

SEP

# POLIBOTÁNICA

ISSN 1405-2768

ISSN 2395-9525



Enero 2026

Núm. 61

POLIBOTÁNICA

Núm. 61

Ciencia y  
Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades,  
Tecnología e Innovación

Enero 2026



## PÁG.

## CONTENIDO

- 1 La familia *Buxaceae* en México  
*The Buxaceae family in Mexico*  
 Rafael Fernández N. | María de la Luz Arreguín Sánchez
- 23 Riqueza de epífitas vasculares en la reserva El Peñón, municipio de Valle de Bravo, Estado de México, México  
*Vascular epiphyte richness in The Peñón reserve, municipality of Valle de Bravo, Estado de México, Mexico*  
 Ivonne Gomez | Bruno Téllez | Adolfo Espejo-Serna | Ana Rosa López-Ferrari
- 55 Variación de umbrales dnbr y rbr en la detección de incendios forestales en el área Iztaccíhuatl-Popocatépetl México  
*Variation of dnbr and rbr thresholds in forest fire detection in the Iztaccihuatl-Popocatepetl area, Mexico*  
 Ederson Steven Cobo Muelas | Pablito Marcelo López Serrano | Daniel José Vega Nieva | Jose Javier Corral Rivas | José López García | Lilia de Lourdes Manzo Delgado
- 75 Dinámica fenológica mensual de especies de bosque mixto.  
*Monthly phenological dynamics of mixed forest species.*  
 Cynthia Judith Carranza Ojeda | Juan Antonio Reyes Agüero | Carlos Alfonso Muñoz Robles | Anuschka Van't Hooft | Jorge Alberto Flores Cano | José Villanueva Díaz
- 101 Servicios ecosistémicos de provisión en comunidades de pueblos Otomí y Matlazincas del Estado de México, México  
*Provision of ecosystem services in indigenous communities in the State of Mexico, Mexico*  
 Laura White-Olascoaga | David García-Mondragón | Carmen Zepeda-Gómez
- 115 Comparación de tasas de respiración del suelo en ecosistemas agrícola, agostadero y urbano en una zona semiárida en Juárez, Chihuahua, México  
*Comparison of soil respiration rates in agricultural, rangeland, and urban ecosystems at semiarid areas in Juárez, Chihuahua, Mexico*  
 Juan Pedro Flores Margez | Alejandra Valles Rodriguez | Pedro Osuna Ávila | Dolores Adilene Garcia Gonzalez
- 133 Caracterización ecológica de la zona de proliferación del hongo blanco de pino (*Tricholoma mesoamericanum*) en “El Guajolote” Hidalgo, México  
*Ecological characterization of the fruiting area of the pine white mushroom (*Tricholoma mesoamericanum*) in “El Guajolote” Hidalgo, Mexico*  
 Alvaro Alfonso Reyes Grimaldo | Ramón Razo Zárate | Oscar Arce Cervantes | Magdalena Martínez Reyes | Jesús Pérez Moreno | Rodrigo Rodríguez Laguna
- 145 Influencia de la variabilidad climática y del fenómeno ENOS en el crecimiento radial de *Pinus rzedowskii* y *P. martinezii* en Michoacán, México  
*Influence of climate variability and the ENSO phenomenon on the radial growth of *Pinus rzedowskii* and *P. martinezii* in Michoacán, Mexico*  
 Ulises Manzanilla Quiñones | Patricia Delgado Valerio | Teodoro Carlón Allende
- 165 Carácteres morfométricos y patrones de germinación de semillas de *Pinus pseudostrobus* Lindl. de diferentes procedencias  
*Morphometric characteristics and germination patterns of *Pinus pseudostrobus* Lindl. seeds from different sources*  
 Daniel Madrigal González | Nahum Modesto Sánchez-Vargas | Mariela Gómez-Romero | María Dolores Uribe-Salas | Alejandro Martínez-Palacios | Selene Ramos-Ortiz
- 181 Germinación de *Ormosia macrocalyx* Ducke (Fabaceae), árbol nativo en peligro de extinción  
*Germination of *Ormosia macrocalyx* Ducke (Fabaceae), an endangered native tree*  
 Brenda Karina Pozo Gómez | Carolina Orantes García | Dulce María Pozo Gómez | Alma Gabriela Verdugo Valdez | María Silvia Sánchez Cortés | Rubén Antonio Moreno Moreno
- 193 Propagación in vitro de callos de morera (*Morus alba* L.) como alternativa alimenticia para larvas de seda (*Bombyx mori*)  
*In vitro propagation of *Morus alba* L. calli as an alternative feed for silkworm (*Bombyx mori*) larvae*  
 Alma Rosa Hernández Rojas | José Luis Rodríguez-de la O | Alejandro Rodríguez-Ortega | Elvis García-López | Manuel Hernández-Hernández | Jessica Lizbeth Sebastián-Nicolás | Rosita Deny Romero-Santos
- 205 Mejoras en un método comercial de extracción de ADN para obtener extractos de ácido nucleico de alta calidad a partir de yemas vegetativas de *Populus tremuloides* Michx.  
*Improvements to a commercial DNA extraction method for high-quality nucleic acid extractions from *Populus tremuloides* Michx. vegetative buds*  
 Cecilia Gutierrez | Marcelo Barraza Salas | Ilga Mercedes Porth | Christian Wehenkel
- 221 Crecimiento de plántulas de *Laelia autumnalis* y *Encyclia cordigera* en función de la concentración de sacarosa y carbón activado.  
*Growth of *Laelia autumnalis* and *Encyclia cordigera* seedlings as a function of sucrose and activated charcoal concentration*  
 Marcela Cabañas Rodríguez | María Andrade Rodríguez | Oscar Gabriel Villegas Torres | Iran Alia Tejacal | Porfirio Juarez López | José Antonio Chávez García
- 235 Dinámica fenológica mensual de especies de bosque mixto  
*Montly phenological dynamics of mixed forest species*  
 Andrea Cecilia Acosta-Hernández | Eduardo Daniel Vivar Vivar | Marin Pompa-García



