



Short Note [Nota Corta]

EXPRESIÓN EMBRIOGÉNICA DIRECTA EN *Agave cupreata* †[DIRECT EMBRYOGENIC EXPRESSION IN *Agave cupreata*]

Laura Acosta-Villagran, Amaury Martín Arzate-Fernández*,
Hilda García-Núñez, Sandra Yarensy Martínez-Martínez,
Montserrat Hernández-Solís and Jesús Ignacio Reyes-Díaz

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 11.5, C.P. 50200, Toluca, México. Email:

amaury1963@yahoo.com.mx

*Corresponding author

SUMMARY

Background: *Agave cupreata* is a specie that can only reproduce by seeds and could take up to 15 years until flowering, placing it at risk of extinction due to its agroindustrial exploitation to produce mezcal. **Objective:** To evaluate the type of explant, the vitamin complex and 2,4-D concentrations on the direct embryogenic response. **Methodology:** Explants of leaf, root and stem sections were evaluated. Also, the vitamins MS (Murashige and Skoog, 1962) and L2 (Phillips and Collins, 1979), five concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), (0.0, 0.1, 0.3, 0.6 and 0.9 mg L⁻¹) and six concentrations of indole-3-acetic acid (IAA), (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 and 3.0 mg L⁻¹) were assayed for the expression of somatic embryos directly. **Results:** The leaf explant, the vitamin L2 complex, and the concentration of 0.9 mg L⁻¹ of 2,4-D and 0.5 mg L⁻¹ of IAA turned out to be the most efficient for the formation of pro-embryogenic masses and the expression of direct somatic embryos in the globular state. **Implications:** These results lay the groundwork for the future regeneration of *A. cupreata* plants via direct somatic embryogenesis, potentially facilitating their conservation and mass propagation. This contributes to the sustainability of mezcal; boosts the local economy, preserves biodiversity, and ensures the continued production of this endangered species. **Conclusions:** For the first time, the successful expression of somatic embryos directly from *A. cupreata* explants was evidenced.

Key words: direct somatic embryogenesis; *Agave cupreata*; type of explant; vitamins; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; indole-3-acetic acid.

RESUMEN

Antecedentes: *Agave cupreata* es una especie que solo se puede reproducir por semillas y llega a tardar hasta 15 años en obtenerse la floración colocándose en riesgo de extinción debido a su explotación agroindustrial para la producción de mezcal. **Objetivo:** Evaluar el tipo de explante, el complejo vitamínico y concentraciones de 2,4-D sobre la respuesta embriogénica directa. **Metodología:** Se evaluaron los explantes de secciones de hoja, raíz y tallo. También, las vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) y L2 (Phillips y Collins, 1979), cinco concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), (0.0, 0.1, 0.3, 0.6 y 0.9 mg L⁻¹) y seis concentraciones de ácido indol-3-acético (AIA), (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mg L⁻¹) fueron evaluadas para la expresión de embriones somáticos de manera directa. **Resultados:** El explante de hoja, el complejo vitamínico L2, y las concentraciones de 0.9 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ de AIA resultaron ser los más eficientes para la formación de masas pro-embriogénicas y la expresión de embriones somáticos directos en estado globular. **Implicaciones:** Los resultados sientan las bases para la futura regeneración de plantas de *A. cupreata* vía embriogénesis somática directa, pudiendo facilitar su conservación y propagación masiva, contribuyendo a la sostenibilidad del mezcal; esto impulsa la economía local, preserva la biodiversidad y asegura la producción continua de esta especie en peligro de extinción. **Conclusiones:** Por primera vez, se evidenció la expresión exitosa de embriones somáticos directamente a partir de explantes en *A. cupreata*.

Palabras clave: embriogénesis somática directa; *Agave cupreata*; tipo de explante; vitaminas; ácido 2,4-diclorofenoxiacético; ácido indol-3-acético.

