



## EVALUATION OF THE EFFECT OF EXOGENOUS PUTRESCINE DURING THE MATURATION AND GERMINATION *in vitro* OF SOMATIC EMBRYOS IN TWO AGAVE GENOTYPES †

### [EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PUTRESCINA EXÓGENA DURANTE LA MADURACIÓN Y GERMINACIÓN *in vitro* DE EMBRIONES SOMÁTICOS EN DOS GENOTIPOS DE AGAVE]

Sandra Yarensy Martínez-Martínez<sup>1</sup>, Amaury Martín Arzate-Fernández<sup>1\*</sup>,  
Monserrat Hernández-Solís<sup>1</sup> and Laura Acosta-Villagran<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado México (UAEMéx), Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 11.5, Municipio Toluca, Estado de México, México, C. P. 50200. Email: [amaury1963@yahoo.com.mx](mailto:amaury1963@yahoo.com.mx)

\*Corresponding author

#### SUMMARY

**Background.** Agaves are an important economic source in industrial products, in the food and pharmaceutical industry, steroidal animal feed, ornamental plants and as a material for biofuels. Despite their economic importance, some species present problems in their conventional propagation, which makes their reproduction difficult and has caused some species to be in some risk category. Therefore, there is a need to develop efficient protocols for *in vitro* micropropagation via somatic embryogenesis. The positive effect of the application of exogenous putrescine on the maturation and germination of somatic embryos is known. **Objective.** To determine the effect of exogenous putrescine on the maturation and germination of somatic embryos of *A. cupreata* and *A. angustifolia*. **Methodology.** Two concentrations of putrescine (100 and 150 mg/L) and two controls, one positive and one negative, were evaluated in the somatic embryo maturation medium and later in the germination of somatic embryos. **Results.** Putrescine favors the maturation and germination of somatic embryos in both species. **Implications.** The results of this research contribute to a better understanding of the process of somatic embryogenesis and open the possibility of applying putrescine in the process of somatic embryogenesis at a commercial level. **Conclusion.** Exogenous putrescine in culture medium significantly improves the maturation and germination of somatic embryos in *Agave*.

**Keywords:** *Agave cupreata*; *A. angustifolia*; mezcal; propagation.

#### RESUMEN

**Introducción.** Los agaves son una fuente económica importante en productos industriales, en la industria alimentaria y farmacéutica, alimentos esteroidales para animales, plantas ornamentales y como material para biocombustibles. A pesar de la importancia económica algunas especies presentan problemas en su propagación convencional, lo que dificulta su reproducción y ha ocasionado que algunas especies se encuentren en alguna categoría de riesgo. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar protocolos eficientes para que la micropropagación *in vitro* mediante embriogénesis somática. Es conocido el efecto positivo que tiene la aplicación de putrescina exógena en la maduración y germinación de embriones somáticos. **Objetivo.** Determinar el efecto de la putrescina exógena en la maduración y germinación de embriones somáticos de *A. cupreata* y *A. angustifolia*. **Metodología.** Se evaluaron dos concentraciones de putrescina (100 y 150 mg/L) y dos controles uno positivo y uno negativo en el medio de maduración de embriones somáticos y posteriormente en la germinación de embriones somáticos. **Resultados.** La putrescina favorece la maduración y germinación de embriones somáticos en ambas especies. **Implicaciones.** Los resultados de esta investigación contribuyen a una mejor comprensión del proceso de regeneración de la embriogénesis somática y abren la posibilidad de aplicar la putrescina en el proceso de embriogénesis somática a nivel comercial. **Conclusión.** La putrescina exógena en medio de cultivo mejora significativamente la maduración y germinación de embriones somáticos en *Agave*.

**Palabras clave:** *Agave cupreata*; *A. angustifolia*; mezcal; propagación.

† Submitted February 21, 2023 – Accepted June 20, 2023. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4804>



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

ISSN: 1870-0462.

## INTRODUCCIÓN

Los agaves son plantas perenes originarias de tierras áridas del sur de Estados Unidos, México y Centro América (García-Mendoza, 2002). El agave podría ser una materia prima prometedora dada su capacidad para prosperar en regiones semiáridas, su alta eficiencia en el uso del agua y sus bajos requisitos de fertilizantes nitrogenados (Davis *et al.*, 2011). Además de su capacidad adaptativa a condiciones adversas los agaves son una fuente económica importante en productos industriales, en la industria alimentaria y farmacéutica, alimentos esteroideos para animales, plantas ornamentales y como material para biocombustibles (Bautista-Montes, *et al.*, 2022). Si bien el cultivo de agave es prometedor para la producción de biocombustibles debido a que los rendimientos de etanol del agave (7414 L/ha/año) son comparables a los de la caña de azúcar brasileña (9900 L/ha/año) y superiores a los del etanol de maíz estadounidense (3800 L/ha/año) (Yan *et al.*, 2020), actualmente, en México, el principal uso del agave es para la producción de bebidas alcohólicas, entre ellas el mezcal (Bautista-Montes *et al.*, 2022). En los últimos años la industria mezcalera ha logrado exportar su producto a 64 países, y tan solo en 2021, las exportaciones de mezcal crecieron 7%, y la producción, alrededor de 3.2%, pues se envasaron más de 8 millones de litros de esta bebida generando un valor a la industria mayor a 8.5 millones de pesos (COMERCAM, 2022). Las principales especies de *Agave* empleadas para la producción de mezcal son *Agave angustifolia* (88.11%), seguido de *A. durangensis* (2.26%), *A. salmiana* (1.9%), *A. cupreata* (1.29%), entre otras (COMERCAM, 2022). A pesar de la importancia económica algunas especies presentan problemas en su propagación convencional debido a problemas en la fecundación de las semillas, como es el caso de *A. angustifolia*, y a sus largos ciclos de vida y su naturaleza monocárpica, lo que dificulta su reproducción y ha ocasionado que algunas especies como *A. cupreata* se encuentren en peligro de extinción (Torres *et al.*, 2020).

