



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y
ANIMAL
LICENCIATURA EN AGRONOMÍA



Informe de conclusión:
Cultivo *in vitro* y crioconservación de tejido
vegetal de *Agave tequilana* Weber.

Prestador de servicio social:
Olguin Ortega Vanessa Anahi
Matricula: 2183026371

Asesores:
Interno: Mtra. Orea Coria Dorys Primavera
Externo: Dra. Sandoval Cancino Gabriela

Lugar de realización:
Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG).
Blvd. de la Biodiversidad #400 Rancho las Cruces Tepatitlán de Morelos, Jalisco.
C.P. 47600

Fechas de inicio y terminación:
14 de 08 de 2023 al 14 de 02 del 2024

Índice

- 1. Resumen**
- 2. Introducción**
- 3. Justificación**
- 4. Marco teórico**
 - Descripción botánica del agave
 - Taxonomía.
 - Características *Agave tequilana* Weber
 - Biodiversidad genética.
 - Medios de cultivo
 - Cultivo in vitro
 - Crioconservación
- 5. Objetivos**
- 6. Metodología**
- 7. Actividades realizadas**
- 8. Objetivos y metas alcanzados**
- 9. Resultados**
- 10. Discusión**
- 11. Conclusión**
- 12. Recomendaciones**
- 13. Bibliografía**

Resumen

México es considerado el centro de origen y biodiversidad del agave, albergando más de 200 especies, de las cuales el 75% se encuentra en el país y el 55% son endémicas. Sin embargo, su cultivo extensivo y la propagación vegetativa han reducido su riqueza genética. Ante la pérdida de diversidad biológica causada por la degradación ambiental, se ha vuelto esencial conservar los recursos genéticos mediante estrategias como los bancos de germoplasma.

El cultivo *in vitro* representa una herramienta clave para seleccionar ejemplares con mejores características genéticas, mientras que la crioconservación permite preservar tejidos vegetales a bajas temperaturas por largos periodos de tiempo, con bajo mantenimiento y espacio. En este contexto, se dio mantenimiento a plantas de *Agave tequilana* en cinco medios de cultivo diferentes, con el propósito de obtener material vegetal adecuado para realizar ensayos de crioconservación.

Se logró mantener exitosamente más de 2000 ejemplares de agave. Sin embargo, los ensayos de crioconservación arrojaron un bajo porcentaje de supervivencia, alcanzando solo el 1% en los 30 meristemos tratados. Estos resultados reflejan la necesidad de optimizar los protocolos de conservación, destacando tanto los avances como los retos en la preservación genética del agave, una especie fundamental para la biodiversidad y la cultura mexicana.

Introducción

México se considera como el centro del origen y biodiversidad del agave, del cual existen más de 200 especies, el 75% de especies se encuentra en el país y 55% solo crecen en suelo mexicano (García et al. 2019). México es el único país productor de *Agave tequilana*, este tiene la Denominación de Origen de Tequila (DOT), por lo cual solo se puede producir *Agave tequilana* e instalar plantas productoras de tequila en las regiones establecidas por el DOT (CRT, 2019b). Sin embargo, pese la importancia de esta especie su cultivo extensivo aunado a su método de propagación vegetativo, han causado la disminución de riqueza genética del cultivo (De Lourdes, 2017). De acuerdo con Trujillo et al. (2019) la preservación de la biodiversidad ha generado relevancia de manera progresiva debido a que la pérdida de los recursos genéticos derivada de la rápida degradación ambiental genera la necesidad de conservar los recursos biológicos a través de la creación de bancos de germoplasma.

El cultivo *in vitro* permite explotar la variabilidad genética por medio de la selección de ejemplares con mejores características genéticas (Espino et al, 2020) mientras que la técnica de crioconservación tiene como finalidad la preservación de la viabilidad del tejido vegetal a bajas temperaturas con el objetivo de resguardar especies vegetales de importancia a largo plazo con poco mantenimiento y espacio (De Lourdes, 2017).

En este contexto, se dio mantenimiento *in vitro* a plantas de *Agave tequilana* en cinco medios de cultivo distintos, con el propósito de obtener material vegetal para realizar ensayos de crioconservación. Se logró mantener exitosamente más de 2,000 ejemplares. Sin embargo, los resultados de los ensayos mostraron un porcentaje de supervivencia del 1% en los 30 meristemos sometidos al proceso de crioconservación.

Justificación

Las actividades para realizar durante el desarrollo de este servicio social estarán enfocadas a la conservación de los recursos genéticos vegetales del *Agave tequilana* Weber, así como la de otras especies vegetales, mediante el cultivo *in vitro*. De manera que se me capacitará en técnicas de innovación agrícola diseñadas para optimizar los procedimientos de propagación y la protección de recursos vegetales.

