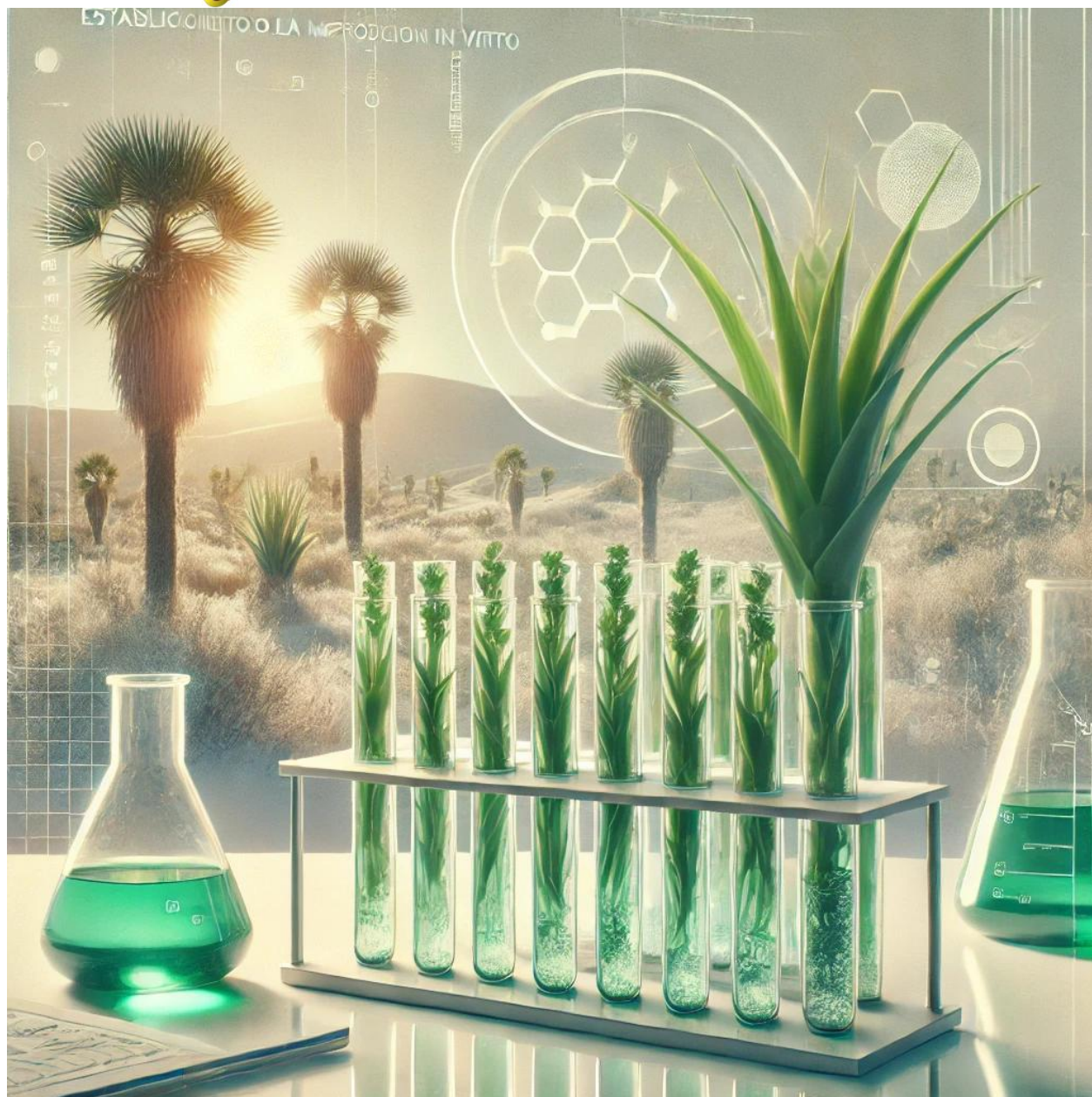




Establecimiento de la micropropagación *in vitro* de sotol (*Dasylirion leiophyllum*), como alternativa a su aprovechamiento sostenible