Una alternativa a la propagación convencional en agave es el uso de cultivos de tejidos y células vegetales, con el fin de obtener fácilmente nuevas plántulas en corto tiempo y a gran escala (Bautista-Montes *et al.*, 2022). La técnica de embriogénesis somática es un proceso de múltiples pasos que requiere el desarrollo de embriones somáticos (Méndez *et al.* 2019). Los problemas fundamentales asociados a este método de propagación son los siguientes: la inadecuada maduración de los embriones somáticos y su limitada capacidad de germinación y conversión en plantas (Szczygieł *et al.*, 2007; Lelu and Pâques, 2009). Solo superando estas dificultades se puede utilizar más ampliamente el método de embriogénesis somática (Hazubska *et al.*, 2016). Algunas

investigaciones sobre la embriogénesis somática han demostrado que la putrescina tiene un impacto significativo en la maduración y germinación de los embriones somáticos (Nookaraju *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Aydin *et al.*, 2016; Domínguez *et al.*, 2023). Además, la putrescina podría estar asociada con el estrés causado en las células vegetales, protegiéndolas y aumentando los genes relacionados con el estrés (Alcázar *et al.*, 2020; Kielkowska and Adamus, 2021). Hasta la fecha, los resultados sobre la propagación de *A. cupreata* y *A. angustifolia* mediante la técnica de embriogénesis somática no son del todo satisfactorios o no se han reportado (tal es el caso de *A. cupreata*); por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar protocolos eficientes para la micropropagación *in vitro* más productiva de ambas especies utilizando esta técnica. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la putrescina exógena en la maduración y germinación de embriones somáticos de *A. cupreata* y *A. angustifolia*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y establecimiento *in vitro*

Para la desinfección y extracción de ejes embrionarios cigóticos se siguió el método descrito por Martínez *et al.* (2021). Semillas de *A. cupreata* y *A. angustifolia* fueron colectadas de cultivares comerciales en Puebla, México. Las semillas se lavaron bajo un flujo lento de agua de grifo con 2 mL de detergente líquido lavatrastes de la marca KIRKLAND® y dos gotas de Tween® 20 durante 15 min. Posteriormente, se trasladaron a una campana de flujo laminar, se sumergieron en etanol al 70% (v/v) durante 1 min, después en una solución de hipoclorito de sodio al 1% (v/v) durante 15 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y fueron estratificadas a 4°C durante 24 horas. Posteriormente, con ayuda de un bisturí y pinzas de disección se extrajeron los ejes embrionarios cigóticos de las semillas. Los ejes embrionarios cigóticos se cultivaron en medio para la inducción de callo (Reyes *et al.*, 2017) compuesto por sales MS (Murashige and Skoog, 1962), suplementado con vitaminas L2 (Phillips and Collins, 1979), 60 g/L de sacarosa, 23µM de 2,4-diclorofenoxyacetico (2,4-D) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 13 µM de 6-Benciladenina (BA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 8 g/L de agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 con hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico y luego se esterilizó en autoclave a 120 °C y 1.1 kg cm<sup>-2</sup> de presión durante 15 min. Los recipientes de cultivo utilizados fueron cajas Petri de 100 x 15 mm con 20 mL de medio. Todos los cultivos se incubaron a 25±2°C en condiciones de completa oscuridad.

### Efecto de la putrescina exógena en la maduración de embriones somáticos

Luego de un subcultivo de 30 días en medio de inducción de callo, los callos obtenidos con un peso de 0.2 g aproximadamente se utilizaron como explantes. Se colocaron dos callos en cajas Petri de 100 x 15 mm con 20 mL de medio. El medio de cultivo de maduración estuvo compuesto por sales MS, 30 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar. Se evaluó el efecto de dos concentraciones de putrescina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO): 1 y 1.7 mM y se utilizaron dos controles uno positivo y uno negativo, el positivo con 0.5  $\mu$ M de 2,4-D (Reyes *et al.*, 2017) y el negativo sin reguladores de crecimiento vegetal. Para cada tratamiento se utilizaron diez cajas Petri y el experimento se realizó por triplicado. Las condiciones de incubación fueron las mismas que las descritas anteriormente. Después de 30 días se realizó un subcultivo y a los 60 días se registró el porcentaje de callos embriogénicos y el número de embriones somáticos por explante.