Estas actividades son de suma relevancia para la conservación del *A. tequilana*. Dicho cultivo es de gran importancia para el país, debido al impacto económico, cultural y social que tiene. Este agave es la principal materia prima para la industria tequilera y México cuenta con la Denominación de Origen del Tequila (DOT), por lo cual somos el único país productor de agave tequilero y tequila (CRT, 2023a). Sin embargo, pese a la importancia de esta especie su cultivo extensivo aunado a su método de propagación vegetativo, han causado la disminución de riqueza genética del cultivo (De Lourdes, 2017).

Mondragón et al. (2022) mencionan que la diversidad genética es importante para la subsistencia de las especies. En variedades silvestres se tiene una alta tasa de diversidad genética, a diferencia de las variedades domésticas como lo es el *A. tequilana* Weber, del cual su principal modo de propagación es a través de copias genéticamente iguales a la planta madre llamadas hijuelos; esta práctica reduce la diversidad genética de la especie por consiguiente es necesario seguir trabajando en los programas de conservación de dicha variedad, tales como el cultivo *in vitro* y la crioconservación. El cultivo *in vitro* permite explotar la variabilidad genética por medio de la selección de ejemplares con mejores características genéticas (Espino et al, 2020) mientras que la técnica de crioconservación tiene como finalidad la preservación de la viabilidad del tejido vegetal a bajas temperaturas con el objetivo de resguardar especies vegetales de importancia a largo plazo con poco mantenimiento y espacio (De Lourdes, 2017).

Marco teórico

México se considera como el centro del origen y biodiversidad del agave, del cual existen más de 200 especies, el 75% de especies se encuentra en el país y 55% solo crecen en suelo mexicano (García et al. 2019). México es el único país productor de *Agave tequilana*, este tiene la Denominación de Origen de Tequila (DOT), por lo cual solo se puede producir *Agave tequilana* e instalar plantas productoras de tequila en las regiones establecidas por el DOT (CRT, 2019b). Las zonas con DOT se distribuyen en 181 municipios del país lo tienen permitido de los estados de Jalisco (125 municipios), Michoacán (30 municipios), Tamaulipas (11 municipios), Nayarit (8 municipios) y Guanajuato (7 municipios) (CRT, 2019a; CRT, 2020b).

Descripción botánica del agave

El *Agave tequilana* pertenece al género agave, es una monocotiledónea, planta suculenta perenne, con ello tiende a extenderse radicularmente de 1.2 a 1.8 m de longitud, tienen hojas muy largas, firmes, rígidas y lanceoladas color verde midiendo de 90 a 120 cm de largo, el ápice de las hojas, son delgados, curvos y flexibles de color rojizo, la inflorescencia tiende a ser una panícula de 5 a 6 m de altura, el sistema radicular se constituye por un eje central grueso y raíces secundarias; al igual tienen un tallo grueso que logra alcanzar 30 a 50 cm de altura también conocido como piña es donde se encuentran los azúcares al llegar a la maduración. (Rulfo, 2007)

Taxonomía.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Asparagales

Familia: Asparagaceae

Subfamilia: Agavoideae

Género: Agave

Especie: *Agave tequilana* F. A. C. Weber

Características *Agave tequilana* Weber

La planta de agave crece en lugares áridos lo que le confiere el carácter de Xerófila. (Bautista et al., 2001). La textura de esta planta es carnosa, lo que se puede explicar por el contenido de agua en cada una de sus partes, sus hojas adquieren forma de roseta, en el tallo se almacenan los carbohidratos aprovechables para la industria, así mismo sus raíces son superficiales, y producen hijuelos, los órganos aéreos principales son las hojas y tallo. Por lo que se unen en un eje que comprende la porción que se conoce como cabeza o piña y esta posee un alto contenido de

fructanos, y una vez cosechada se utiliza para la producción de tequila (Montañez et al., 2011).

La reproducción de esta especie puede ser sexual y asexual, de forma sexual tiene que haber un intercambio genético por medio de la polinización. De forma asexual se reproducen gracias a que las raíces superficiales producen, dependiendo del manejo y las condiciones, hijuelos aproximadamente a los tres años, mismo que tendrán la misma información genética que la planta madre (Bautista et. al, 2001).

Biodiversidad genética.

De acuerdo con Trujillo et al. (2019) la preservación de la biodiversidad ha generado relevancia de manera progresiva debido a que la pérdida de los recursos genéticos derivada de la rápida degradación ambiental, asociada a la sustitución de cultivos tradicionales y el deterioro de los ecosistemas naturales y provocado por el aumento poblacional. Por lo que se genera la necesidad de conservar los recursos biológicos a través de la creación de bancos de germoplasma.

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales permite evaluar características específicas como la viabilidad, aclimatación, regeneración, crecimiento, etc. (Cortés et al., 2017).