† Submitted April 25, 2024 – Accepted August 22, 2024. <http://doi.org/10.56369/tsaes.5601>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = Amaury Martín Arzate-Fernández: <http://orcid.org/0000-0001-8603-0099>

INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

Durante la ES, los eventos celulares y morfológicos están controlados por una serie de condiciones de cultivo y efectos genéticos (Fambrini, Usai and Pugliesi, 2022). Un factor crucial que determina la capacidad embriogénica del cultivo *in vitro* es el tipo de explante, dado que cualquier tejido somático vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un

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

La investigación sobre la embriogénesis somática en *Agave* ha demostrado que los complejos vitamínicos en los medios de cultivo influyen significativamente en el desarrollo de embriones. Singh y Patel (2003) compararon los efectos de los medios MS y L2 (Phillips y Collins, 1979) en *Agave americana*, mostrando diferencias en la calidad de los embriones. Garcia, Cruz y Ortega (2012) confirmaron que ambos medios, MS y L2, afectan la embriogénesis y la viabilidad de los embriones. Estos estudios subrayan la importancia de los complejos vitamínicos en el cultivo de *Agave*.

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen del material biológico

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

Desinfección de semillas

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

semillas se dejaron reposar en peróxido de hidrógeno (H_2O_2 1%) a 4 °C durante 24 h.

Germinación y establecimiento (G y E)

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

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

Inducción de masas pro-embriogénicas (IMPE)

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

Estos explantes se transfirieron a un medio de cultivo formulado con sales MS al 25 %, suplementado con cinco concentraciones de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0.0, 0.1, 0.3, 0.6 y 0.9 mg L⁻¹), complejo vitamínico L2 (inositol 100 mg/L, piridoxina 0.5 mg/L

y tiamina · 2 mg/L) (Phillips y Collins, 1979) o MS (Inositol 100 mg/L, Niacina 0.5 mg/L, Piridoxina 0.5 mg/L, Tiamina · 2 mg/L, Glicina 2 mg/L), 60 g L⁻¹ de sacarosa y gelificado con 8 g L⁻¹ de agar. Todos los cultivos se mantuvieron en condiciones de total oscuridad durante 60 días a 25 °C. La observación de la presencia de masas pro-embriogénicas o divisiones asimétricas y la ausencia de callo en los explantes indicó el inicio de la embriogénesis somática.

Expresión de embriones somáticos directos (EESD)

Después de 60 d, las masas pro-embriogénicas obtenidas en la fase de inducción de masas proembriogénicas (IMPE) con la mejor concentración de 2,4-diclorofenoxiacético (0.9 mg L⁻¹), se trasladaron a un medio de cultivo para la expresión de embriones somáticos, compuesto por sales MS al 50 %, 30 g L⁻¹ de sacarosa y gelificado con 7 g L⁻¹ de agar. En esta etapa, se evaluaron seis concentraciones de ácido indolacético (AIA) (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mg L⁻¹). Los explantes se mantuvieron en condiciones de total oscuridad durante 60 días a 25 °C, hasta obtener los embriones somáticos globulares.

Análisis estadístico

Para la etapa de IMPE el experimento consistió en un diseño completamente aleatorizado con arreglo trifactorial (explante x complejo vitamínico x 2,4-D) (3x5x2), con tres repeticiones para cada factor. En la fase de expresión de embriones somáticos directos (EESD) el experimento tuvo un diseño completamente al azar con tres repeticiones por cada concentración de AIA. Para todos los casos los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico InfoStat, versión 2017.



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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

Es importante destacar que estos embriones se formaron de manera directa, es decir, sin pasar por la formación previa de callo, este fenómeno de formación de embriones globulares coincide con la etapa de desarrollo globular reportada para otras especies de *Agave*, como *A. fourcroydes* (Monja-Mio and Robert, 2013) y *A. victoria-reginae* (Rodríguez-Garay, Gutiérrez-Mora and Acosta-Dueñas, 1996). Sin embargo, hasta el momento, la expresión embriogénica

directa en *A. cupreata* no había sido documentada, lo que convierte a este estudio en el primer reporte de expresión embriogénica directa para esta especie.