### Efecto de la putrescina exógena en la germinación de embriones somáticos

Los embriones somáticos en estadio coleoptilar se transfirieron individualmente a frascos de vidrio de 125 mL que contenían 35 mL de medio de cultivo para germinación compuesto por sales MS (Murashige and Skoog, 1962) a la mitad de su concentración, 30 g/L de sacarosa, 0.5 g de carbón activado y 6 g/L de agar. Se colocaron 5 embriones somáticos por cada frasco. Todos los cultivos se incubaron a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  y se mantuvieron bajo luz blanca fluorescente ( $33 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y un fotoperíodo de 16 h. Las tasas de conversión de embriones somáticos a plántulas normales (%), de cada uno de los tratamientos evaluados previamente, se midieron después de 8 semanas. Se consideraron como plántulas normales aquellas que tuvieron un ápice radicular y, al menos, un par de hojas verdaderas con una longitud mínima de 2 cm y espinas en el margen de las hojas. Estas plántulas completamente desarrolladas con características estándar pueden aclimatarse con éxito al invernadero. Como plántulas anormales se consideraron aquellas plántulas que presentaron hojas oscuras, engrosadas, con bordes irregulares y atrofiadas.

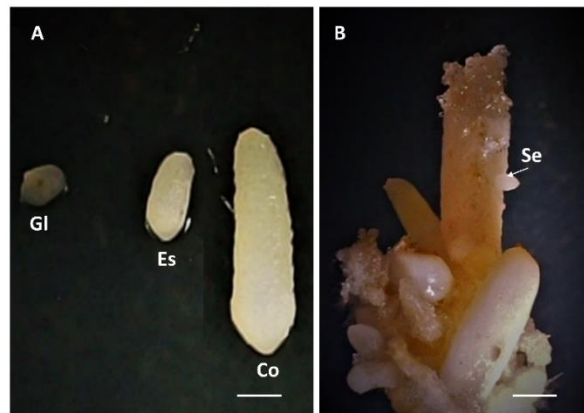
### Diseño experimental y análisis estadístico

Todos los experimentos incluyeron un diseño totalmente aleatorio, con diez repeticiones y se realizaron por triplicado. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey ( $P\leq 0.05$ ) utilizando el software Stathgraphics versión Centurion.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la putrescina exógena en la maduración de embriones somáticos

El proceso de embriogénesis somática sigue un desarrollo casi idéntico al de la embriogénesis cigótica, progresando desde la etapa globular, escutelar y finalmente coleoptilar (Fig. 1. A), en las monocotiledóneas (Méndez *et al.* 2019). Si bien, en el presente trabajo se evaluó únicamente la presencia de embriones somáticos primarios se observó la presencia de embriones somáticos secundarios en medios de cultivo con putrescina exógena (Fig. 1. B). Esta respuesta concuerda con lo reportado por Sharry *et al.* (2006) quienes al inducir embriogénesis somática primaria en *Melia azedarach* L. utilizando 1  $\mu$ M de putrescina observaron la presencia de embriones somáticos secundarios.



**Figura 1.** Proceso de embriogénesis somática en *Agave*. A: estadios de embriogénesis somática primaria. B: embrión somático secundario. Gl: globular; Es: escutelar; Co: coleoptilar; Se: embrión somático secundario. Barra= 1 mm.

En el presente estudio, la putrescina exógena mejoró el número de embriones somáticos por explante en *A. cupreata* (38.8) y *A. angustifolia* (21.7) (Tabla 1). Los eventos celulares y morfogenéticos durante la embriogénesis somática están controlados por una variedad de condiciones de cultivo y efectos genéticos (Kakkar *et al.* 2000; Paul *et al.* 2009). Varias moléculas, incluida la putrescina, se han destacado como marcadores de inducción esenciales durante la embriogénesis somática (Montague *et al.* 1978; Chée *et al.* 1989; Minocha *et al.* 2004). Esta acción promotora de la putrescina sobre la embriogénesis somática puede deberse a una conversión eficiente de células competentes en embriones, como sugieren Bajaj and Rajam (1996). Reis *et al.* (2016) informaron un aumento de 55 embriones somáticos en caña de azúcar al utilizar putrescina. Esto concuerda, con el

efecto estimulante de la putrescina en la embriogénesis somática que ha sido reportado en varios cultivos importantes como en arroz (Bajaj and Rajam, 1996; Sathish *et al.*, 2020), berenjena (Yadav and Rajam, 1998), zanahoria (Takeda *et al.*, 2002), vid (Bertoldi *et al.*, 2004), cítricos (Wu *et al.*, 2009), coco (Rajesh *et al.*, 2014), soja (Arun *et al.*, 2016) y trigo (Aydin *et al.*, 2016).