Avila-Treviño Jazmin Anai¹
Flores-Cordoba María Antonia²
Quezada-Rivera Jesús Josafath³

¹ Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad Autónoma de Chihuahua, México. Postdoctoral. Profesora-investigadora

² Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad Autónoma de Chihuahua, México. Profesora-investigadora

³ ²Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez del Estado de Durango. Gómez Palacio, Durango. Profesor-investigador

Revista de Investigación Multidisciplinaria Iberoamericana, RIMI © 2023 by Elizabeth Sánchez Vázquez is licensed under

CC BY-NC-SA 4.0 

RESUMEN

El sotol es una planta silvestre que se desarrolla en regiones con climas áridos y semiáridos dentro del Desierto Chihuahuense. Representa un importante valor comercial, debido a su uso en la elaboración de bebidas. Es así, que interesarse por su aprovechamiento sostenible, específicamente en la obtención de la materia prima, es prioritario para evitar el deterioro de las poblaciones silvestres; ya que, a pesar de los esfuerzos por mantener un aprovechamiento sostenible de la especie, se presentan irregularidades en su utilización, lo que ha generado la disminución de sus poblaciones y por ende un impacto ecológico. Es imperativo contar con alternativas que se traduzcan en un manejo sostenible. Por lo que se determinó el establecimiento de la propagación masiva de sotol (*Dasylium*

leiophyllum), mediante la técnica de cultivo *in vitro* bajo condiciones controladas, de medios de cultivo, reguladores de crecimiento, luz y temperatura. A partir de ello, se logró la determinación de los protocolos de desinfección y germinación *in vitro*, así como su establecimiento. Esta técnica biotecnológica mostró efectividad en los porcentajes de desinfección y germinación, además de la obtención de plantulas *in vitro*. Lo anterior, podría traducirse en una propuesta para el abastecimiento de material vegetal a productores sotoleros, con lo cual también se podrá amortiguar el sobre aprovechamiento de la especie, y la disminución de su presencia silvestre.

Palabras clave: Biotecnología, micropropagación, reguladores de crecimiento

INTRODUCCIÓN

El sotol es una planta que se desarrolla en regiones con climas áridos y semiáridos dentro del Desierto Chihuahuense (Melgoza y Sierra, 2003). Actualmente, esta especie representa la materia prima para la fabricación de bebidas alcohólicas. Además, destaca gracias a su denominación de “origen” debido a que tradicionalmente es elaborada en la región desértica de Coahuila, Chihuahua y Durango (Reyes-Valdés et al., 2012).

En su mayoría, los productores sotoleros, extraen plantas silvestres para la elaboración de sus productos, lo que ha generado una disminución importante de esta especie en su estado natural. Para el caso particular del Estado de Chihuahua, este panorama ha despertado tal interés, que en la actualidad existe el “DECRETO N° LXVI/RFDEC/0767/2020 I P.O, mediante el cual se crearon “Las bases para

promover y fomentar la actividad sotolera del estado” (Gobierno del Estado de Chihuahua, 2019). Lo anterior, debido a las bases históricas que se tienen sobre esta y otras especies de importancia comercial, las cuales al no contar con una regulación o manejo adecuado han resultado en un sobre aprovechamiento, que podría tener repercusiones ecológicas importantes.

Por lo que interesarse por su aprovechamiento sostenible en cada uno de sus procesos, sobre todo en la obtención del material vegetal, es prioritario para evitar el deterioro de las poblaciones nativas. Es importante se tenga un manejo controlado en la región, mediante la generación de estrategias que apoyen a los productores en la resolución de sus problemáticas actuales, que recaen sobre todo en el aprovechamiento de plantas silvestres. Una estrategia de cultivo que podría representar una alternativa al aprovechamiento silvícola del sotol, es el cultivo de tejidos vegetales, debido a que presenta ventajas como una rápida producción de plantas y una disminución de costos de manejo, comparada con la germinación por semilla convencional, que reporta un requerimiento mayor de tiempo en crecimiento y por ende, mayor inversión. Debido a ello, se determinó establecer la propagación masiva de sotol (*Dasyllirion leiophyllum*), mediante la técnica de cultivo *in vitro* bajo condiciones controladas, de medios de cultivo, reguladores de crecimiento, luz y temperatura.