## PÁG.

## CONTENIDO

- 259 Efecto de hongos micorrízicos arbusculares sobre la supervivencia y el crecimiento de plantas de *Dalbergia congestiflora* propagadas in vitro y por semilla en condiciones de invernadero  
Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the survival and growth of *Dalbergia congestiflora* plants propagated in vitro and from seed under greenhouse conditions  
Enrique Ambriz | Carlos Juan Alvarado López | Yoshira López Antonio | Hebert Jair Barrales Cureño | Rafael Salgado Garciglia | Alejandra Hernández García
- 273 Crioconservación de explantes florales encapsulados de cacao (*Theobroma cacao* L.) mediante deshidratación y vitrificación  
Cryopreservation of encapsulated floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) by dehydration and vitrification  
Eliud Rodríguez Olivera | Leobardo Iracheta Donjuan | José Luis Rodríguez de la O | Carlos Hugo Avendaño Arrazate
- 295 Análisis de la diversidad genética en cacao (*Theobroma cacao* L.) y pataxte (*T. bicolor* Humb. & Bonpl.) de los estados de Tabasco y Chiapas, México  
Genetic diversity analysis in cocoa (*Theobroma cacao* L.) and pataxte (*T. bicolor* Humb. & Bonpl.) from Tabasco and Chiapas, Mexico  
Fernanda Sarahi Hernández Montes | Guadalupe Concepción Rodríguez Castillejos | Guillermo Castañón Nájera | Octelina Ruiz Castillo | Christian Asur Christian Asur | Hernán Wenceslao Araujo Torres | Régulo Ruiz Salazar
- 311 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  
Jesús-Ignacio Reyes-Díaz | Rosa María Nava-Becerril | Amaury-Martín Arzate-Fernández
- 329 Efecto del ácido salicílico en el incremento de biomasa y azúcares reductores en *Agave cupreata* y *Agave salmiana*  
Effect of salicylic acid on increase of biomass and reducing sugars in *Agave cupreata* and *Agave salmiana*  
Hilda Guadalupe GARCÍA NÚÑEZ | Amaury Martín Arzate-Fernández | Ana María Roque-Otero | Martín Rubí-Arriaga | Aurelio Domínguez-López
- 343 Contribución al conocimiento tradicional sobre el uso y manejo de los recursos vegetales en el municipio de Malinalco, Estado de México, México.  
Contribution to traditional knowledge of plant resource use and management in Malinalco, State of Mexico, Mexico  
Margarita Micaela Avila Uribe | Blanca Margarita Berdeja-Martínez | Ana María Mora-Rocha | Yajaira Cerón-Reyes | Karla Mariela Hernández-Sánchez | María Eugenia Ordóñez Vargas | Lidia Cevallos-Villanueva
- 365 La agrobiodiversidad del agroecosistema traspatio como estrategia contra la pobreza extrema en Platón Sánchez, Veracruz, México  
Agrobiodiversity in the backyard agroecosystem as a strategy against extreme poverty in Platon Sanchez, Veracruz, Mexico  
Rubén Purroy-Vásquez | Gregorio Hernández-Salinas | Jorge Armida-Lozano | Alejandro Llaguno-Aguilera | Karla Lissette Silva-Martinez | Nicolás Francisco Mateo-Díaz
- 385 Quelites entre cocineras tradicionales nahuas y totonacas de la Sierra Norte de Puebla, México  
Quelites among nahua and totonac traditional cooks from the Northern Sierra of Puebla, Mexico  
Victoria Ortiz-Trápala | Heike Vibrans | María Edelmira Linares-Mazari | Diego Flores-Sánchez
- 409 *Litsea glaucescens* y *Clinopodium macrostemum* recursos forestales no maderables en mercados tradicionales de los Valles Centrales de Oaxaca  
*Litsea glaucescens* and *Clinopodium macrostemum* non-timber forest resources in traditional markets of the Central Valleys of Oaxaca  
Domitila Jarquín-Rosales | Gisela Virginia Campos Angeles | Valentín José Reyes-Hernández | Salvador Lozano-Trejo | Juan José Alpuche-Osorno | Gerardo Rodríguez-Ortiz
- 427 Sistemas verticales rústicos para la producción de alimentos en espacios limitados: un aporte a la seguridad alimentaria familiar  
Rustic vertical home gardens for food production in limited spaces: a contribution to household food security  
Pablo Yax-Lopez | Kevin Manolo Noriega Elías | Jorge Rubén Sosof Vásquez
- 443 Orquídeas silvestres comercializadas en cinco mercados tradicionales de Oaxaca, México  
Wild orchids sold in five traditional markets in Oaxaca, Mexico  
María Hipolita Santos Escamilla | Gisela Virginia Campos Angeles | José Cruz Carrillo Rodríguez | Nancy Gabriela Molina Luna
- 457 Proceso artesanal de elaboración de jabón de corozo (*Attalea butyracea* (Mutis ex L.F.) Wess. Boer) en la región de la Chontalpa, Tabasco, México  
Artisanal process of making corozo soap (*Attalea butyracea* (Mutis ex L.F.) Wess. Boer) in the Chontalpa region, Tabasco, Mexico  
Elsa Chávez García
- 479 La comercialización de plantas del bosque tropical caducifolio y su importancia cultural en el centro de México  
The commercialization of tropical deciduous forest plants and their cultural importance in central Mexico  
Ofelia Sotelo Caro | Alejandro Flores Palacios | Susana Valencia Diaz | David Osvaldo Salinas Sánchez | Rodolfo Figueroa Brito