En *A. cupreata* el mayor número de embriones somáticos se presentó en ambas concentraciones de putrescina (Fig. 2. A y B), seguido del tratamiento sin reguladores de crecimiento vegetal (Fig. 2. C) y el menor número se obtuvo con 0.5  $\mu$ M de 2,4-D (Fig. 2. D). La alta concentración de auxina es importante para la adquisición de la capacidad embriogénica y para el estímulo inicial de la embriogénesis somática; sin embargo, reducir o eliminar la concentración de auxina también es importante para el desarrollo posterior de los embriones somáticos. Silveira *et al.* (2013) informaron un efecto negativo del 2,4-D en la maduración del embrión somático en el cultivo de callos de caña de azúcar en comparación con aquellos cultivados en un medio libre de reguladores de crecimiento vegetal. Por otro lado, se sabe que la putrescina puede proteger el ADN de especies reactivas de oxígeno (Ha *et al.*, 1998) e inducir cambios proteómicos en seis clases de proteínas (AGP, peroxidasa, HSP, GST, LEA y proteínas 14-3-3), que se han asociado con la embriogénesis somática y las respuestas a condiciones de estrés (Reis *et al.*, 2016).

A pesar de que, hasta el momento, no se han encontrado reportes de embriogénesis somática en esta especie, este proceso resultó ser más eficiente en comparación con lo reportado por Domínguez *et al.* (2008) quienes lograron la generación de 10.5 brotes a partir de meristemos basales en *A. cupreata* utilizando 1.5 mg/L de BA. La embriogénesis somática puede ser

parte de una estrategia en el mejoramiento genético de la especie y además es preferida a nivel comercial debido a sus coeficientes de multiplicación y la posibilidad de semi-automatizar el proceso (Bautista-Montes *et al.*, 2022).

Por otra parte, en *A. angustifolia* el mayor número de embriones somáticos se obtuvo con 1.7 mM de putrescina exógena (21.2 embriones por explante) (Fig. 2. F), seguido del tratamiento con 1 mM de putrescina exógena (9 embriones por explante) (Fig. 2. E), sin reguladores de crecimiento vegetal (5.2 embriones por explante) (Fig. 2. G) y el uso de 2,4-D inhibió la presencia de embriones (Fig. 2. H). A diferencia de *A. cupreata*, *A. angustifolia* respondió positivamente al aumento en la concentración de putrescina. Reis *et al.* (2016) en caña de azúcar reportaron que, en comparación con el control, una concentración mayor de putrescina mostró los mejores resultados en cuanto al número de embriones somáticos. La putrescina exógena puede incorporarse, resultando en un alto contenido intracelular de putrescina libre, que puede ser necesaria para inducir el mejor desempeño durante la maduración de embriones somáticos.

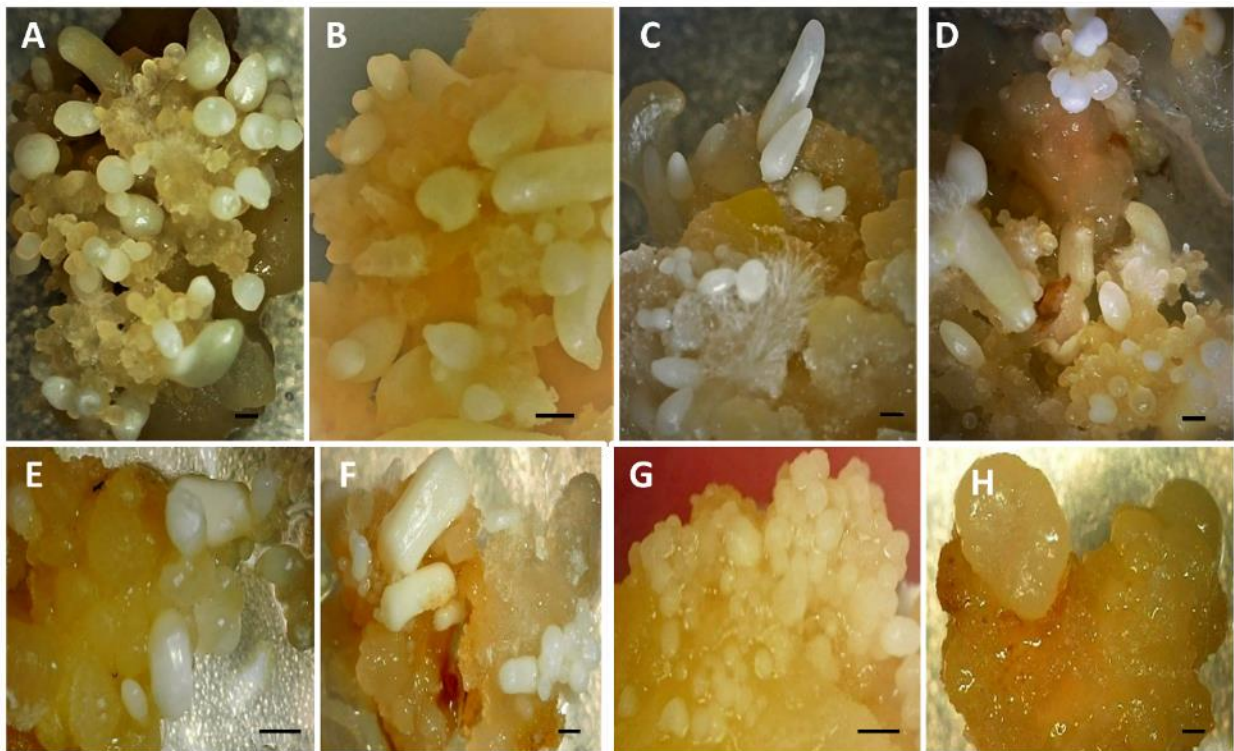
En la presente investigación se logró obtener 21.2 embriones en 0.2 gramos de callo, estos resultados son 3.7 superiores a los obtenidos por Reyes *et al.* (2017) en donde se reportó 34 embriones somáticos en 1.2 gramos de callo con la adición de 0.5  $\mu$ M de 2,4-D. Esta diferencia en la respuesta a los reguladores de crecimiento vegetal en la misma especie concuerda con lo reportado por Portillo *et al.* (2007) quienes señalaron que la producción de embriones somáticos está fuertemente influenciada por el genotipo, que fue previamente mencionado en un gran número de especies.