A partir de ello, se podría implementar esta técnica biotecnológica para lograr el abastecimiento de material vegetal a productores sotoleros, con el objetivo de amortiguar el sobre aprovechamiento de la especie, y la disminución de su presencia silvestre.

MARCO TEORICO

Dasyllirion leiophyllum es parte de la familia Nolinacea, integrada por más de 200 géneros y 2500 especies. El sotol, es un importante componente ecológico en su zona de desarrollo, ya que contribuye al mantenimiento del suelo. Además sirve como alimento para diferentes especies, en particular de roedores y aves (Melgoza y Sierra, 2003).

Actualmente esta planta, representan la materia prima en la elaboración de diferentes tipos de bebidas alcohólicas, principalmente la más conocida como “sotol”. Este producto presenta un sabor auténtico y tradicional que se ha sido elaborado primordialmente en la región desértica de Coahuila, Chihuahua y Durango. Se estima que se producen alrededor de 520,000 litros anuales, y que esta industria crece a un ritmo promedio anual del 5% (Reyes-Valdés et al, 2012). Estas cifras tienen un impacto relevante, ya que este crecimiento ha repercutido directamente debido a que su tasa de reproducción y desarrollo es menor a la de su aprovechamiento. Lo que ha despertado interes en buscar alternativas hacia su uso racional.

Una alternativa con resultados sobresalientes ha sido el cultivo de tejidos vegetales, el cual es una técnica biotecnológica que permite el crecimiento y desarrollo de plantas en un medio fuera de su ambiente natural, mediante un conjunto heterogéneo de técnicas con las cuales, un explante (una parte separada del vegetal) se cultiva asépticamente (libre de microorganismos) en un medio de cultivo de composición química definida y se desarrolla bajo condiciones ambientales controladas (luz y temperatura) (Alcaraz, 2021).

A partir de la aplicación de esta metodología, se cuenta con registros de resultados positivos para diferentes especies de *Dasyllirion*. Podemos mencionar que su esquema de micropropagación, abarca cuatro etapas para el desarrollo de plantas juveniles, que en conjunto requieren de un período aproximado de ocho meses (INIFAP, 2007). A comparación del cultivo que se realiza en invernadero de algunas especies de sotol, donde se han registrado un periodo de 18 meses, aunque condicionado a las temporadas de siembra que requiere. Teniendo en cuenta que, de forma silvestre, de la germinación hasta la primera floración, transcurren de 12 a 15 años. Se puede inferir que la técnica de cultivo de tejidos *in vitro*, presenta una ventaja productiva, al reducir al menos la etapa juvenil de la planta, la cual puede tardar hasta 2 años, por lo que se se podría reducir el 40% del lapso normal.

Con este diseño metodológico, la capacidad de producción de plantas puede aumentarse en más del 500%, representando mayor efectividad y rentabilidad en comparación con técnicas convencionales de cultivo (INIFAP, 2007). Con la técnica de tejidos *in vitro* puede obtenerse un mayor número de plantas de sotol en un espacio reducido y debido a que las condiciones de cultivo son controladas, la obtención de plantas puede realizarse en cualquier temporada del año.

Lo anterior se traducirá en reducción de costos de germinación, aminorando el consumo de agua, materiales y mano de obra, y por ende en la disminución de tiempos y costos de producción. Además de subrayar el menor impacto ecológico a los ecosistemas a los que pertenece, ya que no se tendrían que tomar especies silvestres, amortiguando de esta manera su sobre aprovechamiento.

ESTADO DEL ARTE.