# POLIBOTÁNICA

Núm. 61

ISSN electrónico: 2395-9525

Enero 2026



## Portada

Sistema de cultivo vertical integrado por módulos contenedores uniformes que albergan diversas especies herbáceas y foliares. La disposición estratificada optimiza el uso del espacio y favorece la eficiencia en la captación de luz, mientras que la heterogeneidad morfológica de las plantas evidencia la plasticidad fenotípica asociada a condiciones de cultivo intensivo en ambientes urbanos. Este sistema representa una forma de infraestructura verde orientada a la producción vegetal sustentable y a la mejora microclimática en entornos metropolitanos.

BA vertical cultivation system composed of uniform container modules housing a variety of herbaceous and foliage plant species. The stratified arrangement optimizes space use and enhances light capture efficiency, while the morphological heterogeneity of the plants reflects phenotypic plasticity under intensive cultivation conditions in urban environments. This system represents a form of green infrastructure aimed at sustainable plant production and microclimate improvement in metropolitan settings.

por/by  
Rafael Fernández Nava

**REVISTA BOTÁNICA INTERNACIONAL DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**EDITOR EN JEFE**  
*Rafael Fernández Nava*

**EDITORAS ASOCIADAS**  
*Maria de la Luz Arreguín Sánchez*

**COMITÉ EDITORIAL INTERNACIONAL**

*Christiane Anderson*  
University of Michigan  
Ann Arbor. Michigan, US

*Delia Fernández González*  
Universidad de León  
León, España

*Heike Vibrans*  
Colegio de Postgraduados  
Estado de México, México

*José Angel Villarreal Quintanilla*  
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro  
Saltillo, Coahuila, México

*Hugo Cota Sánchez*  
University of Saskatchewan  
Saskatoon, Saskatchewan, Canada

*Luis Gerardo Zepeda Vallejo*  
Instituto Politécnico Nacional  
Ciudad de México, México

*Fernando Chiang Cabrera*  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Ciudad de México, México

*Claude Sastre*  
Muséum National d'Histoire Naturelle  
París, Francia

*Thomas F. Daniel*  
California Academy of Sciences  
San Francisco, California, US

*Mauricio Velayos Rodríguez*  
Real Jardín Botánico  
Madrid, España

*Francisco de Asis Dos Santos*  
Universidad Estadual de Feira de Santana  
Feira de Santana, Brasil

*Noemí Waksman de Torres*  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Monterrey, NL, México

*Carlos Fabián Vargas Mendoza*  
Instituto Politécnico Nacional  
Ciudad de México, México

*Julieta Carranza Velázquez*  
Universidad de Costa Rica  
San Pedro, Costa Rica

*José Luis Godínez Ortega*  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Ciudad de México, México

*Tom Wendt*  
University of Texas  
Austin, Texas, US

*José Manuel Rico Ordaz*  
Universidad de Oviedo  
Oviedo, España

*Edith V. Gómez Sosa*  
Instituto de Botánica Darwinion  
Buenos Aires, Argentina

*Edith V. Gómez Sosa*  
Instituto de Botánica Darwinion  
Buenos Aires, Argentina

*Dr. Juan Ramón Zapata Morales*  
Universidad de Guanajuato  
Guanajuato, México

*Jorge Llorente Bousquets*  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Ciudad de México, México

**DISEÑO Y FORMACIÓN ELECTRÓNICA**  
*Luz Elena Tejeda Hernández*

**OPEN JOURNAL SYSTEM Y TECNOLOGÍAS DE LA INFORMACIÓN**  
*Pedro Aráoz Palomino*

**POLIBOTÁNICA**, revista botánica internacional del Instituto Politécnico Nacional, incluye exclusivamente artículos que representen los resultados de investigaciones originales en el área. Tiene una periodicidad de dos números al año, con distribución y Comité Editorial Internacional.