Cultivo in vitro

El cultivo in vitro es una práctica que permite la propagación del tejido vegetal a partir de tejido meristemático, se lleva a cabo bajo condiciones asépticas, con condiciones controladas y una fuente de nutrientes (Flores et al., 2017). Los ejemplares in vitro se desarrollan en un recipiente hermético, sobre un medio gelificado enriquecido con nutrientes, alta humedad relativa y bajos niveles de luz. Fue desarrollada en los años 60 para la producción en masiva de plantas, permite la obtención de material vegetativo libre de enfermedades genéticamente igual al de la planta madre. Sin embargo, las características fisiológicas y morfológicas de las plantas crecidas *in vitro* serán en función a el ambiente físico y químico de los recipientes. Los protocolos de cultivo *in vitro* no consideran los factores ambientales en los que se desarrolla naturalmente el cultivo, se centran en experimentos de reguladores de crecimiento y nutrientes (Cañal et al., 2001).

Medios de cultivo

Los medios de cultivo representan un entorno artificial donde los organismos pueden desarrollarse en condiciones controladas de laboratorio, tratando de imitar su ambiente natural para cubrir sus necesidades esenciales como seres vivos. La formulación de un medio de cultivo depende tanto de los requerimientos específicos del organismo como del objetivo que se busca con su crecimiento. Por ello, la correcta selección y proporción de los nutrientes resulta fundamental. No obstante,

es la aplicación de una metodología adecuada lo que realmente permite obtener un medio de cultivo eficaz (Gómez et al., 2006).

De acuerdo con Krikorian (1991) Para su crecimiento, las células necesitan diversos nutrientes tanto orgánicos como inorgánicos. Estos nutrientes, deben estar presentes en dos cantidades distintas: macronutrientes y micronutrientes. El objetivo principal al preparar un medio de cultivo es proporcionar los nutrientes esenciales en las condiciones adecuadas para favorecer el desarrollo celular.

Crioconservación

Implementada como una alternativa para la conservación de especies vegetales, la crioconservación es un método que permite la preservación por periodos largos de tiempo del tejido vegetal a temperaturas -196°C sumergidas en nitrógeno líquido sin alterar la estabilidad genética y reduciendo costos de mantenimiento (Medina et al., 2023).

Este procedimiento se desarrolló en la década de 1970. A temperaturas muy bajas, los procesos metabólicos y físicos del tejido vegetal se detienen. Sin embargo, el agua dentro de las células puede formar cristales que al congelarse dañan la estructura del tejido vegetal. Para evitar esto, es necesario someter las células a un proceso de deshidratación o protegerlas antes de sumergirlas en el nitrógeno líquido (González & Engelmann, 2013).

Objetivos

Objetivo General:

- Capacitación en cultivo *in vitro* y crioconservación de *Agave tequilana* Weber

Objetivos Particulares:

- Capacitación en cultivo *in vitro* de otras especies.
- Preparación de medios de cultivos.
- Diseñar ensayos de crioconservación
- Establecimiento de cultivos *in vitro*.

Metodología

El presente trabajo se realizó en el Centro Nacional de Recursos Genéticos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, ubicado en Blvd. de la Biodiversidad #400 Rancho las Cruces, C.P. 47600, Tepatitlán de Morelos, Jalisco.



Figura 1. Zona donde realizo la evaluación. Google Maps (Fecha de consulta 12 de septiembre del 2025)

Preparación de Medios de Cultivo

Todos los medios de cultivo al terminar su preparación se calientan para verter en los frascos, ser sellados y esterilizados en la autoclave.

- Tratamiento 1 para 35 frascos (1.300 L)

Agua destilada: 1.300 L

MS: 5.75g

Sacarosa: 34g

B.A.: 13000 ml

2, 4D: 32.5

Agar: 12.35

Aforar: 5.8

- Tratamiento 2/ F2 para 200 frascos (.700 L)

Agua destilada: .700 L

MS: 3.32g

Sacarosa: 22.5g

KIN: 7.500 mm

AIB: 37.5 ml

Agar: 7.12g

Aforar: 5.8

- Tratamiento 3 para

Agua destilada: .700 L

MS: 3.1g

Sacarosa: 21g

2, 4-D: 17.5 ml

B.A: 5000 ml

Agar: 6.65g

Aforar: 5.8

- Medio de cultivo MS para 15 frascos (.600 L)

Agua destilada: .600 L

MS: 5.31g

Sacarosa: 18g

Agar: 5.4

Aforar: 5.8

- Crecimiento para 20 frascos (.700 L)

MS: 3.1g

Sacarosa: 21g

B.A.: 70 ml

2,4-D: 17.5 ml

Agar: 6.65

Aforar: 5.8

Mantenimiento de cultivo in vitro de otras especies

Para el mantenimiento de agave *in vitro* se realizan cortes en las raíces y ápices de las hojas, en caso de rizomas grandes estos se separan y se vuelven a cultivar en frascos con medios frescos, se dio prioridad medios secos y/u oxidados, plantas que demasiado grandes para el tamaño del frasco.

Ensayo Crioconservación

Para la realización de los ensayos de crioconservación no se realizó ningún establecimiento de cultivo *in vitro* de *Agave tequilana*, se utilizó material vegetativo de la colección de agave del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) al cual previamente se estuvo dando mantenimiento y se ejecutaron los siguientes pasos para el ensayo.