Efecto del explante sobre la expresión embriogénica directa en *A. cupreata*

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

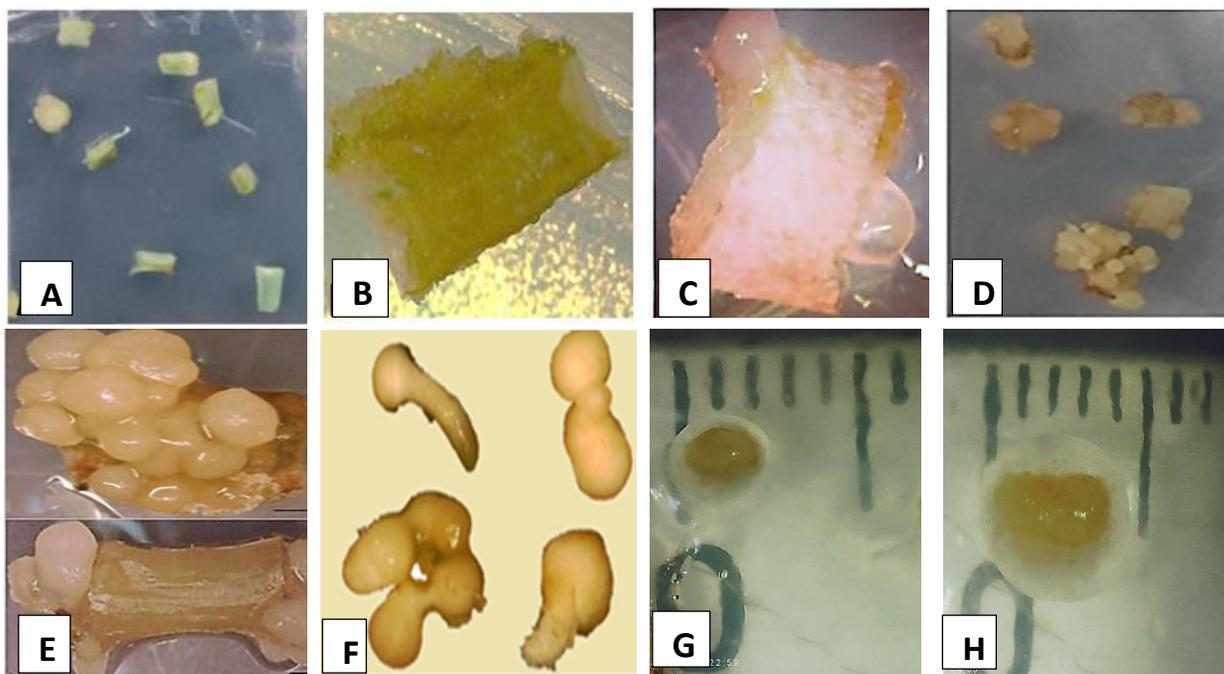


Figura 2. Expresión embriogénica directa en *A. cupreata*. A) Explantes de hoja. B) Explante de hoja con formación de masa pro-embriogénica. C, D y E) Expresión de embriones somáticos directos en estado globular en explantes de hoja. F) Embriones somáticos directos en forma globular separados del explante.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

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

Tabla 1. Efecto del explante sobre la expresión embriogénica directa en *A. cupreata*.

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

*Letras iguales no hay diferencias significativas.