**Tabla 1. Efecto de la putrescina exógena en la maduración de embriones somáticos en dos especies de *Agave***

Especie	Tratamiento	Concentración	Porcentaje de callos embriogénicos (%)	Número de embriones somáticos/explante
<i>A. cupreata</i>	Sin RCV (-)	0.0	33.33±0.00 <sup>bcd</sup>	22.4±15.07 <sup>b</sup>
	2, 4-D (+)	0.5 $\mu$ M	77.78±0.35 <sup>a</sup>	7.8±4.86 <sup>c</sup>
	Putrescina	1 mM	66.67±0.48 <sup>ab</sup>	38.8±9.88 <sup>a</sup>
<i>A. angustifolia</i>	Sin RCV (-)	0.0	33.33±0.00 <sup>bcd</sup>	5.2±7.10 <sup>c</sup>
	2, 4-D (+)	0.5 $\mu$ M	0.00±0.00 <sup>e</sup>	0.0±0.00 <sup>c</sup>
	Putrescina	1 mM	22.22±0.35 <sup>cde</sup>	9.0±2.80 <sup>c</sup>
		1.7 mM	44.44±0.19 <sup>abc</sup>	21.2±7.22 <sup>b</sup>

RCV: reguladores de crecimiento vegetal; (+): control positivo; (-): control negativo.

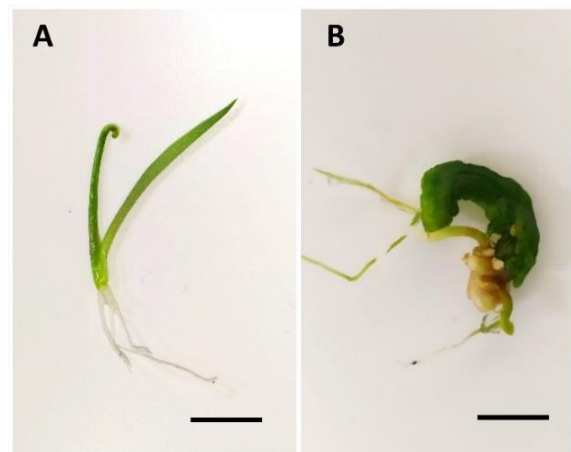
Dentro de una columna, las mismas letras no son significativamente diferentes según la prueba de rango múltiple de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Los valores ubicados posterior a  $\pm$  corresponden a la desviación estándar de los datos por tratamiento.



**Figura 2.** Maduración de embriones somáticos en agaves mezcaleros. A. *cupreata* (A-D), A) 1 mM de putrescina, B) 1.7 mM de putrescina, C) sin RCV, D) 0.5  $\mu$ M de 2,4-D. A. *angustifolia* (E-H), E) 1 mM de putrescina, F) 1.7 mM mg/L de putrescina, G) sin RCV, H) 0.5  $\mu$ M de 2,4-D. Barra= 1 mm

### Germinación de embriones somáticos

En el presente estudio, la adición de putrescina exógena mejoró un 32% la germinación de plántulas de *A. cupreata*, y en *A. angustifolia* no se encontró diferencia significativa en comparación con el control. Las plántulas normales presentaron un ápice radicular y, al menos, un par de hojas verdaderas con una longitud mínima de 2 cm y espinas en el margen de las hojas (Fig. 3. A). El mayor porcentaje de plántulas normales se obtuvo en *A. cupreata* con una concentración de 1 mM de putrescina exógena y para *A. angustifolia* con 1.7 mM de putrescina (Tabla 2). Una posible explicación de la tasa de conversión mejorada podría ser que la putrescina induce una alta división y expansión celular, lo que conduce a una mejora en la diferenciación celular (Kevers *et al.*, 2000, Satish *et al.*, 2020). Muchos estudios han encontrado que la putrescina exógena puede aliviar eficazmente el estrés oxidativo, reduce el daño causado por el estrés adverso en los órganos fotosintéticos de las plantas y mantiene un alto nivel de metabolismo fisiológico (Mandal *et al.*, 2014, Shu *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Plántulas germinadas a partir de embriones somáticos. A: plántulas normales; B: plántulas anormales. Barra= 1 cm.

