



INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
FORESTALES, AGRICOLAS Y PECUARIAS
CENTRO DE INVESTIGACION REGIONAL DEL NORESTE
CAMPO EXPERIMENTAL SALTILLO

GUIA PARA LA MICROPROPAGACION Y PRODUCCION *in vitro* DE PLANTAS DE SOTOL (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.)



AGRADECIMIENTO

Se agradece al Fondo CONACYT- CONAFOR a través del proyecto C03-10376, al Gobierno del estado de Coahuila y a la Fundación Produce Coahuila A.C. por las aportaciones económicas brindadas para la realización del presente trabajo.

Folleto Técnico Num. 37

Diciembre 2007

**SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA,
DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN**

LIC. ALBERTO CARDENAS JIMENEZ
Secretario

ING. FRANCISCO LOPEZ TOSTADO
Subsecretario de Agricultura y Ganadería

ING. ANTONIO RUIZ GARCIA
Subsecretario de Desarrollo Rural

ING. JEFREY MAX JONES JONES
Subsecretario de Fomento a los Agronegocios

C. RAMON CORRAL AVILA
Comisionado Nacional de Acuacultura y Pesca

LiC. JOSE DE JESÚS LEVY GARCÍA
Oficial Mayor

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES,
AGRICOLAS Y PECUARIAS**

Ph. D. PEDRO BRAJCICH GALLEGOS
Director General

Ph. D. SALVADOR FERNANDEZ RIVERA
Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

Ph. D. ENRIQUE ASTENGO LOPEZ
Coordinador de Planeación y Desarrollo

LIC. MARCIAL ALFREDO GARCIA MORTEO
Coordinador de Administración y Sistemas

CENTRO DE INVESTIGACION REGIONAL DEL NORESTE

Ph.D. SEBASTIAN ACOSTA NUÑEZ
Director Regional

Ph. D. JORGE ELIZONDO BARRON
Director de Investigación, Innovación y Vinculación

M. C. NICOLAS MALDONADO MORENO
Director de Planeación y Desarrollo

M. A. JOSE LUIS CORNEJO ENCISO
Director de Administración

M. C. GUSTAVO J. LARA GUAJARDO
Director de Coordinación y Vinculación en Coahuila

GOBIERNO DEL ESTADO DE COAHUILA

PROFR. HUMBERTO MOREIRA VALDÉS
Gobernador Constitucional del Estado

C. HÉCTOR O. FERNÁNDEZ AGUIRRE
Secretario de Fomento Agropecuario

LIC. ELIAS JUAN MARCOS ISSA
Subsecretario Agropecuario y de Comercialización

ING. JOSÉ CARLOS DESTENAVE MEJIA
Director de Agricultura

M. V. Z. ENRIQUE GARCIA PÉREZ
Director de Ganadería

Ph. D. HÉCTOR FRANCO LÓPEZ
Secretario del Medio Ambiente y Recursos Naturales

DELEGACION ESTATAL DE SAGARPA

ING. EDUARDO VILLARREAL DÁVILA
Delegado en Coahuila

ING. JORGE ALBERTO FLORES BERRUETO
Subdelegado Agropecuario

LIC. REYNOLD MALTOS ROMO
Subdelegado de Planeación

LIC. REYNALDO PEREZ-NEGRON
Subdelegado de Administración

FUNDACION PRODUCE COAHUILA, A. C.

ING. BERNABE IRUZUBIETA QUEZADA
Presidente

ING. JUAN ANTONIO OSUNA CÁRDENAS
Vicepresidente

M. Sc. IGNACIO A. GONZÁLEZ CEPEDA
Presidente del Consejo Consultivo Sureste

ING. JAVIER GARCÍA NÚÑEZ
Tesorero

M. C. JORGE MONTAÑÉZ DE LEÓN
Gerente

En el proceso editorial de esta publicación colaboraron:

Comité Editorial del Campo Experimental Saltillo:

M. C. Gustavo J. Lara Guajardo
Dr. Marco A. Arellano García
M. C. Francisco J. Contreras de la Ree
Ing. Eutimio de J. Cuellar Villarreal
M. C. Carlos Ríos Quiroz
M. C. David Castillo Quiroz

Supervisión Técnica:

Dr. Jorge Elizondo Barrón
Dr. Isidro Humberto Almeyda León

Captura Computacional:

M. C. Edith Villavicencio Gutiérrez

Fotografía:

M. C. Edith Villavicencio Gutiérrez

Edición:

M. C. Antonio Cano Pineda

**MAYOR INFORMACION
INIFAP**

Campo Experimental Saltillo
Blvd. Vito Alessio Robles No. 2565
Col. Nazario S. Ortiz Garza
Saltillo, 25100, Coah.
Tel. (01 844) 4 16 20 25
Fax (01 844) 4 39 19 01
E-mail: villavicencio.edith@inifap.gob.mx

Dirección de Coordinación y Vinculación del
INIFAP-Coahuila
Blvd. Vito Alessio Robles No. 2565
Col. Nazario S. Ortiz Garza
Saltillo, 25100, Coah.
Tel /Fax: (01 844) 4 39 24 36
E-mail: lara.gustavo@inifap.gob.mx



SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN

SAGARPA

inifap

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

**GUIA PARA LA MICROPROPAGACION Y
PRODUCCION *in vitro* DE PLANTAS DE
SOTOL (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.)**

M. C. Edith Villavicencio Gutiérrez

Investigador del Programa de Cultivo de Tejidos Vegetales
del Campo Experimental Saltillo

M. C. Antonio Cano Pineda

Investigador de Viveros y Plantaciones Forestales
del Campo Experimental Saltillo

Ing. Arturo Juárez Santana

Técnico del Laboratorio de Cultivos Vegetales
del Campo Experimental Saltillo

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y
Pecuarias

Centro de Investigación Regional del Noreste
Campo Experimental Saltillo
México Diciembre 2007

**GUIA PARA LA MICROPROPAGACION Y
PRODUCCION *in vitro* DE PLANTAS DE SOTOL (*Dasyilirion
cedrosanum* Trel.)**

No está permitida la reproducción total o parcial de este folleto, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, por fotocopia, por registro u otros medios, sin el permiso previo y por escrito de los titulares del derecho de autor.