1. Se realizaron 30 cortes de meristemos de 1x2m
2. Siembra de meristemos en medios MS + 0.3 M de sacarosa

3. Incubación por 24 Horas a 24°C
4. Colocación de gotas de alginato de sodio al 2% + 0.4 M de sacarosa sobre plagas de aluminio
5. Colocación de meristemos
6. Cobertura de meristemos con cloruro de calcio + 0.4 M de sacarosa por 15min
7. Deshidratación con silica-gel durante 30 minutos
8. Inmersión en nitrógeno líquido por al menos 30 minutos
9. Inmersión en solución de recalentamiento (1M sacarosa) por 15 min
10. Siembre de meristemos en medio de cultivo Ms.
11. Incubación por 3 días a 24°C en oscuridad
12. Incubación permanente a 25°C con fotoperiodo de 16 horas



Establecimiento de cultivo in vitro de Ajo y semilla de orquídea

Establecimiento de cultivo in vitro Ajo

- 1- Se prepa Bravo 2 mil x L
- 2- Agri-mycim 6.25 mil x L
- 3- Limpieza y cortar un ¼ parte (parte superior del ajo)
- 4- Se hacen 2 lavados con jabón de 4 min aproximadamente
- 5- Se enjuagan con agua destilada 1min
- 6- Se pone en solución Bravo en cámara al vacío por 15 min
- 7- Se revuelve por 10 min
- 8- Se limpia la solución Bravo
- 9- Se coloca en solución Agri-mycim en cámara al vacío por 10 min
- 10- Se revuelve por 30 min
- 11- Se limpia la solución Agri-mycim
- 12- Se procede a la simbra en medio MS

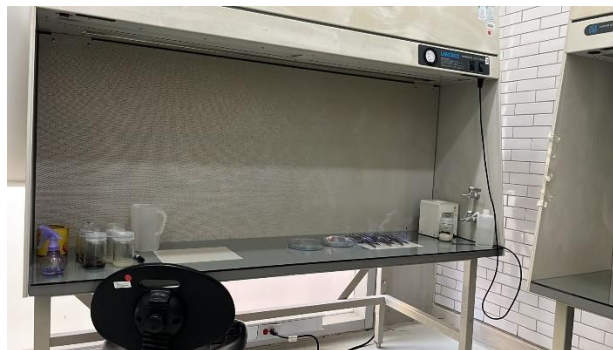
Establecimiento de cultivo in vitro de semilla de orquídea

- 1- Elaborar un sobre empleando papel filtro

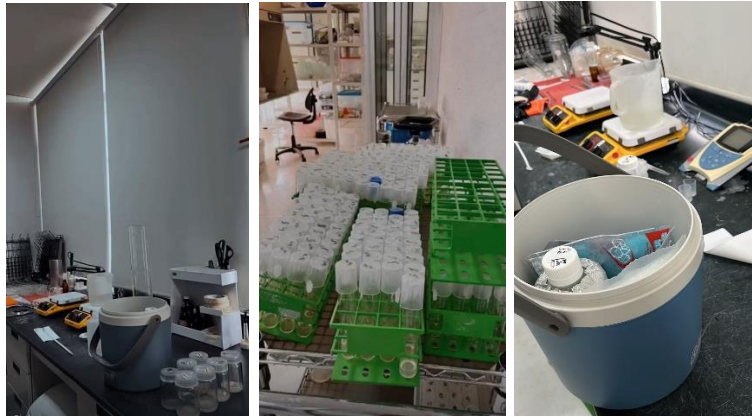
- 2- Colocar las semillas en el interior del sobre
- 3- Sumergir el sobre en una solución hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3% y Tween 20 (5 gotas/ L) durante 5 min
- 4- Enjuagar tres veces con agua destilada estéril. Cada enjuague de 1 minuto
- 5- Sumergir el sobre en alcohol al 70% durante 1 min
- 6- Enjuagar una vez con agua destilada estéril. Cada enjuague de 1 min
- 7- Proceder a la siembra en medio MS

ACTIVIDADES REALIZADAS

1. **Introducción a las actividades del laboratorio de cultivo *in vitro* y a su colección de *A. tequilana*:** Conocer las actividades que se realizan en el laboratorio, el uso de materiales y las cámaras de almacenamientos, así como las especies con las que cuentan, las diferentes metodologías que se realizan con distintas especies vegetales. La colección de *A. tequilana* es propagada con diferentes tratamientos en su medio de cultivo o bien solo están en medio de crecimiento, los tratamientos que manejan son: tratamiento 1, tratamiento F2, tratamiento 3.



2. **Preparación de medios de cultivo:** consiste en preparar soluciones nutritivas o sustratos específicos donde se cultivan tejidos *in vitro*. Estos medios proporcionan los nutrientes esenciales (como azúcares, sales minerales, aminoácidos, vitaminas, y otros compuestos) que los organismos necesitan para crecer y multiplicarse.