Las plántulas anormales que presentaron hojas oscuras, engrosadas, con bordes irregulares y atrofiadas (Fig. 3. B) se presentaron en un 80% con 2,4-D en *A. cupreata*. Estas anomalías se han presentado en otros cultivos y han señalado la presencia de cotiledones ausentes o malformados, ausencia de meristemas apicales y radicales, color translúcido y pérdida de la bipolaridad, entre otras (El Dawayati *et al.*, 2012; Ruffoni and Savona 2013,

**Tabla 2.** Efecto de la putrescina exógena en la germinación de embriones somáticos en dos especies de *Agave*

Especie	Tratamiento	Concentración	Tasa de conversión a plántulas (%)	
			normales	anormales
<i>A. cupreata</i>	Sin RCV (-)	0.0	52±0.56 <sup>abc</sup>	48±0.56 <sup>abc</sup>
	2, 4-D (+)	0.5 µM	20±0.34 <sup>bc</sup>	80±0.34 <sup>bc</sup>
	Putrescina	1 mM	84±0.39 <sup>a</sup>	16±0.39 <sup>a</sup>
		1.7 mM	52±0.69 <sup>abc</sup>	48±0.69 <sup>abc</sup>
<i>A. angustifolia</i>	Sin RCV (-)	0.0	60±0.26 <sup>ab</sup>	40±0.26 <sup>ab</sup>
	2, 4-D (+)	0.5 µM	0±0.00 <sup>c</sup>	0±0.00 <sup>c</sup>
	Putrescina	1 mM	24±0.40 <sup>bc</sup>	76±0.40 <sup>bc</sup>
		1.7 mM	60±0.39 <sup>ab</sup>	40±0.39 <sup>ab</sup>

RCV: reguladores de crecimiento vegetal; (+): control positivo; (-): control negativo.

Dentro de una columna, las mismas letras no son significativamente diferentes según la prueba de rango múltiple de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Los valores ubicados posterior a  $\pm$  corresponden a la desviación estándar de los datos por tratamiento.

García *et al.*, 2019). Además, se sabe que las auxinas, principalmente el 2,4-D, son necesarias para la inducción de la embriogénesis somática y la multiplicación de embriones para aumentar el número de embriones que pueden producirse potencialmente mediante la embriogénesis somática indirecta (Pasternak, 2002) pero es necesario eliminar este RCV en las etapas posteriores porque su efecto dificulta el desarrollo del embrión y su posterior conversión en planta (Pasternak, 2002; Zavattieri *et al.*, 2010). Esta potente auxina permanece en el tejido durante mucho tiempo y es difícil de eliminar (García *et al.*, 2019). En el tratamiento con 2,4-D en *A. angustifolia* no se observó la regeneración de plántulas debido a que no se presentaron embriones somáticos en la etapa de maduración de embriones somáticos.

## CONCLUSIÓN

Los resultados demostraron que la putrescina exógena en medio de cultivo mejora significativamente la maduración y germinación de embriones somáticos en *Agave*. Los resultados obtenidos en este estudio abren la posibilidad de aplicar putrescina en el proceso de embriogénesis somática en *A. cupreata* y *A. angustifolia* a nivel comercial.

## Acknowledgements

The first author thanks the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT) for the scholarship granted to carry out his postgraduate studies.

**Funding.** This research is part of the project "Production of *Agave* spp plants from an *in vitro* germplasm bank" with code number 6624/2022/CIP, financed by the Autonomous University of the State of Mexico.

**Conflict of interest.** The authors declare that there is no conflict 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 Autonomous University of the State of Mexico, under the authorization of project 6624/2022/CIP.

**Data availability.** The data presented in this study are available on request from the corresponding author ([amaury1963@yahoo.com.mx](mailto:amaury1963@yahoo.com.mx)).

## Author contribution statement (CRediT).

**S.Y. Martínez-Martínez** - conceptualization, methodology, writing–review and editing, formal analysis; **A.M. Arzate-Fernández** - resources, funding acquisition, conceptualization, writing–review and editing; **M. Hernández-Solís** - methodology, review and editing; **L. Acosta-Villagran** – writing - review and editing.

## REFERENCIAS

- Aydin, M., Hossein, A., Haliloglu, K. and Tosun, M., 2016. Effect of polyamines on somatic embryogenesis via mature embryo in wheat. *Turkish Journal of Biology*, 40, pp. 1178–1184. <https://doi.org/10.3906/biy-1601-21>
- Alcázar, R., Bueno, M. and Tiburcio, A.F., 2020. Polyamines: small amines with large effects on plant abiotic stress tolerance. *Cells*, 9, pp. 1–20. <https://doi.org/10.3390/cells9112373>
- Arun, M., Chinnathambi, A., Subramanyam, K., Karthik, S., Sivannadhan, G., Thebora, J., Ali, S., Kil, C. and Ganapathi, J., 2016. Involvement of exogenous polyamines enhances regeneration and Agrobacterium-mediated genetic transformation in half-seeds of soybean. *Biotech*, 6(148), pp. 1–12. <http://doi.org/10.1007/s13205-016-0448-0>