Derechos reservados © 2007, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
Progreso No. 5
Barrio de Santa Catarina
Del. Coyoacán
04010 México, D. F.
Tel. (55) 38718700

Primera edición
Impreso en México
Tiraje: 500 ejemplares
No. de Registro INIFAP /CIRNE /F73
ISBN 978-970-43-0328-0

Esta obra se terminó de imprimir
en Diciembre de 2007 en los talleres de:

IMPRESOS GARCER
Arteaga No. 820
Zona Centro
Saltillo, 25000, Coah.
Tel. /fax (844) 4102380

Folleto Técnico Núm. 37 Diciembre 2007
CAMPO EXPERIMENTAL SALTILLO
Blvd. Vito Alessio Robles No. 2565
Col. Nazario S. Ortiz Garza
Saltillo, 25100, Coah.
Tel. (01 844) 4 16 20 25
Fax (01 844) 4 39 19 01
E-mail: villavicencio.edith@inifap.gob.mx

La cita correcta de este folleto es:

Villavicencio G., E. E.; A. Cano P. y A. Juárez S. 2007. Guía para la micropropagacion y producción *in vitro* de plantas de sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.). INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Saltillo. Folleto Técnico Núm 37 Coahuila, México. 29 p.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
CARACTERÍSTICAS DEL SOTOL (<i>Dasyilirion cedrosanum</i> Trel.)	3
APLICACIÓN DE LA MICROPROPAGACIÓN EN ESPECIES FORESTALES NO MADERABLES	3
ESQUEMA PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE SOTOL	4
POTENCIAL DE APLICACIÓN DE LA TÉCNICA	7
Ventajas de la producción <i>in vitro</i> de sotol	7
CARACTERÍSTICAS PARA LA PROPAGACIÓN CLONAL DE SOTOL POR CULTIVO DE TEJIDOS	8
Tipos de micropropagación	9
REQUERIMIENTOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PLÁNTULAS <i>IN VITRO</i>	9
MEDIO NUTRITIVO BASE	10
Procedimiento para la elaboración del medio nutritivo	10
Vida de anaquel del medio de cultivo	12
PROCESO DE MICROPROPAGACION	14
Etapa 1. ESTABLECIMIENTO DEL INÓCULO EN UN CULTIVO ASÉPTICO	14
Protocolo de desinfección	16
Germinación <i>in vitro</i>	17
Velocidad de emergencia	18
Etapa 2. MULTIPLICACIÓN O INDUCCIÓN DE BROTES	19
Etapa 3. ENRAIZAMIENTO	23
Etapa 4. ACLIMATACIÓN	25
BIBLIOGRAFÍA	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Planta de sotol (<i>Dasyilirion cedrosanum</i> Trel.) de poblaciones naturales.	2
2	Esquema para la producción de vitroplantas de sotol (<i>Dasyilirion cedrosanum</i> Trel.).	6
3	Elaboración del medio nutritivo para la micropropagación de sotol (<i>Dasyilirion cedrosanum</i> Trel.) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP (LACUTEV-CESAL).	13
4	a.-Contaminación de semillas de sotol <i>Dasyilirion cedrosanum</i> Trel.) b.- semillas de sotol establecidas en un cultivo aséptico en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP.	15
5	Aspecto del hipocotilo y epicotilo de las semillas de sotol (<i>Dasyilirion cedrosanum</i> Trel.) a los 28 días de germinadas <i>in vitro</i> en el LACUTEV-CESAL.	18
6	Velocidad de emergencia de las semillas de sotol (<i>Dasyilirion cedrosanum</i> Trel.) después de 20 días de establecidas <i>in vitro</i> en el LACUTEV-CESAL-INIFAP.	19
7	Establecimiento de explantes en la etapa de multiplicación para la inducción de brotes de sotol (<i>Dasyilirion cedrosanum</i> Trel.) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CESAL-INIFAP.	21
8	Número de brotes de sotol (<i>Dasyilirion cedrosanum</i> Trel.) generados <i>in vitro</i> en los diferentes tratamientos evaluados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CESAL-INIFAP.	21
9	Producción de brotes de sotol (<i>Dasyilirion cedrosanum</i> Trel.) generados en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> en Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CESAL-INIFAP.	22
10	Número y longitud de raíces de las vitroplantas de sotol generados en el medio de cultivo MBR en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CESAL-INIFAP.	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
11	Plantas de sotol producidas en el LACUTEV y aclimatadas en invernadero del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP.	25

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Componentes de los medios de cultivo para la producción de plántulas <i>in vitro</i> (<i>Dasyilirion cedrosanum</i> Trel.).	11
2	Protocolo de desinfestación para las semillas de sotol (<i>Dasyilirion cedrosanum</i> Trel.).	16

GUÍA PARA LA MICROPROPAGACIÓN Y PRODUCCIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE SOTOL (*Dasyliirion cedrosanum* Trel.)

M. C. Edith Villavicencio Gutiérrez¹.
M. C. Antonio Cano Pineda²
Ing. Arturo Juárez Santana³

INTRODUCCIÓN

El sotol es una planta de la que se utilizan sus tallos denominados “piñas” para elaborar industrialmente la bebida alcohólica llamada “sotol” (Figura 1). Por ser una bebida con sabor auténtico que tradicionalmente se ha elaborado en la región desértica de Coahuila, se le otorgó a esta entidad junto con los estados de Chihuahua y Durango la denominación de “origen”. En esta región, el aprovechamiento de las poblaciones naturales de sotol está regulado por las normas NOM-005-RECNAT-1997, NOM-007-RECNAT-1997 y la NOM-159-SCFI-2004. Desde su denominación de origen la industria requiere satisfacer un volumen constante y uniforme de piñas, mismas que actualmente se extraen de poblaciones naturales y son de calidad heterogénea, imponiendo una fuerte presión al recurso. Para evitar el deterioro de las poblaciones naturales y uniformizar la calidad del producto, se requiere de un manejo sustentable en la región, en donde se promuevan entre otras cosas el establecimiento de plantaciones comerciales que faciliten el aprovechamiento, manejo en campo y

¹M. C. Investigador del Programa de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo. CIRNE-INIFAP.