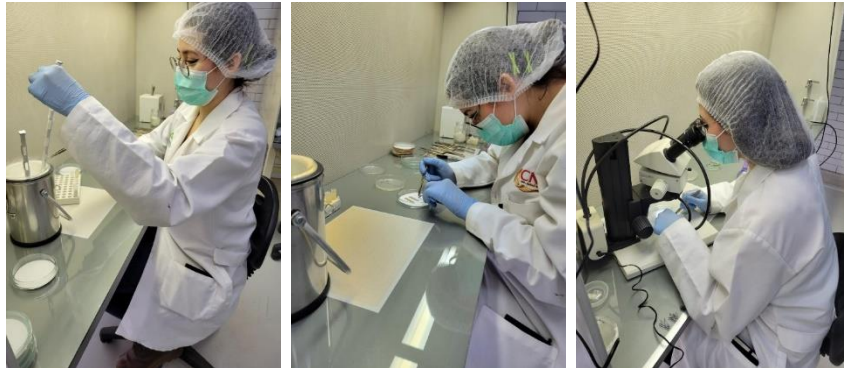


3. **Participación en actividades del trasplante y mantenimiento de cultivos de agave:** Cada determinado tiempo debe cambiarse el medio de cultivo y realizar cortes a los ejemplares para regular el tamaño de los ejemplares de la colección, revisar que los ejemplares no estén contaminados y separar los brotes que ya puedan sobrevivir de manera independiente a la planta madre.

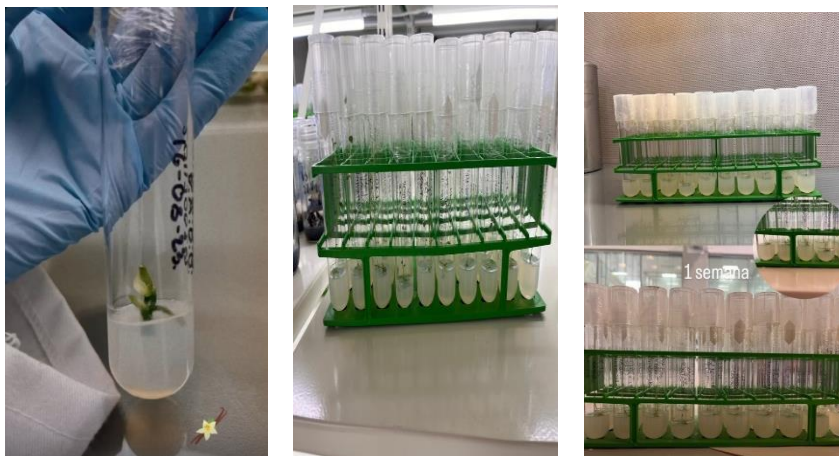


4. **Participación en los ensayos de crioconservación del agave:** Es el proceso mediante el cual se preserva tejido vegetal a temperaturas extremadamente bajas, generalmente en nitrógeno líquido (-196°C), para detener toda actividad metabólica y conservarlos durante largos períodos de tiempo sin que sufran daño irreversible. Para este proceso se realizan cortes de tejido meristemático de *Agave tequilana* con un diámetro de 2 milímetros, los cortes se realizan un día antes de realizar el proceso de crioconservación. Las células deben ser equilibradas osmóticamente antes de ser crioconservadas. Esto significa que se controla la cantidad de agua en el interior de las células para evitar el daño celular causado por la cristalización de agua debido a la congelación, posteriormente se sumergen en nitrógeno líquido, después las células son sometidas a un proceso de calentamiento para ser sembradas y evaluar el crecimiento.

del tejido después de ser sometido al proceso de criopreservación para conocer el porcentaje de viabilidad de esta metodología.



5. **Participación en el cultivo *in vitro* de papa, vainilla, cactus y cedro rojo:** Practicar los cortes y trasplante a medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) y medio Crecimiento Mínimo (CM) con papa (*Solanum tuberosum*) para aprender a utilizar las herramientas del cultivo *in vitro*. Mantenimiento del tejido vegetal de vainilla (*Vanilla planifolia*) y cedro rojo (*Cedrela odorata*) en medio MS y CM, mantenimiento en diferentes especies de cactáceas en medio de cactáceas (MC desechar medios contaminados, oxidados y deshidratado).



6. **Participación en las actividades de limpieza de materiales y equipos del laboratorio:** La limpieza de los instrumentos y la cristalería en el cultivo *in vitro* es de suma importancia, ya que el ambiente en el que se cultiva el tejido debe ser estéril y libre de contaminantes para asegurar el éxito de los experimentos o tratamientos. Lavado con detergentes: Los instrumentos y la cristalería se lavan con detergentes específicos que eliminan los residuos biológicos y químicos. Desinfección con agentes antimicrobianos: Se utilizan desinfectantes como alcohol isopropílico o soluciones de hipoclorito de sodio para eliminar cualquier posible contaminante microbiano. Esterilización: La esterilización mediante

autoclave (a altas temperaturas y presión) para eliminar cualquier microorganismo residual en los instrumentos y la cristalería, asegurando que se mantengan estériles antes de su uso.