Todos los artículos enviados a la revista para su posible publicación son sometidos por lo menos a un par de árbitros, reconocidos especialistas nacionales o internacionales que los revisan y evalúan y son los que finalmente recomiendan la pertinencia o no de la publicación del artículo, cabe destacar que este es el medio con que contamos para cuidar el nivel y la calidad de los trabajos publicados.

## **INSTRUCCIONES A LOS AUTORES PARA LA PUBLICACIÓN DE TRABAJOS**

Se aceptarán aquellos originales que se ajusten a las prescripciones siguientes:

**POLIBOTÁNICA** incluye exclusivamente artículos que representen los resultados de investigaciones originales que no hayan sido publicados.

- 1.** El autor deberá anexar una carta membretada y firmada dirigida al Editor, donde se presente el manuscrito, así como la indicación de que el trabajo es original e inédito, ya que no se aceptan trabajos publicados o presentados anterior o simultáneamente en otra revista, circunstancia que el autor(es) deberá declarar expresamente en la carta de presentación de su artículo.
- 2.** Al quedar aceptado un trabajo, su autor no podrá ya enviarlo a ninguna otra revista nacional o extranjera.
- 3.** Los artículos deberán estar escritos en español, inglés, francés o portugués. En el caso de estar escritos en otros idiomas diferentes al español, deberá incluirse un amplio resumen en este idioma.
- 4.** Como parte de los requisitos del CONACYT, **POLIBOTÁNICA** ahora usa la plataforma del Open Journal System (OJS); para la gestión de los artículos sometidos a la misma. Así que le solicitamos de la manera más atenta sea tan amable de registrarse y enviar su artículo en la siguiente liga: [www.polibotanica.mx/ojs/index.php/polibotanica](http://www.polibotanica.mx/ojs/index.php/polibotanica)
  - a) cargar el trabajo en archivo electrónico de office-word, no hay un máximo de páginas con las siguientes características:
  - b) en páginas tamaño carta, letra times new roman 12 puntos a doble espacio y 2 cm por margen
- 5.** Las figuras, imágenes, gráficas del trabajo deben estar incluidas en el documento de Word original:
  - a) en formato jpg
  - b) con una resolución mínima de 300 dpi y un tamaño mínimo de 140 mm de ancho
  - c) las letras deben estar perfectamente legibles y contrastadas
- 6.** Todo trabajo deberá ir encabezado por:
  - a) Un título tanto en español como en inglés que exprese claramente el problema a que se refiere. El formato para el título es: negritas, tamaño 14 y centrado;
  - b) El nombre del autor o autores, con sus iniciales correspondientes, sin expresión de títulos o grados académicos. El formato para los autores es: alineados a la izquierda, cada uno en un párrafo distinto y tamaño 12. Cada autor debe tener un número en formato superíndice indicando a qué afiliación pertenece;
  - c) La designación del laboratorio e institución donde se realizó el trabajo. La(s) afiliación(es) debe(n) estar abajo del grupo de autores. Cada afiliación deberá estar en un párrafo y tamaño

12. Al inicio de cada afiliación estará el número en superíndice que lo relaciona con uno o más autor/es.

d) El autor para correspondencia deberá estar en el siguiente párrafo, alineado a la izquierda, tamaño 12.

7. Todo trabajo deberá estar formado por los siguientes capítulos:

a) RESUMEN y ABSTRACT. Palabras clave y Key Words. El resumen debe venir después de la afiliación de los autores, alineado a la izquierda, tamaño 12. La palabra “Resumen: / Abstract:” debe venir en negritas y con dos puntos. El texto del resumen debe empezar en el párrafo siguiente, tamaño 12 y justificado. El texto “Palabras clave / Key Words:” debe venir en negritas seguido de dos puntos. Cada una de las palabras clave deben estar separadas por coma o punto y coma, finalizadas por punto.

b) INTRODUCCIÓN y MÉTODOS empleados. Cuando se trate de técnicas o métodos ya conocidos, solamente se les mencionará por la cita de la publicación original en la que se dieron a conocer. El formato para todas las secciones en esta lista es: negritas, tamaño 16 y centrado.

c) RESULTADOS obtenidos. Presentación acompañada del número necesario de gráficas, tablas, figuras o diagramas de tamaño muy cercano al que tendrá su reproducción impresa (19 x 14 cm).

d) DISCUSIÓN concisa de los resultados obtenidos, limitada a lo que sea original y a otros datos relacionados directamente y que se consideren nuevos.

e) CONCLUSIONES.