²M. C. Investigador de Viveros y Plantaciones Forestales del Campo Experimental Saltillo. CIRNE-INIFAP.

³Ing. Agr. Técnico del Laboratorio de Cultivos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP.

satisfagan la demanda del producto. El programa de plantaciones requiere del abastecimiento constante de material vegetativo, mismo que puede obtenerse mediante la micropropagación, en donde de manera intensiva se pueden producir plantas de sotol en cantidades suficientes, permitiendo con esto la programación de los ciclos de producción y abastecimiento constante de “piñas” a la industria, tal como se hace en el esquema de producción del tequila.



Figura 1. Planta de sotol (*Dasyliirion cedrosanum* Trel.) de poblaciones naturales.

Las plantaciones comerciales requieren de un volumen grande y constante de plantas uniformes con alta calidad fitosanitaria. En el caso del sotol, la demanda de plantas puede tener dos procedencias vía sexual y asexual, esta última puede obtenerse mediante la aplicación de técnicas modernas para la producción de plantas como la micropropagación.

CARACTERÍSTICAS DEL SOTOL (*Dasyliirion cedrosanum* Trel.)

Esta especie es una planta perenne, policárpica y semicilíndrica grande que adquiere esta forma al ir desarrollando sus hojas muy angostas del centro hacia la periferia, produciendo un tallo en forma de “piña”, que puede alcanzar hasta 3 metros, con un peso de más de 100 kg. Esta especie es una planta dioica, que desarrolla plantas con flores unisexuales con un solo tipo de gametos; es decir, se pueden encontrar plantas que florecen desarrollando estambres (masculinas) y plantas con flores que desarrollan pistilos (femeninas). (Melgosa y Santos, 2004). Estas plantas poseen un escapo floral que puede contener una gran cantidad de estructuras florales, lo que hace suponer que pueden generarse una cantidad considerable de semillas; sin embargo, el polen tiene que transportarse por el viento para llegar a los pistilos de una planta hembra, proceso en el cual se pierden muchas células gaméticas masculinas, lo que reduce la producción de semillas (Olhagaray *et. al.*, 2004). Este proceso se complica porque el ciclo reproductivo de esta especie no es anual y se presenta una asincronía de flores masculinas y femeninas en su floración, lo que limita la reproducción sexual de esta especie.

APLICACIÓN DE LA MICROPROPAGACIÓN EN ESPECIES FORESTALES NO MADERABLES

La micropropagación es parte de la Biotecnología Agrícola y Forestal que a nivel mundial se ha utilizado ampliamente en especies de interés económico. Esta técnica utiliza el cultivo de tejidos vegetales para multiplicar rápida y masivamente una especie de interés, basándose en el concepto de totipotencia vegetal, en el que se promueve el desarrollo de un organismo completo, considerando la diferenciación celular y potencial genético del genotipo.

El sotol es una especie no maderable del semidesierto que pertenece a la familia de las Agavaceas. Para especies no maderables que se distribuyen en nuestro país la técnica de micropropagación, se ha aplicado con diferentes propósitos, entre ellos; producir genotipos mejorados de nopal (*Opuntia* sp.) de doble o triple propósito, multiplicar de manera intensiva plantas de agave tequilero (*Agave tequilana* Weber), e incrementar especies con estatus de riesgo, lo que demuestra el potencial de aplicación que tiene esta técnica en la propagación de plantas (Escobar, 1985; Binh *et. al.* 1990; Villavicencio 2004).

ESQUEMA DE MICROPROPAGACIÓN PARA EL SOTOL

De acuerdo con Litz y Gray (1992), la micropropagación es una técnica para multiplicar especies o variedades en un tiempo más corto comparado con el método de propagación tradicional (vía sexual o asexual), por lo que se ha considerado como una opción para producir plantas de sotol de manera intensiva en cantidades suficientes, mismas que pueden utilizarse con diferentes propósitos.

Las diferentes etapas de la micropropagación han sido descritas por Pierik (1987) y Margara, (1988), y han sido evaluadas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP para determinar el esquema de micropropagación y la técnica de cultivo de tejidos para el sotol. De los resultados obtenidos se ha determinado que el esquema de micropropagación abarca cuatro etapas para la producción de vitroplantas que en conjunto requieren de un período de ocho meses.

La primera etapa es la de establecimiento, en donde las semillas se establecen en un cultivo aséptico *in vitro*. La segunda etapa es la de multiplicación, en donde se promueve la inducción de brotes a partir de explantes tomados de epicotilos. El enraizamiento y aclimatación son las etapas siguientes, en donde se promueve la elongación de los brotes y la inducción de raíces. Después que los brotes forman su sistema radical, se ha completado la formación de las nuevas plantas, las cuales pueden posteriormente aclimatarse en invernadero (Figura 2).

En la producción intensiva de vitroplantas de sotol, se requiere de segmentos de una o más plantas donadoras, mismas que se utilizan para obtener brotes, los cuales al desarrollarse formarán nuevas plantas. De esta manera se puede continuar con la etapa de multiplicación, subcultivando los brotes en un medio de cultivo definido para que éstos se incrementen y continúe su proliferación. Así es como el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo (LACUTEV-CESAL), ofrece a los productores una nueva opción rentable para impulsar el desarrollo productivo en la región.