Objetivos y metas alcanzados

Los ensayos de crioconservación fueron realizados con éxito utilizando el material vegetativo al cual se le dio mantenimiento durante el periodo de estancia, del cual nunca se tuvo en espécimen contaminado, desafortunadamente no se tuvo la oportunidad de realizar un establecimiento *in vitro* de *Agave tequilana* debido a que la colección ya es muy extensa y no se contaba con material.

Se logro aprender la elaboración de medios de cultivo y el uso de distintos tratamientos, tal como el uso de las herramientas del laboratorio exitosamente. Así como el establecimiento de cultivo *in vitro* de dos especies, cabe destacar que se tuvo la oportunidad de aprender un método utilizado en un banco de recursos genéticos de Colombia por las doctoras que lo desarrollaron.

Se dio mantenimiento a más de 2000 ejemplares de agave y aplicar diferentes técnicas de mantenimiento para ejemplares de distintas especies como papa (*Solanum tuberosum*), vainilla (*Vanilla planifolia*), cedro rojo (*Cedrela odorata*) y cactáceas

Resultados y discusión

Durante la estancia en el laboratorio de cultivo *in vitro* y crioconservación vegetal del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), se lograron importantes avances en el mantenimiento, propagación y preservación de *Agave tequilana*, así como en el fortalecimiento del conocimiento práctico en técnicas de cultivo *in vitro* y crioconservación.

1. Mantenimiento exitoso de la colección de *Agave tequilana*

Se brindó mantenimiento a una colección compuesta por más de 2,000 ejemplares de *Agave tequilana* en condiciones *in vitro*. Este proceso incluyó:

Tabla 1. Actividades de mantenimiento realizadas en la colección de *Agave tequilana* del Centro Nacional de Recursos Genéticos – INIFAP.

Actividad	Ejemplares atendidos
Revisión del estado general de los explantes.	2400
Eliminación de cultivos contaminados o con signos de oxidación.	300
Cambio de medio de cultivo en ejemplares con raíces o brotes sobre desarrollados.	1600
Separación de brotes que mostraban autonomía morfológica respecto a la planta madre.	500

Es importante destacar que, a pesar del volumen del trabajo, no se registraron contaminaciones en ninguno de los ejemplares manipulados, lo cual refleja una tasa de éxito del 100%, se contribuye a la aplicación rigurosa de las prácticas de esterilidad y protocolos técnicos.

Se trabajó y se analizaron distintos tratamientos aplicados en *Agave tequilana*, lo que permitió ampliar la comprensión sobre cómo las variaciones en los medios de cultivo afectan el desarrollo morfológico y fisiológico de las plantas.

Las citoquininas promueven la división celular, estimulan el crecimiento de brotes, retrasan la senescencia foliar y facilitan la movilización de nutrientes. Por su parte, las auxinas regulan el crecimiento y desarrollo al influir en la división, elongación y diferenciación celular. Estas hormonas son esenciales para la formación de raíces, tallos y hojas, además de participar en los tropismos, inhibir la abscisión de órganos y favorecer la formación de tejido vascular.

Tabla 3. Medios de cultivos utilizados para el cultivo in vitro de *A. tequilana*

Medios de cultivo	Reguladores de crecimiento
MS	(Macro y micronutrientes)
Tratamiento 1	MS (macro y micronutrientes), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) Auxinas, BA (bencil adenina) Citocininas
Tratamiento 2 (F2)	MS (macro y micronutrientes), AIB (ácido indolbutírico) Auxinas, KIN (kinetina), citocinina
Tratamiento 3	MS (macro y micronutrientes), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) Auxinas, BA (bencil adenina) Citocininas
MC	MS (macro y micronutrientes), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) Auxinas, BA (bencil adenina) Citocininas

El medio MS proporcionó únicamente los nutrientes básicos necesarios para el mantenimiento de las plantas. Cabe destacar que los ejemplares cultivados en este medio se destinaron principalmente a ensayos de crioconservación, ya que su crecimiento fue menor en comparación con los ejemplares cultivados en otros medios.

Los medios de cultivo MC, Tratamiento 1 y Tratamiento 3 contenían los mismos tipos de reguladores de crecimiento, aunque en diferentes proporciones. El medio MS presentó la menor concentración de citoquininas, lo cual se reflejó en un crecimiento de brotes mayor que en MS, pero menor que en los tratamientos mencionados.

En el caso del Tratamiento 3, se utilizó una menor concentración tanto de citoquininas como de auxinas en comparación con el Tratamiento 1, lo que resultó en que los ejemplares cultivados en este medio requirieran un mayor mantenimiento. Por otro lado, el Tratamiento 2 fue el único que incorporó reguladores de crecimiento distintos a los de los otros medios. Aunque estos

reguladores estaban presentes en mayor variedad, se usaron en menor concentración, por lo que no se observó una diferencia significativa ni en el crecimiento de las plantas ni en la cantidad de mantenimiento requerido.

