años de la fundación del Instituto Literario del Estado de México"



Doctor en Ciencias Agropecuarias
Gaspar Estrada Campuzano
Director Facultad de Ciencias Agrícolas

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRÍCOLAS
DIRECCIÓN

Doctor en Ciencias Agrícolas
Maury Martín Arzate Fernández
Organizador