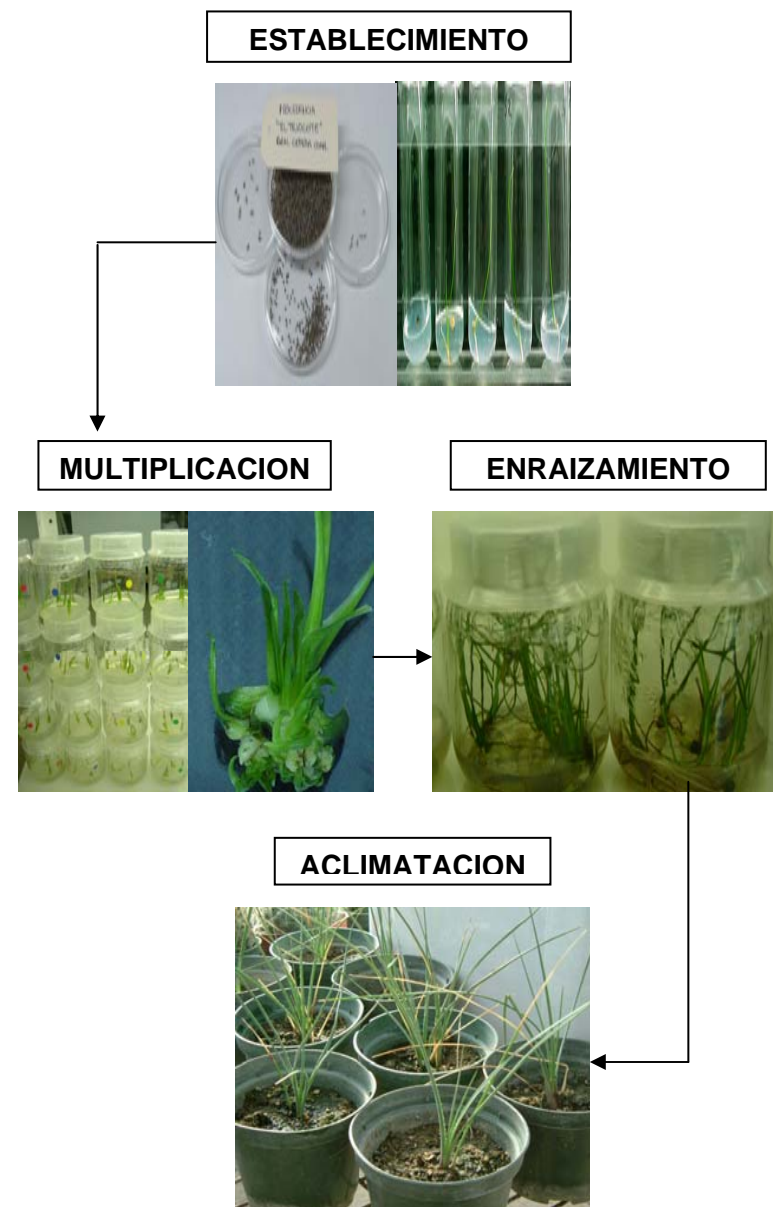


Figura 2. Esquema para la producción de vitroplantas de sotol (*Dasyliirion cedrosanum* Trel.).

POTENCIAL DE APLICACION DE LA TÉCNICA

Esta tecnología puede aplicarse para producir plantas de sotol de más de seis especies del género *Dasyilirion sp.* que se aprovechan en las áreas sotoleras de Chihuahua, Durango y Coahuila.

Bajo este esquema de propagación, el volumen de producción de plantas puede incrementarse en más del 500 %, siendo una técnica rentable y efectiva en comparación, con las técnicas convencionales de propagación.

Esta tecnología puede implementarse en empresas registradas dedicadas a la producción de plantas bajo el esquema Laboratorio-Invernadero, quedar incluida dentro del área de desarrollo en las empresas dedicadas a la industrialización de esta bebida o bien formar parte de un agronegocio como una nueva opción productiva en apoyo a los productores del semidesierto de esta región sotolera.

Ventajas de la producción *in vitro* de sotol

El Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo (LACUTEV-CESAL CESAL) es un laboratorio certificado que apoya la actividad agroindustrial en la región, desarrollando productos rentables de alto valor agregado. Este laboratorio ofrece a productores interesados el servicio de capacitación en cultivo de tejidos para la micropropagación de sotol y la venta de plantas producidas bajo el esquema Laboratorio-Invernadero, considerando los siguientes beneficios.

- ❑ Mediante la micropropagación pueden multiplicarse grandes cantidades de plantas de sotol en un espacio reducido, a bajo costo en tiempos económicamente rentables.

- ❑ La producción de plantas *in vitro* de sotol asegura su condición fitosanitaria, lo que facilita la adquisición de permisos para su movilización.
- ❑ Garantiza la uniformidad genética de las plantas producidas.
- ❑ Las plántulas pueden transportarse fácilmente a diferentes invernaderos del país.

CARACTERÍSTICAS PARA LA PROPAGACIÓN CLONAL DE SOTOL POR CULTIVO DE TEJIDOS

La propagación clonal de plantas por cultivo de tejidos se basa en el principio de que toda célula vegetal tiene la información genética para regenerar un organismo completo.

Para que cada célula pueda expresar su potencial genético es necesario que en todas las etapas de la micropropagación se le proporcionen condiciones ambientales adecuadas que han sido agrupadas de la forma siguiente:

- a) Condiciones químicas o de medio de cultivo: Medios nutritivos de composición definida, que incluyan compuestos inorgánicos como macro y micronutrientes, compuestos orgánicos como carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, reguladores del crecimiento, complejos orgánicos y sustancias de soporte físico como agar.
- b) Condiciones físicas y de incubación: Temperatura, iluminación, humedad relativa y tipo de recipientes (tubos, frascos, y envases de polipropileno).

Tipos de micropropagación

El sotol pertenece a la familia Agavaceae, en donde el cultivo de tejidos vegetales se ha aplicado en diferentes especies como; *Agave victoria-reginae* (Martínez *et. al.*, 2003); *A. sisalana* (Hazra *et al.*, 2002); *A. fourcroydes* (Robert *et. al.*, 1987) y *A. parrasana* (Santacruz- Ruvalcaba *et. al.*, 1999), determinándose que existen cuatro métodos por los que un genotipo puede regenerarse *in vitro*.

1. Inducción de embriones somáticos a partir de callos o células en suspensión.
2. Inducción de brotes adventicios a partir de callos o células en suspensión, para su posterior enraizamiento.
3. Formación de brotes adventicios directamente del tejido, sin pasar por la etapa de callo.
4. Inducción de brotes a partir de ápices o yemas axilares, para su posterior enraizamiento.

En sotol la inducción de brotes se realiza mediante organogénesis directa, es decir, a partir de tejido somático sin pasar por la etapa de callo.

REQUERIMIENTOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PLÁNTULAS *in vitro*

Para iniciar la propagación *in vitro* de sotol se requieren semillas del genotipo o especie de interés. Para su establecimiento se pueden utilizar tubos o envases de vidrio, en donde se pueden establecer desde uno hasta cinco inóculos o explantes. Para la proliferación de brotes se pueden utilizar envases de vidrio, polipropileno y magentas, para establecer desde cinco hasta 25 explantes.

MEDIO NUTRITIVO BASE

Existen diferentes medios de cultivo, por lo que su selección depende del objetivo que se persiga, ya sea establecimiento *in vitro* o multiplicación.

Los explantes requieren de un medio que suministre un balance nutricional adecuado, para que a corto plazo se obtenga un crecimiento óptimo y los resultados deseados.

El medio base que se utilizó para la producción de plántulas *in vitro* de sotol es el de Murashige y Skoog (1962); el cual se complementa con diferentes dosis de fitohormonas, vitaminas y ajustadores osmóticos (Cuadro 1).

Procedimiento para la elaboración del medio nutritivo

- 1) En un vaso de precipitado o matraz erlenmeyer agregar la cuarta parte de la cantidad de agua destilada que se desea preparar de medio.
- 2) Disolver la cantidad de sacarosa.
- 3) Añadir el volumen correcto de cada una de las soluciones de micro y macroelementos a la mezcla.
- 4) Agregar el volumen correcto de quelatos, vitaminas y aminoácidos.
- 5) Mezclar estos componentes y aforar con agua destilada a la cantidad que se desea preparar del medio.
- 6) Añadir las fitohormonas si el medio nutritivo lo requiere.

Cuadro 1. Componentes de los medios de cultivo para la producción de plántulas *in vitro* de sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.).

Composición	Peso Molecular (g)	Requerimiento para 1 L de medio	
		Milimoles (mM)	Micromoles (µM)
Macroelementos			
NH ₄ NO ₃	80.40	20.60	
KNO ₃	101.11	18.80	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.48	1.50	
KH ₂ PO ₄	136.09	1.25	
Ca(NO ₃) ₂	236.15	3.00	
Microelementos			
IK	166.01		1.00
H ₃ BO ₃	61.83		1.00
MnSO ₄ ·4H ₂ O	228.00		0.10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.54		0.30
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241.95		0.01
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.68		0.001
CoCl ₂ ·6H ₂ O	239.93		0.001
Quelatos			
Na ₂ EDTA	372.24		1.00
FeSO ₄ ·7H ₂ O	278.28		0.90
Vitaminas			
Ac. Nicotínico	123.10		4.06
Piridoxina	205.60		2.43
Tiamina	337.30		0.29
Myoinositol	180.20		5.54
Aminoácidos			
Glicina	75.07		0.26
Ac. Pantoténico	238.30		0.49
Medio de Cultivo			
Sacarosa	342.30	87.64	
Agar (6.0 g/l)			

7) Introducir el electrodo del potenciómetro en la mezcla, esperar que el aparato tome la lectura y ajustar el pH a 5.7. Para bajarlo aplicar gotas de HCl 1N y para subirlo aplicar gotas de NaOH.

8) Colocar el medio en una parrilla para calentar y agregar el Agar, mezclar hasta diluirlo, antes de ebullición.

9) Vaciar el medio en los recipientes, ya sean frascos, tubos o envases y esterilizar por 20 minutos en autoclave considerando una temperatura de 120 °C y 4 libras de presión.

10) Ya esterilizados, los recipientes con el medio de cultivo se colocan en un lugar limpio (Figura 3).

Vida de anaquel del medio de cultivo

Siempre que sea posible se debe utilizar un medio de cultivo fresco de uno o dos días de preparación, ya que la vida de anaquel del medio de cultivo disminuye conforme aumenta el tiempo de almacenamiento teniendo un efecto en el crecimiento y desarrollo de los explantes. A temperatura ambiente, el medio de cultivo puede almacenarse por un tiempo máximo de una semana. Si se quiere aumentar el tiempo de almacenamiento el medio de cultivo tiene que refrigerarse ± 5 °C. En todos los casos el medio debe quedar almacenado en áreas asépticas.



Figura 3. Elaboración del medio nutritivo para la micropropagación de sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP (LACUTEV-CESAL).

PROCESO DE MICROPROPAGACION

ETAPA 1. ESTABLECIMIENTO DEL INÓCULO EN UN CULTIVO ASÉPTICO

El propósito de esta etapa es establecer *in vitro* un explante estéril en un medio de cultivo aséptico. Esta es una etapa crítica de gran importancia, dado que en este proceso intervienen factores que determinan su éxito como; la contaminación endógena o exógena causada por bacterias y hongos (Hubstenberger *et. al.*, (1992). Este efecto puede evitarse si se realiza una buena desinfección en la que se involucran diferentes tipos y concentraciones de agentes desinfectantes, los cuales no deben ser tóxicos y pueden seleccionarse en función del tipo de explante que vaya a utilizarse. Asimismo, debe evitarse aplicar una alta concentración de productos, ya que estos pueden inhibir la germinación, o bien la brotación de yemas. El protocolo de desinfección es muy importante, ya que de él depende el establecimiento *in vitro* del explante.

En esta etapa se utilizaron semillas de sotol como explante, mismas que se desinfectaron obteniendo en la etapa de establecimiento el 1% de contaminación equivalente a obtener 1 tubo contaminado por bacterias u hongos por cada 100 tubos establecidos, lo que muestra que la desinfección realizada fue satisfactoria eliminando las partículas de polvo y microorganismos sin provocar la muerte del tejido vegetal. (Figura 4 a y b).

Villegas (1990) y Páques (1991), agregan que además de eliminar la contaminación, en esta etapa debe evitarse la sobrehidratación, malformación y oxidación del tejido, ya que esto puede generar plántulas o brotes anormales que difícilmente podrán multiplicarse.



Figura 4. a.-Contaminación de semillas de sotol *Dasyliirion cedrosanum* Trel.), b.- semillas de sotol establecidas en un cultivo aséptico en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP (LACUTEV-CESAL).