- Bajaj, S. and Rajam, M.V., 1996. Polyamine accumulation and near loss of morphogenesis in long-term callus cultures of rice: restoration of plant regeneration by manipulation of cellular polyamine levels. *Plant Physiology*, 112, pp. 1343-1348. <http://doi.org/10.1104/pp.112.3.1343>
- Bautista-Montes, E., Hernández-Soriano, L. and Simpson, J., 2022. Advances in the micropropagation and genetic transformation of *Agave* species. *Plants*, 11, 1-12. <https://doi.org/10.3390/plants11131757>
- Bertoldi, D., Tassoni, A., Martinelli, L. and Bagni, N., 2004. Polyamine and somatic embryogenesis in two *Vitis vinifera* cultivars. *Physiologia Plantarum*, 120, pp. 657-666. <http://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0282.x>
- Chée, R.P. and Cantliffe, D.J., 1989. Composition of embryogenic suspension cultures of *Ipomoea batatas* Poir. and production of individualized embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 17(1), 39-52. <https://doi.org/10.1007/BF00042280>
- Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal COMERCAM., 2022. Informe estadístico. (Consultado: 10 de enero de 2023). Disponible en: <https://comercamdom.org.mx/estadisticas/>
- Davis, S.C., Dohleman, F.G. and Long, S.P., 2011. The global potential for *Agave* as a biofuel feedstock. *GCB Bioenergy*, 3, pp. 68-78. <http://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2010.01077.x>
- Domínguez, M.S., Alpuche, A.G., Vasco, N.L. and Molphe, E.P., 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(4), pp. 314-322. <https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/31-4/3a.pdf>
- Domínguez, C., Martínez, O., Nieto, O., Ferradás, Y., González, M. and Rey, M., 2023. Involvement of polyamines in the maturation of grapevine (*Vitis vinifera* L. 'Mencía') somatic embryos over a semipermeable membrane. *Scientia Horticulturae*, 308, pp. 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111537>
- El Dawayati, M.M., Abd, E.B.O.H., Zaid, Z.E. and Din, A.F.M., 2012. *In vitro* morpho-histological studies of newly developed embryos from abnormal malformed embryos of date palm cv. Gundila under desiccation effect of polyethylene glycol treatments. *Annals of Agricultural Sciences*, 57(2), pp. 117-128. <https://doi.org/10.1016/j.aas.2012.08.005>
- García-Mendoza, A., 2002. Distribution of *Agave* (*Agavaceae*) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal*, 74(4), pp. 177-187.
- García, C., Furtado, A., Costa, M., Britto, D., Valle, R., Royaert, S. and Marelli, J., 2019. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137, pp. 193-212. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>
- Ha, H.C., Sirisoma, N.S., Kuppusamy, P., Zweier, J.L., Woster, P.M. and Casero, R.A., 1998. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, pp. 11140-11145. <http://doi.org/10.1073/pnas.95.19.11140>
- Hazubska, T., Kalemba, E., Ratajczak, E. and Bojarczuk, K., 2016. Effects of abscisic acid and an osmoticum on the maturation, starch accumulation and germination of *Picea* spp. somatic embryos. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(59), pp. 1-14. <http://doi.org/10.1007/s11738-016-2078-x>
- Kakkar, R.K., Nagar, P.K., Ahuja, P.S. and Rai, V.K., 2000. Polyamines and plant morphogenesis. *Biologia Plantarum*, 43(1), pp. 1-11. <https://doi.org/10.1023/a:1026582308902>
- Kielkowska, A. and Adamus, A., 2021. Exogenously applied polyamines reduce reactive oxygen species, enhancing cell division, and the shoot regeneration from *Brassica oleracea* L. var. capitata protoplasts. *Agronomy*, 11(735), pp. 1-19. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040735>
- Kevers, C., Le Gal, N., Monteiro, M., Dommes, J. and Gaspar, T., 2000. Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. *Plant Growth Regulation*, 31(3), pp. 209-214. <https://doi.org/10.1023/a:1006344316683>