#### ESPECIFICACIONES DE FORMATO PARA EL CUERPO DEL TRABAJO

1. Secciones/Subtítulos de párrafo: Fuente tamaño 16, centrado, en negritas, con la primera letra en mayúscula.
2. Subsecciones/Subtítulos de párrafo secundarios : Fuente tamaño 14, centrado, en negritas, con la primera letra en mayúscula. Cuando existan subsecciones de subsección formatear en tamaño 13 negrita y centrado.
3. Cuerpo del texto: Fuente tamaño 12, justificado. NO debe haber saltos de línea entre párrafos.
4. Las notas de pie de página deben estar al final de cada página, fuente tamaño 12 justificadas.
5. Cita textual con mas de tres líneas: Fuente tamaño 12, margen izquierdo de 4 cm.
6. Título de imágenes: Fuente tamaño 12, centrado y en negritas, separado por dos puntos de su descripción. Descripción de las imágenes: tamaño 12.
7. Notas al pie de las imágenes: Fuente tamaño 12 y centradas con respecto a la imagen, la primera letra debe estar en mayúsculas.
8. Imágenes: deben estar en el cuerpo del texto, insertadas en formato png o jpg, a por lo menos 300 dpi de resolución y centradas. Las imágenes deben estar en línea con el texto. Se consideran imágenes: gráficos, cuadros, fotografías, diagramas y, en algunos casos, tablas y ecuaciones.
9. Tablas de tipo texto: El título de las columnas de las tablas debe estar en negritas y los datos del cuerpo de la tabla con fuente normal. Los nombres científicos deben estar en itálicas. Se recomienda utilizar las Tablas como imágenes, estas deberán de ir centradas (a por lo menos 300 dpi de resolución).
10. Notas al pie de la tabla: Fuente tamaño 12 y centradas con respecto a la tabla, la primera letra debe estar en mayúsculas.
11. Ecuaciones pueden estar en Mathtype 1 o en imagen. En este último caso, seguir instrucciones del punto 8.
12. Citas del tipo autor y año deben estar entre paréntesis, con el apellido del autor seguido por el año (Souza, 2007), primera letra en mayúscula.

- 8. LITERATURA CITADA**, Se tomara como base el Estilo APA para las Referencias Bibliográficas, formada por las referencias mencionadas en el texto del trabajo y en orden alfabético. Es obligatorio utilizar Mendeley® (software bibliográfico). El propósito de utilizar este tipo de software es asegurar que los datos contenidos en las referencias están correctamente estructurados y corresponden a las citas del cuerpo del texto.

## ESTRUCTURA Y FORMATO DE LOS AGRADECIMIENTOS Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Los Agradecimientos deberán estar después de la última sección del cuerpo del texto. Esta información debe tener como título la palabra “Agradecimientos”, o su equivalente en otro idioma, en negritas, tamaño 12 y centrado. El texto de esta información debe estar en tamaño 12 justificado.
2. Las Referencias bibliográficas deben estar en orden alfabético sin salto de línea de párrafo, alineados a la izquierda, en tamaño 12.
3. Apéndices, anexos, glosarios y otros materiales deben incluirse después de las referencias bibliográficas. En caso de que estos materiales sean extensos deberán ser creados como archivos PDF.

## 9. REVISIÓN Y PUBLICACIÓN

Todos los artículos enviados a la revista para su posible publicación serán sometidos a una revisión “doble ciego”, se enviaran por lo menos a un par de árbitros, reconocidos especialistas nacionales o internacionales que los revisarán y evaluarán y serán los que finalmente recomiendan la pertinencia o no de la publicación del artículo, cabe destacar que este es el medio con que contamos para cuidar el nivel y la calidad de los trabajos publicados.

Una vez aceptado el trabajo, se cobrarán al autor(es) \$299 por página más IVA, independientemente del número de fotografías que contenga.

## PUBLICATION GUIDELINES

POLIBOTÁNICA, an international botanical journal supported by the National Polytechnic Institute, only publishes material resulting of original research in the botanic area. It has a periodicity of two issues per year with international distribution and an international Editorial Committee.

All articles submitted to POLIBOTÁNICA for publication are reviewed by at least a couple of referees. National or international recognized experts will evaluate all submitted materials in order to recommend the appropriateness or otherwise of a publication. Therefore, the quality of published papers in POLIBOTÁNICA is of the highest international standards.

### FOR PUBLICATION OF ARTICLES

Originals that comply with the following requirements will be accepted:

1. POLIBOTÁNICA includes only items that represent the results of original research which have not been published. The author should attach an official and signed letter to Editor stating that the work is original and unpublished. We do not accept articles published or presented before or simultaneously in another journal, a fact that the author (s) must expressly declare in the letter.
2. When an article has been accepted, the author can no longer send it to a different national or foreign journal.
3. Articles should be written in Spanish, English, French or Portuguese. In the case of be written in

languages other than Spanish, it should include an abstract in English.

4. The article ought to be sent to the POLIBOTÁNICA's Open Journal System <http://www.polibotanica.mx/ojs> in an office-word file without a maximum number of pages with the following features:

a) on letter-size pages, Times New Roman font type, 12-point font size, double-spaced and 2 cm margin

5. The figures, images, graphics in the article must be attached as follows:

a) in jpg format

b) with a minimum resolution of 300 dpi and a minimum size of 140 mm wide

c) all characters must be legible and contrasted

6. All articles must include:

a) a title in both Spanish and English that clearly express the problem referred to. The format for this section is: bold, font size 14 and centered.;

b) the name of the author or authors, with their initials, no titles and no academic degrees. The format for this section is: font size 12, aligned to the left, each name in a different paragraph but without spaces in-between and a superscript number indicating the affiliation;

c) complete affiliations of all authors (including laboratory or research institution). The format for this section is: font size 12, aligned to the left, each name in a different paragraph but without spaces in-between and a superscript number at the beginning of the affiliation;

d) correspondence author should be in the next paragraph, font size 12 and aligned to the left.