De acuerdo al genotipo y tipo de explante, se han generado para el establecimiento aséptico diferentes protocolos de desinfección (Gratton y Fay, 1990). En todos estos se ha utilizado agua destilada o bidestilada estéril, diferentes concentraciones de etanol, hipoclorito de sodio (ingrediente activo de muchos blanqueadores comerciales) o hipoclorito de calcio más un surfactante para mejorar el contacto entre el explante y el producto desinfectante.

Protocolo de desinfección

Para el establecimiento *in vitro* de las semillas de sotol es importante considerar el tiempo de inmersión y concentración de agentes desinfectantes, para lo cual se evaluaron ambos parámetros seleccionando el siguiente protocolo de desinfección (Cuadro 2).

Cuadro 2. Protocolo de desinfección para las semillas de sotol (*Dasyliirion cedrosanum* Trel.).

Procedimiento
<ul style="list-style-type: none"> • Lavar las semillas en agua estéril y una solución de plata coloidal al 0.052 % por 3 min. • Sumergirlas en alcohol al 70 % v/v por 5 min. • Posteriormente sumergir en Hipoclorito de sodio al 100 %. (6% concentración comercial) por 3 min. más unas gotas de tween 20. • Enjuagar 5 veces con agua destilada estéril dentro de la campana de flujo laminar. • Establecer las semillas en tubos o frascos con 5 y 15 mL de medio respectivamente.

Con este protocolo de desinfección no se dañó o quemó la testa de las semillas de sotol, tampoco se necrosó el micrópilo y mató el embrión, permitiendo la emergencia de la radícula durante la germinación (Figura 4b).

Considerando que del éxito de esta etapa depende el desarrollo futuro de la micropropagación, algunos autores como Mauseth (1977), Hernández (1994) y Villegas (1996) disminuyeron la concentración de algún reactivo o eliminaron el uso de alguno de estos productos; lo que en todos los casos incluyendo al sotol se logró establecer un cultivo aséptico, mostrando que la eficiencia de un protocolo de desinfección depende del tipo de tejido vegetal que se maneje y del tiempo de exposición de los reactivos empleados.

Germinación *in vitro*

Las semillas de sotol están formadas por un embrión, material de reserva y tejidos de protección, estos tegumentos forman una cubierta protectora llamada testa que en el caso del sotol es cerosa e impermeable al paso del agua. Como ocurre con todas las especies de propagación sexual la germinación de esta especie consiste en la reanudación del crecimiento del embrión, el cual ha permanecido en estado latente.

Durante el proceso de germinación el metabolismo celular de la semilla se incrementa, el embrión activa su crecimiento, la cubierta de la semilla se rompe y emerge la plántula (Calderón, 2004).

En el caso del sotol se encontró que bajo condiciones *in vitro* el 100% de las semillas son quiescentes y viables presentando un embrión vivo con capacidad para germinar (Figura 5).

Los resultados mostraron que esta especie no requiere promotores de la germinación para romper el letargo morfológico que se presenta cuando las semillas se hacen germinar en invernadero. En condiciones controladas, el medio de cultivo (MBG) que influye en el porcentaje de germinación de sotol fue preparado con osmoacondicionadores, obteniendo una germinación mayor al 80%.



Figura 5. Aspecto del hipocotilo y epicotilo de las semillas de sotol (*Dasyliirion cedrosanum* Trel.) a los 28 días de germinadas *in vitro* en el LACUTEV-CESAL.

Velocidad de emergencia

La emergencia de las plántulas de sotol obtenida en el LACUTEV-CESAL es más rápida bajo condiciones asépticas, que en condiciones *ex vitro*, siendo el tipo de medio y condiciones de incubación *in vitro* lo que favorece este proceso, inhibiendo el característico letargo morfológico que se observa cuando las semillas germinan en condiciones naturales, o cuando éstas se hacen germinar en invernadero o vivero.

Del análisis realizado se determinó que la emergencia de las plántulas se registra desde los siete días de establecimiento de las semilla *in vitro*, observándose un hipocotilo pivotante fuerte, con un epicótilo compuesto por dos hojas rudimentarias. En el MBG se requiere en promedio de 20 días para que las semillas completen su proceso de germinación (Figura 6).



Figura 6. Velocidad de emergencia de las semillas de sotol (*Dasyliirion cedrosanum* Trel.) después de 20 días de establecidas *in vitro* en el LACUTEV-CESAL-INIFAP.

ETAPA 2. MULTIPLICACIÓN O INDUCCIÓN DE BROTES.

En esta etapa se busca producir un rápido incremento de órganos y otras estructuras, las cuales posteriormente pueden dar origen a vitroplantas.

El incremento puede ser obtenido por: inducción de órganos adventicios, formación de embriones o por incremento de brotes axilares.

Los nuevos brotes se generan a partir de un determinado tipo de explante y una determinada concentración de reguladores de crecimiento aplicados a un medio de cultivo base de multiplicación (MBM). De las condiciones de cultivo se obtiene una tasa de multiplicación que puede variar dependiendo la especie.

En sotol los nuevos brotes se obtuvieron a partir de epicótilos considerados como explante, los cuales se establecieron en un medio de cultivo base (MBM), adicionado con una relación citocinina-auxina de 10:1, mostrando que la respuesta morfogenética depende de la relación cinergista de dichas fitohormonas, siendo la interacción BA-AIB (bencilaminopurina-acido indolbutírico) la que promueve la inducción de brotes de esta especie (Figura 7 y 8).

Aunque Palma (2000), utilizó en la etapa de multiplicación, concentraciones de citocininas y auxinas menores a las utilizadas en el LACUTEV-CESAL este mismo efecto se encontró en el desarrollo de los brotes; es decir, bajas concentraciones de fitohormonas generaron en ambos casos un menor desarrollo y número de brotes como se muestra en los primeros tres tratamientos (T1, T2 y T3) de los cinco evaluados con las interacciones BA-AIB, BA-ANA (bencilaminopurina-acido indolbutírico) y KIN-AIB (Kinetina-acido indolbutírico) (Figura 8).