Existen estudios enfocados a la implementación de la micropropagación del sotol, en distintas especies. Al respecto, Reyes-Silva et al. (2013), en su trabajo con nolináceas mexicanas, mediante brotes axilares cultivados en un medio complementado con diversas citocininas, evidenciaron que para *Dasyllirion*, los tratamientos con 2iP y MT mostraron una efectividad homologa a la BA. La eficiencia observada fue desde 3.9 hasta 10.3 brotes por explante, las plantas obtenidas de esta combinación obtuvieron un porcentaje de

supervivencia *ex vitro* de 44 a 100. Con dichos resultados se demuestra que la micropropagación *in vitro* representa una alternativa eficiente que podría contribuir a la conservación de este recurso

A si mismo, Cruz (2017), estableció una germinación y micropropagación *in vitro* de *Dasyllirion cedrosanum* Trel., mediante tratamientos con medio Murashige y Skoog (MS) adicionado con diferentes concentraciones de dos reguladores de crecimiento BAP y P-Ca, resultando con mejor efectividad el tratamiento de 2.0 mg L⁻¹ de BAP y 1.0 mg L⁻¹ de P-Ca, alcanzando 3.5 brotes por explante.

Por otro lado Aguilar-Jiménez et al. (2022). Cultivaron explantes de *Dasyllirion acrotrichum*, en un medio Murashige y Skoog (MS), adicionando con diferentes concentraciones de bencilaminopurina y tiamina. Los mejores resultados se evidenciaron en el empleo de yemas laterales sembradas en el medio MS con 1 mg·L⁻¹ BAP.

METODOLOGÍA

Localización y rea de estudio

El estudio se llevo a cabo en la región semidesértica de la localidad de Potrero del Llano, en el municipio de Aldama, Chihuahua, que se encuentra en las coordenadas geográficas 28° 46' 29" latitud norte y 105° 28' 54" oeste; a una altitud de 1,057 msnm.

Material vegetal

Las semillas de sotol fueron proporcionadas por el productor Salvador Isidro Derma Piñon (Sotol Lazadores) del municipio de Aldama, Chihuahua, México, quien cuenta con los permisos de aprovechamiento.

Desinfección

Se evaluaron dos protocolos de desinfección para 50 semillas, implementando 25 semillas por cada uno, las cuales fueron sometidas a un periodo de imbibición, durante 24 horas en agua destilada estéril, después se aplicaron los protocolos en la campana de flujo laminar.

Protocolo 1

Las semillas se enjuagaron en agua destilada estéril y una solución de plata coloidal al 0.052% por 3 minutos. A continuación, se sumergieron en alcohol al 70% v/v por 5 minutos. Luego se colocaron en hipoclorito de sodio 6% más gotas de tween 20 por 3 minutos. Finalmente se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril.

Protocolo 2

Las semillas se lavaron en una solución de Tween 20 durante 3 minutos. Seguido de tres lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, un lavado con etanol al 70% durante 3 minutos, y uno con una solución de hipoclorito al 10% durante 15 minutos. Por último, tres enjuagues con agua destilada estéril.

Germinación de semillas

Una vez desinfectadas las semillas, fueron sembradas asépticamente en medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 3% de sacarosa, 0.7% de agar (w/v), con 5,7 de pH. Se sembraron 10 semillas por unidad experimental y se tuvieron 10 repeticiones. Los frascos se incubaron en condiciones controladas de luz (16/8 h luz/oscuridad) y temperatura (24 °C), para el desarrollo de la germinación.

Establecimiento del cultivo *in vitro*

Se utilizaron las plántulas germinadas *in vitro*, para tomar explantes, se realizaron incisiones a las hojas de las plántulas, y se utilizaron explantes con yemas de 1.0 cm de largo. Se prepararon diez diferentes tratamientos utilizando MS al 100% como medio basal, complementado con diferentes combinaciones y concentraciones de bencilaminopurina (BAP), ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB) más un testigo: T (Medio basal MS al 100%), T1 (BAP 1 mg L⁻¹ y IBA 0.2mg L⁻¹), T2 (BAP 1 mg L⁻¹ y IBA 3 mg L⁻¹), T3 (BAP 1 mg L⁻¹ y IBA 4 mg L⁻¹), T4 (BAP 3 mg L⁻¹ y IBA 0.2 mg L⁻¹), T5 (BAP 3 mg L⁻¹ y IBA 3 mg L⁻¹), T6 (BAP 3 mg L⁻¹ y IBA 4 mg L⁻¹), T7 (BAP 1 mg L⁻¹ y AIA 0.2 mg L⁻¹) y T8 (BAP 1 mg L⁻¹ y IBA 3 mg L⁻¹) (Avila-Treviño et al., 2017).