2. Ensayos de crioconservación de *A. tequilana*

Se participó activamente en un ensayo de crioconservación de tejido meristemático de *Agave tequilana*, los cuales incluyeron las siguientes etapas:

- Corte de meristemas apicales con un diámetro aproximado de 2 mm.
- Equilibrio osmótico previo a la inmersión en nitrógeno líquido (-196 °C), con el fin de prevenir daños intracelulares por formación de cristales de hielo.
- Recalentamiento y siembra para evaluación de viabilidad.

Tabla 2. Resultado de crecimiento de meristemas sometidos al ensayo de crioconservación.

Meristemas	Cantidad
Cortados	30 (100%)
Con crecimiento después del proceso	3 (1%)
Sin crecimiento después de proceso	27 (99%)

El ensayo presentó un bajo porcentaje de recuperación (1%), lo cual es coherente con la naturaleza exigente de este tipo de procesos y la necesidad de seguir optimizando los tiempos de equilibrio osmótico, los crioprotectores utilizados, y las condiciones de recalentamiento. No obstante, se adquirió experiencia valiosa en esta técnica avanzada de conservación de germoplasma, contribuyendo al desarrollo de capacidades técnicas dentro del laboratorio.

3. Cultivo in vitro de otras especies vegetales

Además del trabajo con agave, se realizaron prácticas con otras especies vegetales, lo que permitió ampliar el conocimiento en la manipulación de tejidos vegetales in vitro:

Tabla 4. Taza de éxito obtenido en cultivo in vitro de otras especies atendidas.

Especies	Ejemplares cultivados exitosamente
Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	99%
Vainilla (<i>Vanilla planifolia</i>)	100%
Cedro rojo (<i>Cedrela odorata</i>)	100%
Cactáceas	100%

Se logró un 99% de éxito en el mantenimiento de cultivos. Los casos de contaminación detectados se atribuyeron a una desinfección inadecuada del material vegetal previo a los cortes. Aun así, se lograron cultivos con un 100% de éxito cuando se aplicaron correctamente los protocolos. Se trabajó en su mantenimiento, detectando y eliminando cultivos oxidados, contaminados o deshidratados. Estas actividades permitieron familiarizarse con las diferencias fisiológicas entre especies y su respuesta a distintos medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

La participación en las actividades de limpieza de instrumentos y cristalería también fue significativa, ya que permitió entender la importancia de mantener condiciones estériles. Estas actividades, aunque básicas, son fundamentales para el éxito de cualquier cultivo in vitro, y su correcta ejecución impacta directamente en la tasa de contaminación de los cultivos.

La estancia no solo cumplió con los objetivos académicos y formativos, sino que contribuyó activamente al funcionamiento del laboratorio, particularmente en un contexto de escasez de personal. La colaboración permitió aligerar la carga operativa del personal del CNRG, en tareas tanto técnicas (mantenimiento de cultivos) como logísticas (limpieza y preparación de materiales).

Conclusión

Podemos concluir que se realizaron satisfactoriamente las actividades establecidas en los objetivos. La estancia permitió adquirir competencias prácticas en técnicas de cultivo in vitro y crioconservación vegetal, además de fortalecer la comprensión teórica y operativa de los procesos implicados. Se lograron mantener ejemplares sin contaminación, participar en ensayos avanzados de conservación, y apoyar en tareas clave para el funcionamiento del laboratorio.

La experiencia también evidenció áreas de mejora en procesos como la crioconservación, donde los bajos porcentajes de viabilidad sugieren la necesidad de ajustes metodológicos. Aun así, la contribución fue significativa tanto para el aprendizaje personal como para el fortalecimiento del equipo técnico del laboratorio. De igual manera los conocimientos adquiridos durante la estancia sirvieron para generar mayor conciencia sobre la importancia de la preservación de los recursos genéticos del país.

Recomendaciones

Se recomienda fortalecer el vínculo entre las instituciones para que más alumnos tengan la oportunidad de realizar estancias en el Centro Nacional de Recursos Genéticos ya que en su mayoría desconoce la posibilidad de realizar visitas, estancias intersemestrales por parte de programas como DELFIN o de servicio social. Al centro se le sugiere dar a los alumnos la oportunidad de aprender más técnicas de micro-propagación y dar talleres sobre las actividades relacionadas en los distintos laboratorios para complementar el conocimiento adquirido.