Los tratamientos con la interacción BA-AIB mostraron que el número de brotes se incrementa al aumentar los niveles de concentración de ambas fitohormonas, siendo el MBM adicionado con $1.10 \mu\text{M}$ de BA + $10.36 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ de AIB el que promueve la inducción de brotes de sotol, registrando una tasa de multiplicación de 7 brotes/explante, duplicando de acuerdo a la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) el número de brotes de los tratamientos T1, T2 y T3 (Figuras 8 y 9).



Figura 7. Establecimiento de explantes en la etapa de multiplicación para la inducción de brotes de sotol (*Dasyliroium cedrosanum* Trel.) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CESAL-INIFAP.

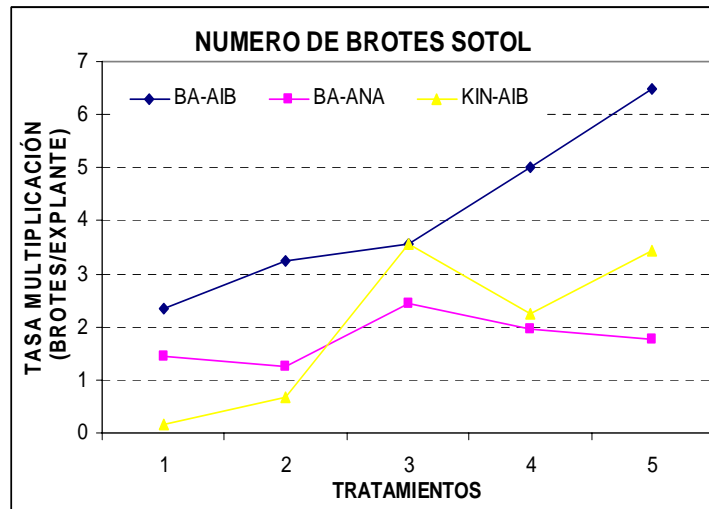


Figura 8. Número de brotes de sotol (*Dasyliroium cedrosanum* Trel.) generados *in vitro* en los diferentes tratamientos evaluados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CESAL-INIFAP.

Con este tratamiento se obtiene la mejor respuesta morfogénica para inducción de brotes *in vitro* de sotol generando brotes con una altura de 88 mm, diámetro basal de 5 mm y 6 hojas en promedio, lo que representa una producción exponencial de 1:7:7.

Esta producción es semejante a la encontrada en *Agave sisalana* por Nikan (1997), determinándose que el éxito en la producción de vitroplantas de sotol depende del balance adecuado de los reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo base de multiplicación (MBM). Este balance influye en el desarrollo, número de brotes generados y velocidad de regeneración de los mismos, lo que hace que la técnica de micropropagación sea una forma viable que puede utilizarse para multiplicar *in vitro* esta especie, registrando una tasa de multiplicación altamente significativa, que permite obtener nuevas vitroplantas rápidamente.



Figura 9. Producción de brotes de sotol (*Dasyliroium cedrosanum* Trel.) generados en la etapa de multiplicación *in vitro* en Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CESAL-INIFAP.

Esta tasa de multiplicación es mayor a la reportada por Palma (2000), quién utilizó yemas axilares

tomadas de coronas de sotol de campo, mostrando que el tipo de explante tiene un efecto significativo en la micropropagación de sotol y que la combinación de fitohormonas inducen mayor respuesta morfogénica expresada por el número de brotes/explante, altura, número de hojas y diámetro basal de las vitroplantas.

Estos nuevos brotes son de calidad uniforme y pueden enraizarse satisfactoriamente en un medio específico para generar una planta completa.

ETAPA 3. ENRAIZAMIENTO

En esta etapa, los brotes generados en la fase anterior se subcultivaron en un medio de cultivo de enraizamiento (MBR), considerando la interacción $C_{12}H_{22}O_{11}$ – AIB en donde se seleccionó el mejor tratamiento de los ocho evaluados para promover la inducción de raíces y obtener de este modo una vitroplanta completa.

La formación de raíces adventicias en los brotes de sotol se obtuvo de manera exógena a las seis semanas de incubación en un medio MBR, adicionado 116.8 mM de $C_{12}H_{22}O_{11}$ y $18.6 \times 10^{-1} \mu M$ de AIB, generando 3.4 raíces/vitroplanta, mostrando que el número de raíces depende de la relación cinergista del osmoacondicionador y de las auxinas (Figura 10).

De los tratamientos evaluados en esta etapa se encontró que conforme aumenta la concentración de fitohormona, la longitud de raíces aumenta sin tener efecto en el número de raíces generado. Esto muestra que las vitroplantas de sotol endógenamente tienen niveles de auxina que ayudan a promover este efecto generando vitroplantas con una longitud de su sistema radicular mayor o igual a 100 mm.

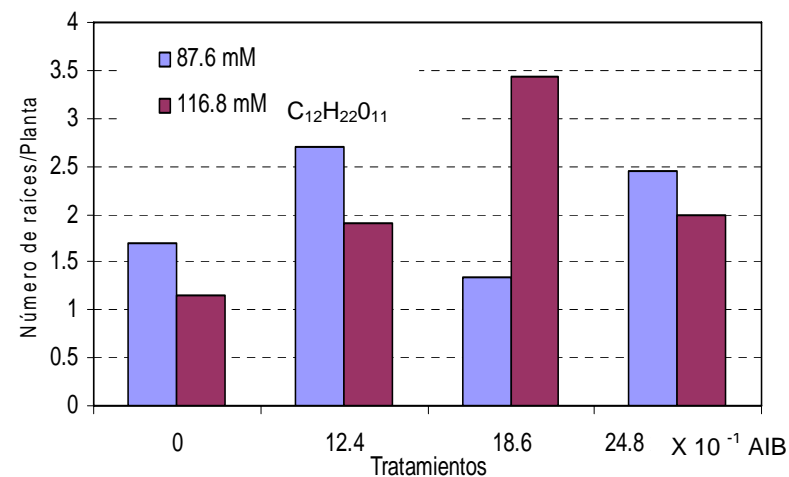


Figura 10. Número y longitud de raíces de las vitroplantas de sotol generados en el medio de cultivo MBR en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CESAL-INIFAP.