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

La evaluación de complejos vitamínicos en la embriogénesis somática directa emerge como un aspecto crucial en la optimización de este proceso en cultivos de tejidos vegetales. Los resultados de la prueba de Tukey revelaron que las vitaminas L2 demostraron ser las más eficaces para la expresión de masas pro-embriogénicas (60%) y la formación directa de embriones somáticos, alcanzando una media de 108 embriones por explante, en contraste con las vitaminas MS, que solo permitieron la formación de 72 embriones somáticos. Estos hallazgos se alinean con la investigación de (Reyes-Díaz *et al.*, 2020), quienes destacan la importancia de la formulación del complejo vitamínico L2 y el impacto positivo de la adición de tiamina al medio de cultivo para estimular la producción de un mayor número de embriones somáticos en *A. angustifolia*. Se ha descrito que durante la embriogénesis somática, las células en desarrollo requieren una cantidad significativa de energía para crecer y diferenciarse (Von Arnold *et al.*, 2002), al respecto, la tiamina podría influir de manera

positiva en este proceso debido a que se ha reportado como un cofactor enzimático fundamental que participa en reacciones de descarboxilación oxidativa e interviene en el metabolismo de carbohidratos proporcionando ATP a las células (Al-Khayri, 2001). Además, se le ha atribuido a la tiamina funciones específicas en la regulación de la expresión genética primordial en la etapa de reproducción celular (Goyer, 2010). Asimismo, estas observaciones respaldan los resultados previamente documentados en otras especies de *Agave*, como *A. angustifolia* (Reyes-Díaz *et al.*, 2017), *A. fourcroydes* (Monja-Mio and Robert, 2013) y *A. victoria-reginae* (Rodríguez-Garay, Gutiérrez-Mora and Acosta-Dueñas, 1996), donde la utilización de las vitaminas L2 en el medio de inducción para la embriogénesis somática, tanto en su modalidad directa como indirecta, ha demostrado ser efectiva.

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

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

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

*Letras iguales no hay diferencias significativas.

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

La concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en el medio de cultivo es considerada como un factor crítico que ejerce una influencia significativa en la embriogénesis somática directa. Este compuesto puede desempeñar un papel clave al estimular la división celular y la proliferación de células mediante la producción endógena de ácido abscísico (Kikuchi *et al.*, 2006), lo que lo convierte en un elemento esencial para la optimización del proceso de embriogénesis somática. Reportes previos han reportado la eficiencia del 2,4-D para la formación de embriones somáticos directos en *A. victoria-reginae* (0.3 mg L⁻¹) (Rodríguez-Garay, Gutiérrez-Mora and Acosta-Dueñas, 1996) y en *A. fourcroydes* (0.1 a 1.0 mg L⁻¹) (Monja-Mio and Robert, 2013). En el presente estudio, el análisis estadístico reveló diferencias altamente significativas entre las concentraciones de 2,4-D y su influencia en la expresión embriogénica directa, de

acuerdo con los resultados obtenidos, solo la concentración de 0.9 mg L⁻¹ de 2,4-D permitió la formación eficiente de masas pro-embriogénicas (Tabla 3).

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

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

*Letras iguales no hay diferencias significativas.

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

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

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

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

*Letras iguales no hay diferencias significativas.

CONCLUSIÓN

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

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

Acknowledgments

The first author expresses gratitude to the National Council of Humanities, Science, and Technology of Mexico (CONAHCYT) for the scholarship (CVU No. 1108387) awarded to support their graduate studies.

Funding. This research is part of the project "Production of *Agave* spp. plants from an *in vitro* germplasm bank" funded by the Universidad Autónoma del Estado de México.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest associated with the results of this publication.

Compliance with ethical standards. The authors declare that this research was supervised by the Internal Bioethics Committee of the Universidad Autónoma del Estado de México, under the authorization of project 6624/CIP.

Data availability. The data presented in this study are available upon request to the corresponding author (amaury1963@yahoo.com.mx).

Author Contributions (CRediT). **L. Acosta-Villagran** - methodology, formal analysis, and writing-review; **A.M. Arzate-Fernández** - resources, funding acquisition, conceptualization, and writing-review; **H. García-Núñez** - methodology and formal analysis; **S.Y. Martínez-Martínez** - methodology and formal analysis; **M. Hernández-Solís** - methodology and formal analysis; **J.I. Reyes-Díaz** - formal analysis, writing-review and editing.