- Lelu, M.A. and Pâques, L.E., 2009. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x marschlinii*). Perspectives for breeding. *Annals of Forest Science*, 66, pp. 1-10. <https://doi.org/10.1051/forest/2008079>
- Mandal, C., Ghosh, N., Dey, N. and Adak, M.K., 2014. Effects of putrescine on oxidative stress induced by hydrogen peroxide in *Salvinia natans* L. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), pp. 550–558. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.871076>
- Martínez, S.Y., Arzate, A.M., Álvarez, C., Martínez, I. and Norman, T., 2021. Regeneration of *Agave marmorata* Roelz plants in temporary immersion systems, via organogenesis and somatic embryogenesis. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24 (3), pp. #84. <http://doi.org/10.56369/tsaes.3472>
- Méndez, H.A., Ledezma, M., Avilez, R.N., Juárez, Y.L., Skeete, A., Avilez, J., De-la-Peña, C. and Loyola, V.M., 2019. Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 10(77), pp. 1-19. <http://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>
- Minocha, R., Minocha, S.C. and Long, S., 2004. Polyamines and their biosynthetic enzymes during somatic embryo development in red spruce (*Picea rubens* Sarg.). *In vitro Cellular Developmental Biology– Plant*, 40(6), pp. 572–580. <https://doi.org/10.1079/IVP2004569>
- Montague, M.J., Koppenbrink, J.W. and Jaworski, E.G., 1978. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota* [J]. *Plant Physiology*, 62(3), pp. 430-433. <http://doi.org/10.1104/pp.62.3.430>
- Murashige, T. and Skoog, F.A., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15, pp.473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nookaraju, A., Barreto, M.S. and Agrawal, D.C., 2008. Cellular polyamines influence maturation and germination of somatic embryos from pro-embryonal masses of two grapevine cultivars. *Vitis*, 47(1), pp. 31–34. <https://doi.org/10.5073/vitis.2008.47.31-34>
- Paul, A., Mitter, K. and Raychaudhuri, S., 2009. Effect of polyamines on *in vitro* somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. *Plant Cell, Tissue33 and Organ Culture*, 97(3), pp. 303-311. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9529-7>
- Pasternak, T.P., Prinsen, E., Ayaydin, F., Mislolczi, P., Potters, G., Asard, H., Onckelen, H., Dudits, D. and Fehér, A., 2002. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology*, 129, pp. 1807–1819. <https://doi.org/10.1104/pp.000810>
- 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, pp. 59-64. <https://doi.org/10.2135/cropsci1979.0011183X001900010014x>
- Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Mora, A. and Rodríguez-Garay, B., 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 43, pp. 569-575. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9046-5>
- Ruffoni, B. and Savona, M., 2013. Physiological and biochemical analysis of growth abnormalities associated with plant tissue culture. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 54, pp. 191–205. <https://doi.org/10.1007/s13580-013-0009y>
- Takeda, T. F., Hayakawa, K. O.E. and Matsuoka, H., 2002. Effects of exogenous polyamine on embryogenic carrot cells. *Biochemical Engineering Journal*, 12, pp. 21-28. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00037-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00037-2)
- Torres, I., García, A.J., Sandoval, D. and Casas, A., 2020. *Agave cupreata*. The IUCN Red List of Threatened Species. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-1.RLTS.T114979361A116353713>
- Rajesh, M.K., Radha, E., Sajini, K.K. and Anitha, K., 2014. Polyamine-induced somatic embryogenesis and plantlet regeneration *in vitro* from plumular explants of dwarf cultivars of coconut (*Cocos nucifera*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 84, pp. 527–530.
- Reis, R.S., de Moura Vale, E., Heringer, A.S., Santa-Catarina, C. and Silveira, V., 2016. Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of



- sugarcane. *Journal of Proteomics*, 130, pp. 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.029>
- Reyes, J. I., Arzate, A.M., Piña, J.L. and Vázquez, L.M., 2017. Media culture affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw. *Industrial Crops & Products*, 108, pp. 81-85. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.021>
- Sathish, D., Theboral, J., Vasudevan, V., Pavan, G., Ajithan, C., Appunu, C. and Manickavasagam, M., 2020. Exogenous polyamines enhance somatic embryogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 56, pp. 29–40. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10022-6>
- Sharry, S., Cabrera, J.L., Estrella, L.H., Rangel, R. M., Ledesma, S. and Abedini, W., 2006. An alternative pathway for plant *in vitro* regeneration of chinaberry-tree *Melia azedarach* L. derived from the induction of somatic embryogenesis. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(3), pp. 187-194. <http://doi.org/10.2225/vol9-issue3-fulltext-13>
- Shu, S., Yuan, Y.H., Chen, J., Sun, J., Zhang, W.H., Tang, Y.Y., Zhong, M. and Guo, S., 2015. The role of putrescine in the regulation of proteins and fatty acids of thylakoid membranes under salt stress. *Scientific Reports*, 5, p. 14390. <https://doi.org/10.1038/srep14390>
- Silveira, V., Vita, A.M., Macedo, A.F., Dias, M.F.R., Floh, E.I.S. and Santa-Catarina, C., 2013. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 114, pp. 351–364. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0330-2>
- Szczygieł, K., Hazubska, T. and Bojarczuk, K., 2007. Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of the genera *Picea*, *Abies* and *Larix*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 7, pp. 7–15. <https://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-article-6260fe36-84dc-4e85-b07d-71e9021f3649/c/470-1346-1-PB.pdf>
- Wu, X.B., Wang, J., Liu, J.H. and Deng, X.X., 2009. Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) induced by glycerol. *Journal Plant Physiology*, 166, pp. 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.02.005>
- Yadav, J.S. and Rajam, M.V., 1998. Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. *Plant Physiology*, 116, pp. 617-625. <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.617>
- Yan, X., Corbin, K., Burton, R. and Ta, D., 2020. Agave: A promising feedstock for biofuels in the water-energy-food environment (WEFE) nexus. *Journal of Cleaner Production*. 261, pp. 1-26. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121283>
- Zavattieri, M.A., Frederico, A.M., Lima, M., Sabino, R. and Arnholdt, B., 2010. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1), pp. 1–9. <http://doi.org/10.2225/vol13-issue1-fulltext-4>