ETAPA 4. ACLIMATACIÓN

Esta es la etapa crítica para todas las especies vegetales que se micropropagan *in vitro*, que se refiere al paso de las plantas de su condición heterótrofas *in vitro* al paso de su condición autótrofa *in vivo*; es decir, su trasplante a suelo. En este proceso influye la condición fisiológica de las nuevas plantas, las condiciones ambientales del invernadero y el tipo de sustrato que se utilice.

Dado que las plántulas de sotol obtenidas *in vitro*, carecen de adaptaciones morfológicas que les permitan el traspaso directo a las condiciones de campo, éstas deben ser mantenidas por tiempo en invernadero para su aclimatación. En esta etapa se aclimataron exitosamente plantas sanas de sotol con 10 cm de altura foliar, con raíces bien formadas y por lo menos con tres hojas verdes. Estas fueron establecidas en macetas de 3" con un sustrato estéril comercial (Figura 11).



Figura 11. Plantas de sotol producidas en el LACUTEV y aclimatadas en invernadero del Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP.

BIBLIOGRAFIA

- Binh L. T., L. T. Moui, H.T.K. Oanh, T.D. Thang and D. T. Phonh. 1990. Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Vol. 23 No.1 pp 67-70.
- Calderon, G. E. R. 2004. Rompimiento de latencia en semillas de sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.) mediante escarificación física y química. Tesis de licenciatura. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila. Mexico 75 p.
- Escobar H., A., 1985. Micropropagación y almacenamiento *in vitro* de *Opuntia amyclaea* Tenore. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 80 p.
- D. O. F. 2004. Norma Oficial Mexicana NOM-159-SCFI-2004, Bebidas alcohólicas sotol- especificaciones y métodos de prueba. Junio.
- García-Saucedo, P. A.; M. Valdez-Morales; M. E. Valverde; A. Cruz-Hernandez and O. Paredes-López. 2005. Plant regeneration of three genotypes used as human food. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Vol.80 No.2 pp 215-219.
- Gratton, J., and M. F. Fay. (1990). Vegetative propagation of cacti and other succulent *in vitro*. In: Pollard, J. W. and Walker, J. M.(eds), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 6 *Plant Cell and Tissue Culture*. Humana Press. pp 219-225.
- Hazra S. H.; Sudripa Das and A. K. Das. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Vol. 70 No.3 pp 235-240.

- Hernández H., M. y H. Godínez A. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*. 26:33-52.
- Hubstenberger, J. F., P. W. Clayton and G. C. Phillips. 1992. IV Micropropagation of Cacti (Cactaceae). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 20:49-68.
- Litz, E. R., and D. J. Gray. 1992. Organogenesis and somatic embryogenesis. *In*: Ed. by F. A. Hammerschlag and Relitz. *Biotechnology of perennials fruit Crops*. Cab International pp 3-25.
- Margara, I. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid España. pp: 172-197.
- Martínez P., A.; M. P. Ortega-Larrocea; V. M. Chávez and R. Bye. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoria-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Vol. 74 No.2 pp 135-142.
- Mauseth, D. J. 1977. Cactus tissue culture: A potential method of propagation. *Cact. and Succ. J.* Vol. XLIX: 80-81.
- Melgosa C., A.; J. Santos S. T. 2004. Contribución al conocimiento y distribución de las especies de *Dasyllirion* spp. (Sotol) en Chihuahua México. *Revista Ciencia Forestal*. Vol. 29 No. 95 pp 25-40.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-497.
- Nikan T. D., 1997. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Vol. 51 No.3 pp 225-228.

- NOM-159-SCFI-2004, (NORMA OFICIAL MEXICANA. <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Federal/PE/APF/APC/SE/Normas/Oficiales/NOM-159-SCFI-2004.pdf>. Consulta Septiembre 2007.
- NOM-005-RECNAT-1997 (NORMA Oficial Mexicana). <http://www.economia.gob.mx/work/normas/noms/1997/05recnat.pdf> (Consulta Septiembre 2007)
- NOM-007-RECNAT-1997 (Norma Oficial Mexicana). <http://portalgp.puebla.gob.mx/docs/transparencia/14532.pdf> (Consulta Septiembre 2007)
- Olhagaray R., E. C.; G. Esparza Ch.; F. Vega S. 2004. Producción y comercialización de licores de sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.) en Durango México. *Revista Ciencia Forestal*. Vol. 29 No. 95 pp 83-90
- Palma E., J. I. 2000. Bases para la propagación (*Dasyllirion* spp.) *via in vitro* y por semilla. Tesis Maestro en Ciencias. Facultad de Ciencia Agrícolas y Forestales. Universidad Autónoma de Chihuahua. P. 89.
- Páques, M. 1991. Vitrification and micropropagation; Causes, remedies and prospects. *Acta Hort*. 283-289.
- Pierik, R. L. M., 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers pp 54-82.
- Robert L., M.; J. L. Herrera; F. Contreras and Keith N. Scorer. 1987. In vitro propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen) *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Vol. 8 No.1 pp 37-48.
- Santacruz-Ruvalcaba F., H. Gutiérrez-Pulido and B. Rodríguez G. 1999. Efficient in vitro propagation of *Agave parrasana* Beger. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Vol. 56 No.3 pp 163-167.

Santamaría J., M.; L. Herrera J. and Robert M. L. 1995. Stomatal Physiology of Micropropagated CAM Plant; *Agave tequilana* (Weber). *Plant Growth Regulation*. 16: 211- 214.

Villavicencio, Gtz. E. E., C. A. Berlanga R., A. Arredondo G. 2004. Efecto del almacenamiento en la germinación in vitro de tres especies de cactáceas ornamentales. V Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. Agosto. p. 32.

Villegas M., A., 1990. Micropropagación de frutales. en; Fundamentos teórico prácticos de cultivo de tejidos. Colegio de Postgraduados, FAO. pp 101-105.

Villegas M., A. 1996. Desifestación y establecimiento *in vitro* del explante. Laboratorio de Biotecnología. Especialidad Fruticultura. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México 5 p.