REFERENCES

- Al-Khayri, J.M., 2001. Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37(4), pp.453–456. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0079-x>
- Ch, A.-A., Iracheta-Donjuan, L., Gódinez-Aguilar, J., López-Gómez, P. and Barrios-Ayala, A., 2015. Morphological characterization of

- endemic *Agave cupreata* species of Mexico. *Phyton*, 84(1), pp.148–162. <https://doi.org/10.32604/phyton.2015.84.148>
- Fambrini, M., Usai, G. and Pugliesi, C., 2022. Induction of somatic embryogenesis in plants: Different players and focus on WUSCHEL and WUS-RELATED HOMEODOMAIN (WOX) transcription factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), p.15950. <https://doi.org/10.3390/ijms232415950>
- Ferreira, J.C.B., De Araújo Silva-Cardoso, I.M., Meira, R.O., Da Silva Costa, F.H. and Scherwinski-Pereira, J.E., 2022. Towards development of an efficient somatic embryogenesis protocol for the palm tree *Euterpe precatoria* (Mart.) from leaf tissues of adult plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 58(5), pp.750–768. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10310-8>
- Goyer, A., 2010. Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry*, 71(14–15), pp.1615–1624. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.06.022>
- Kikuchi, A., Sanuki, N., Higashi, K., Koshiba, T. and Kamada, H., 2006. Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta*, 223(4), pp.637–645. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0114-y>
- Loyola-Vargas, V.M. and Ochoa-Alejo, N. eds., 2016. *Somatic embryogenesis: Fundamental aspects and applications*. [online] Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0>
- Martín, J.P., Pintos, B., Rebordinos, I., Villalobos, N., Guerra, H. and Martín, L., 2000. Embryogenic response in different *Medicago arborea* L. explants depending on cytokinin/auxin balances. *Journal of Plant Physiology*, 156(5–6), pp.801–804. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80251-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80251-5)
- Martínez-Palacios, A., 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(2), pp.135–142. <https://doi.org/10.1023/A:1023933123131>
- Monja-Mio, K.M. and Robert, M.L., 2013. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49(5), pp.541–549. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9535-7>
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp.473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nikam, T.D., Bansude, G.M. and Aneesh Kumar, K.C., 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. ex. Engelm). *Plant Cell Reports*, 22(3), pp.188–194. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0675-9>
- Ossai, C.O., Balogun, M.O. and Maroya, N.G., 2024. Status and prospects of yam somatic embryogenesis: a pathway for biotechnology applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. [online] <https://doi.org/10.1007/s11627-024-10413-4>
- Phillips, G.C. and Collins, G.B., 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Science*, 19(1), pp.59–64. <https://doi.org/10.2135/cropsci1979.0011183X001900010014x>
- Reyes-Díaz, J.I., Arzate-Fernández, A.M., Piña-Escutia, J.L. and Norman-Mondragón, T.H., 2020. The effect of inositol, pyridoxine and thiamine on somatic embryogenesis of *Agave angustifolia*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, [online] 23(1), p.01. <https://doi.org/10.56369/tsaes.3007>
- Reyes-Díaz, J.I., Arzate-Fernández, A.M., Piña-Escutia, J.L. and Vázquez-García, L.M., 2017. Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw. *Industrial Crops and Products*, 108, pp.81–85. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.021>
- Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A. and Acosta-Dueñas, B., 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46(1), pp.85–87. <https://doi.org/10.1007/BF00039700>
- Urbina, C.J.F., Casas, A., Martínez-Díaz, Y., Santos-Zea, L. and Gutiérrez-Urbe, J.A., 2018.

- Domestication and saponins contents in a gradient of management intensity of agaves: *Agave cupreata*, *A. inaequidens* and *A. hookeri* in central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65(4), pp.1133–1146. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0601-6>
- Vázquez-Delfin, P., Casas, A. and Vallejo, M., 2022. Adaptation and biocultural conservation of traditional agroforestry systems in the Tehuacán Valley: access to resources and livelihoods strategies. *Heliyon*, 8(7), p.e09805. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09805>
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. and Filonova, L., 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), pp.233–249. <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>