7. All work should be composed of the following chapters:

a) RESUMEN and ABSTRACT. Palabras clave y Key Words. The format for this section is: bold, font size 12 and centered. Both words (RESUMEN: and ABSTRACT:)must include a colon, be in bold and aligned to the left. The body of the abstract must be justified and in font size 12. Both palabras clave: and keywords:must include a colon, be in bold and aligned to the left. Keywords must be separated by a comma or semicolon, must be justified and in font size 12.

b) INTRODUCTION y METHODS. In the case of techniques or methods that are already known, they were mentioned only by appointment of the original publication in which they were released.

c) RESULTS. Accompanied with presentation of the required number of graphs, tables, figures or diagrams very close to the size which will be printed (19 x 14 cm).

d) DISCUSSION. A concise discussion of the results obtained, limited to what is original and other related directly and considered new data.

e) CONCLUSIONS. The format for sections Introduction, Results, Discussion and Conclusionsis: bold, font size 16 and centered.

## FORMAT SPECIFICATIONS FOR THE BODY OF WORK

1. Sections: Font size 16, centered, bold, with the first letter capitalized.
  2. Subsections / Secondary Subtitles: Font size 14, centered, bold, with the first letter capitalized. When there are second grade subsections format in size 13 bold and centered.
  3. Body: Font size 12, justified. There should NOT be line breaks between paragraphs.
  4. Footnotes should be at the bottom of each page, font size 12 and justified.
  5. Textual quotation with more than three lines: Source size 12, left margin of 4 cm.
  6. Image Title: Font size 12, centered and bold, separated by two points from its description. Description of the images: size 12.
  7. Images Footnotes: Font size 12 and centered with respect to the image, the first letter must be in capital letters.
  8. Images: must be in the body of the text, inserted in png or jpg format, at least 300 dpi resolution and centered. Images should be in line with the text. Graphs, charts, photographs, diagrams and, in some cases, tables and equations are considered images.
  9. Text Tables: Only The title of the columns of the tables must be in bold. Scientific names must be in italics. It is recommended to use the Tables as images, they should be centered (at least 300 dpi resolution).
  10. Footnotes: Font size 12 and centered with respect to the table, the first letter must be in upper case.
  11. Equations can be in Mathtype 1 or in image. In the latter case, follow the instructions in point 8.
  12. Quotations of the author and year type must be in parentheses, with the author's last name followed by the year (Souza, 2007), first letter in capital letters.
8. LITERATURE CITED. All references must be cited using the APA stile. POLIBOTÁNICA requires the use of Mendeley® (free reference manager) for the entire bibliography.

## STRUCTURE AND FORMAT OF ACKNOWLEDGMENTS AND BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES

1. Acknowledgments must be after the last section of the body of the text. This information should be titled the word "Acknowledgments", or its equivalent in another language, in bold, size 12 and centered. The text of this information must be in size 12 justified.
2. Bibliographical references should be in alphabetical order without paragraph line jump, aligned to the left, in size 12.
3. Appendices, annexes, glossaries and other materials should be included after the bibliographic references. If these materials are extensive they should be created as PDF files.

## 9. REVIEW AND PUBLICATION

All articles submitted to the journal for publication will undergo a review "double-blind", they will be sent at least a couple of referees, recognized national or international experts that reviewed and evaluated and will be finally recommended the relevance or the publication of the article, it is noteworthy that this is the means that we have to take care of the level and quality of published articles.

Once accepted the article, the author will be charged \$15 USD per text page, regardless of how many pictures it contains.

Toda correspondencia relacionada con la revista deberá ser dirigida a:

**Dr. Rafael Fernández Nava**  
Editor en Jefe de

# POLIBOTÁNICA

Departamento de Botánica  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional  
Apdo. Postal 17-564, CP 11410, Ciudad de México

Correo electrónico:  
*polibotanica@gmail.com*  
*rfernand@ipn.mx*

Dirección Web  
*http://www.polibotanica.mx*

POLIBOTÁNICA es una revista indexada en:

- CRMCYT - Sistema de Clasificación de Revistas Mexicanas de Ciencia y Tecnología  
SciELO - Scientific Electronic Library Online.  
Google Académico - Google Scholar.  
DOAJ, Directorio de Revistas de Acceso Público.  
Dialnet portal de difusión de la producción científica hispana.  
REDIB Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico.  
LATINDEX, Sistema regional de información en línea para revistas científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal.  
PERIODICA, Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias.



**Ciencia y  
Tecnología**  
Secretaría de Ciencia, Humanidades,  
Tecnología e Innovación



## INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Director General: *Dr. Arturo Reyes Sandoval*

Secretario General: *M. en C. Ismael Jaidar Monter*

Secretario Académico: *M. en E.N.A. María Isabel Rojas Ruiz*

Secretario de Innovación e Integración Social: *M.C.E. Yessica Gasca Castillo*

Secretario de Investigación y Posgrado: *Dra. Martha Leticia Vázquez González*

Secretario de Servicios Educativos: *Dr. Marco Antonio Sosa Palacios*

Secretario de Administración: *M. en C. Javier Tapia Santoyo*

Director de Educación Superior: *Lic. Tomás Huerta Hernández*

## ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director:

*Dr. Isaac Juan Luna Romero*

Subdirectora Académica:

*Biol. Elizabeth Guarneros Banuelos*

Jefe de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación:

*Lic. Edgar Gregorio Cárcamo Villalobos*

Subdirector de Servicios Educativos e Integración Social:

*Biól. Gonzalo Galindo Becerril*

---

**POLIBOTÁNICA**, Año 30, No. 61, enero 2026, es una publicación semestral editada por el Instituto Politécnico Nacional, a través de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Unidad Profesional Lázaro Cárdenas, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomas C.P. 11340 Delegación Miguel Hidalgo México, D.F. Teléfono 57296000 ext. 62331.  
<http://www.herbario.encb.ipn.mx/>, Editor responsable: Rafael Fernández Nava. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo del Título No. 04-2015-011309001300-203. ISSN impreso: 1405-2768, ISSN digital: 2395-9525, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número, Unidad de informática de la ENCB del IPN, Rafael Fernández Nava, Unidad Profesional Lázaro Cárdenas, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomas CP 11340 Delegación Miguel Hidalgo México, D.F.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación.

Polibotánica

ISSN electrónico: 2395-9525

[polibotanica@gmail.com](mailto:polibotanica@gmail.com)

Instituto Politécnico Nacional

México

<http://www.polibotanica.mx>

# 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 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**

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](mailto: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 N<sup>6</sup>-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<sup>-1</sup> 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 (≤ 10%), con tejidos oxidados y sin desarrollo morfogénico. 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 N<sup>6</sup>-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<sup>-1</sup> 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 (<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 esteroideas 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 & Eguíarte, 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-diclorofenoxyacético [2,4-D], ácido indolacético [AIA] y ácido naftalenacético [ANA]) combinadas con N<sup>6</sup>-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 somacloniales. 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 ( $18^{\circ}48'N$ ,  $99^{\circ}35'W$ ). 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  $4\text{--}6^{\circ}\text{C}$  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 ( $40\times$ ) 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  $60.0\text{ g L}^{-1}$  de sacarosa, el complejo vitamínico L2 ( $250.0\text{ mg L}^{-1}$  de inositol,  $0.5\text{ mg L}^{-1}$  de piridoxina y  $2.0\text{ mg L}^{-1}$  de tiamina), y combinaciones específicas de RCV. El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial  $3\times 3\times 3$ , 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  $22.62\text{ }\mu\text{M}$ ), ANA ( $16.11$ ,  $21.48$  y  $26.85\text{ }\mu\text{M}$ ) y AIA ( $17.13$ ,  $22.83$  y  $28.54\text{ }\mu\text{M}$ ), combinadas con tres concentraciones de BA ( $4.44$ ,  $8.88$  y  $13.32\text{ }\mu\text{M}$ ), 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  $8.0\text{ g L}^{-1}$  de agar como agente gelificante. La esterilización se realizó mediante autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  y  $1.1\text{ kg cm}^{-2}$  de presión durante 20 minutos. Las cajas fueron incubadas en oscuridad continua a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  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 brilloso 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,  $30.0\text{ g L}^{-1}$  de sacarosa y suplementado con  $0.45\text{ }\mu\text{M}$  de 2,4-D,  $0.54\text{ }\mu\text{M}$  de ANA o  $0.57\text{ }\mu\text{M}$  de AIA, según correspondiera, en todos los casos sin la adición de BA. Las condiciones de incubación se mantuvieron en oscuridad absoluta a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  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 fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad y a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 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, compost 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*.