Bibliografía

- Bautista, M. J. et al., (2001) Azúcares en agaves (Agave tequilana Weber) cultivados en el estado de Guanajuato. *Acta universitaria*, 2001, vol. 11, no 1, p. 33-38. <https://www.redalyc.org/pdf/416/41611105.pdf>
- Cañal, M. J., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez-Tames, R., & Majada, J. P. (2001). Fisiología del cultivo in vitro. *Biotechnología vegetal*, 1(1). <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/59/47>
- Cortés, J. A., Pérez, M. C., & Mora, R. S. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *In vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias (UNAD)*, 1(1). <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/2222/2382>
- CRT. (2023a) Declaratoria general de protección a la Denominación de Origen "Tequila". <https://www.crt.org.mx/index.php/es/pages-3/declaratoria> Fecha de consulta: 13 de noviembre del 2023
- CRT. (2023b). Información estadística <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/> Fecha de consulta: 13 de noviembre del 2023
- CRT. (2019a). Declaratoria. crt.org.mx. <https://www.crt.org.mx/index.php/es/pages-3/declaratoria>
- CRT. (2019b). ORGANISMO DE CERTIFICACIÓN (OC). crt.org.mx. <https://www.crt.org.mx/index.php/es/features-3/departamentos/organismo-de-certificacion-oc>
- CRT. (2020a). Consumo de Agave para Tequila y Tequila 100% de Agave. crt.org.mx. <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>
- CRT. (2020b). Geografía de la DOT. crt.org.mx. <https://www.crt.org.mx/index.php/es/pages-3/geografia-de-la-dot>
- De Lourdes, D. A. M. (2017). Embriogénesis somática y crioconservación en Agave spp. http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6036/Delgado_Aceves_Maria_De_Lourdes.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Espino, A., Dimas E, H. E., Ramírez, A, D., Cruz, R, J. M., Palmeros, S, P. A., Gómez, L, J. F. (2020). Caracterización molecular de mutantes de Agave tequilana inducidas con radiación gamma Co60 y su efecto en la acumulación de fructooligosacáridos. *Acta universitaria*, 30. <https://www.scielo.org.mx/pdf/au/v30/2007-9621-au-30-e2696.pdf>
- García-Mendoza, A. J., Franco Martínez, I. S., & Sandoval Gutiérrez, D. (2019). Cuatro especies nuevas de Agave (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta botánica mexicana*, (126).

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-71512019000100124&script=sci_arttext

- Gómez, G., & Batista, C. (2006). Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos tropicales*, 27(3), 17-24. <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193215825002.pdf>
- González Arnao, M. T., & Engelmann, F. (2013). *Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). <https://docs.google.com/viewerng/viewer?url=https://repositorio.iica.int/serve/r/api/core/bitstreams/aa3a179c-1b34-49ec-be38-a6a8f6d15850/content>
- Flores-Hernández, L. A., Robledo-Paz, A., & Jimarez-Montiel, M. J. (2017). Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento in vitro de orquídeas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(6), 1315-1328. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342017000601315&script=sci_arttext
- Krikorian, A. D. (1991). Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali: CIAT, 41-77. https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo3_parte1.pdf
- Medina-Mendoza, C., Luis Rodríguez-de-la, J., & Mendoza-Tolentino, Y. (2023). Crioconservación de *Laelia speciosa* en peligro de extinción. *Pádi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 11, 100-104. <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/icbi/article/view/10183/10118>
- Mondragón, KYR, Aguirre P, E., Gasca P, J., Klimova, A., Trejo S, RE, Guerra, MAR, ... & Eguiarte, LE (2022). Genómica de conservación del Agave tequilana Weber var. azul: baja diferenciación genética y exceso de heterocigotos en el agave tequila de Jalisco, México. *PeerJ*, 10, e14398. <https://peerj.com/articles/14398/>
- Montañez-Soto, J., Venegas-González, J., Vivar-Vera, M., & Ramos-Ramírez, E. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del Agave tequilana Weber azul. *Bioagro*, 23(3), 199-206. <https://www.redalyc.org/pdf/857/85721149007.pdf>

- SAGARPA (2013). *Nutrición de Agave tequilana y manejo de fertilizantes en un sistema de producción intensiva (riego por goteo)*. http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/3965/CIRNE_010208225400046952ok.pdf?sequence=1
- SEMARNAT (2016) *Murciélagos, agave y tequila: un círculo virtuoso que refleja la integración de la biodiversidad en la industria del mezcal y tequila*. <https://www.gob.mx/semarnat/prensa/murcielagos-agave-y-tequila-un-circulo-virtuoso-que-refleja-la-integracion-de-la-biodiversidad-en-el-sector-agricola?idiom=es-MXSIAP>. (2017). Maguey: un agave que nos provee diversos productos agroalimentarios. . . . gob.mx. <https://www.gob.mx/siap/articulos/maguey-un-agave-que-nos-provee-diversos-productos-agroalimentarios-nativos?idiom=es>
- Rulfo V., F. O. et al. (ed.). 2007. Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de Agave tequilana Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. https://www.researchgate.net/profile/Jose-Ignacio-Del-Real-Laborde/publication/311368794_Conocimiento_y_practicas_agronomicas_para_la_produccion_de_Agave_Tequilana_Weber_en_la_zona_de_denominacion_de_origen_del_tequila/links/59a46bcaaca272a6461bc2bc/Conocimiento-y-practicas-agronomicas-para-la-produccion-de-Agave-Tequilana-Weber-en-la-zona-de-denominacion-de-origen-del-tequila.pdf
- Trujillo, I., Subero, B., & Silva, A. (2019). Conservación in vivo e in vitro de germoplasma vegetal en escuelas de los Altos Mirandinos. Tekhné, 22(1). <https://revistasenlinea.saber.ucab.edu.ve/index.php/tekhne/article/view/4066>