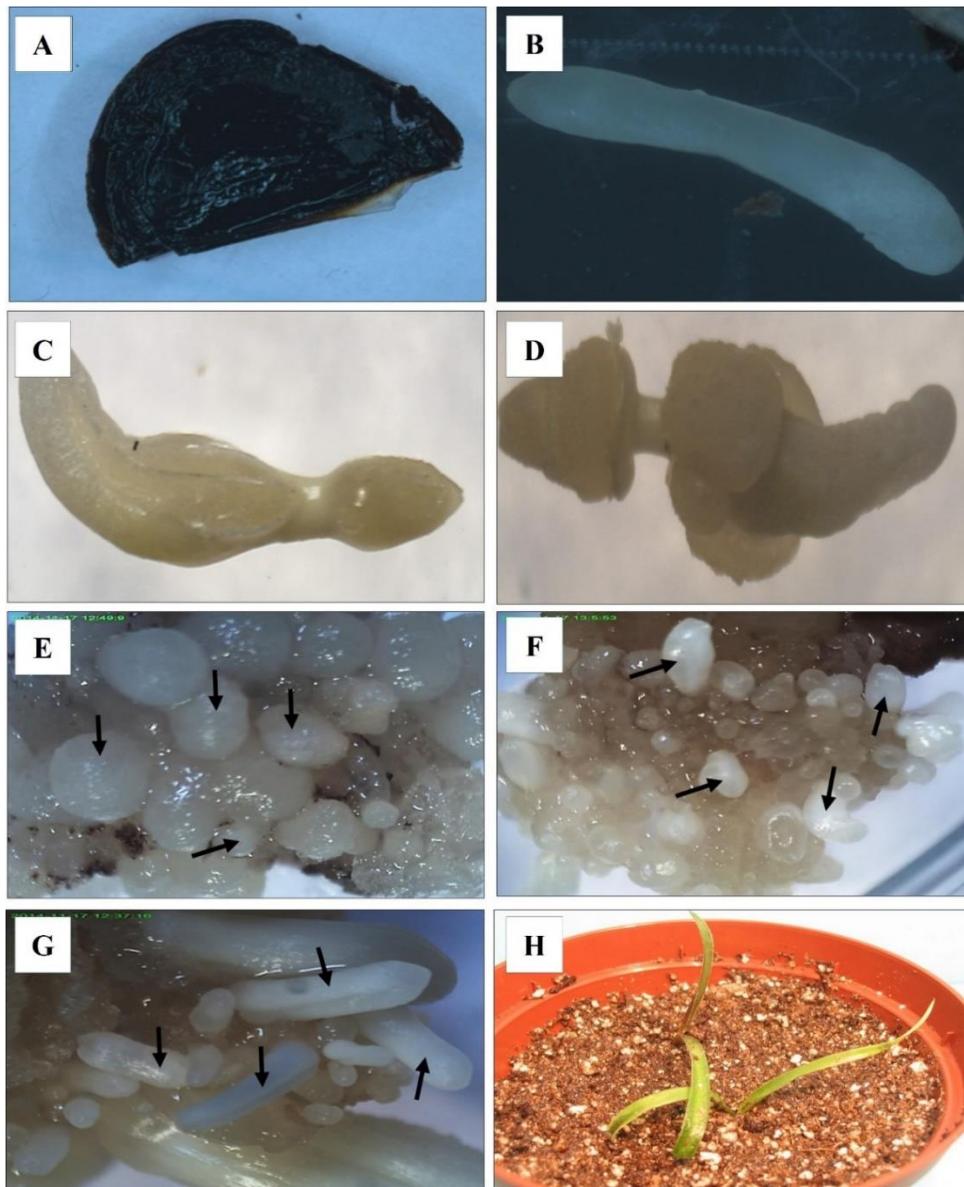
### Análisis estadístico

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 desdiferenciación celular a los 5 ddic. D. Formación de callo proembriogénico compacto de color amarillo perlado a los 40 ddic. E. Desarrollo de estructuras globulares indicativas de embriones somáticos globulares tempranos (flechas). F. Embiones somáticos en transición de estadios globular a escutelar (flechas), con morfología definida. G. Producción de embriones somáticos en estadio coleoptilar a los 100 ddic, 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 ddic.

**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<sup>-1</sup> 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 ± 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 N<sup>6</sup>-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 N<sup>6</sup>-benzyladenine (BA), at 60 daci.

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

| Tratamiento ( $\mu\text{M}$ ) |            | Callogénesis (%)<br>(media $\pm$ EE) | Tipo de Callo |      |
|-------------------------------|------------|--------------------------------------|---------------|------|
| Auxina                        | Citocinina |                                      |               |      |
| 28.54                         | 4.44       | 9.7 $\pm$ 2.3                        | d             | CNPE |
|                               | 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  $\mu$ M de 2,4-D combinado con 13.32  $\mu$ M de BA siendo significativamente superior al resto de los tratamientos, con una eficiencia embriogénica promedio de  $17.6 \pm 7.1$  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 ddc.

**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 ( $\mu$ M) |            | Densidad embriogénica | Eficiencia embriogénica<br>(media $\pm$ EE) |    |
|------------------------|------------|-----------------------|---|----|
| Auxina                 | Citocinina |                       |   |    |
| 2,4-D                  | BA         |                       |   |    |
| 13.57                  | 4.44       | 8 - 11                | 9.5 $\pm$ 0.4                               | b  |
|                        | 8.88       | 4                     | 4.0 $\pm$ 0.0                               | c  |
|                        | 13.32      | -                     | -   | -  |
| 18.10                  | 4.44       | 9 - 11                | 10.0 $\pm$ 0.6                              | b  |
|                        | 8.88       | 2 - 6                 | 4.0 $\pm$ 0.7                               | c  |
|                        | 13.32      | 2 - 25                | 13.5 $\pm$ 3.5                              | ab |
| 22.62                  | 4.44       | -                     | -   | -  |
|                        | 8.88       | 6                     | 6.0 $\pm$ 0.0                               | bc |
|                        | 13.32      | 1 - 36                | 17.6 $\pm$ 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 ddc, 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 ddc.

Otros tratamientos con respuesta embriogénica considerable fueron 18.10  $\mu$ M de 2,4-D + 13.32  $\mu$ M de BA y 18.10  $\mu$ M de 2,4-D + 4.44  $\mu$ M de BA, con eficiencias de  $13.5 \pm 3.5$  y  $10.0 \pm 0.6$  ES por explante, respectivamente. En contraste, la combinación 13.57  $\mu$ M de 2,4-D + 8.88  $\mu$ 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 meristemos 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 señalizadoras 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 radiculares y meristemos 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, compost 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 meristemos 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 ( $17.6 \pm 7.1$ ).

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-Mayo, S., Vargas-Jurado, M. Á., Suárez-Mota, M. E., & Barrera-Escoria, 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). Naphthalphthalamic 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>