Analisis

Para la evaluación de los protocolos, se registro el porcentaje de desinfección y germinación, para el establecimiento *in vitro* se realizó un diseño completamente al azar, colocando 3 explantes por frasco, considerando cada uno como una repetición y se contaron con 5 repeticiones por tratamiento, fueron evaluados los brotes, y longitud de explante y la diferencia entre los tratamientos mediante una prueba de comparación de medias de tukey y un analisis kruskal-wallis, con el paquete estadístico Past 4.13.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Desinfección

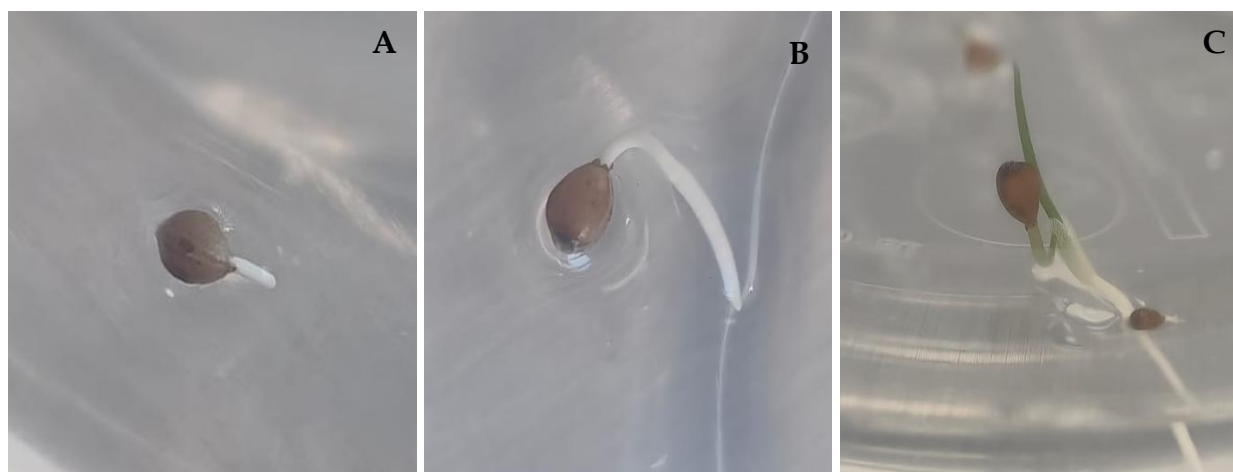
En la primera etapa de la investigación se probaron 2 diferentes protocolos para obtener el mejor porcentaje de desinfección de semillas de sotol. De acuerdo a los resultados, el protocolo número 2, el cual se compuso de enjuagues con tween 20 (3 minutos), etanol al 70% (3 minutos) e hipoclorito de sodio (15 minutos) seguidos de 3 enjuagues entre cada solución de agua destilada estéril. Se obtuvo un porcentaje de desinfección del 90%, con respecto al tratamiento número 1, que solo obtuvo el 10% de desinfección. La presencia de contaminantes fue de hongos y bacterias.

Germinación

El porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de sotol fue de 71%, con un 52% de presencia de raíces primarias. La germinación inició 5 días después del cultivo en el medio MS al 100% (Figura 1A), se observó el desarrollo de raíz primaria a los 10 días (Figura 1B) y la aparición de la vaina cotiledonar a los 15 días (figura 1C).

Figura 1.

Fases de germinación de semillas de sotol (Dasyllirion leiophyllum)



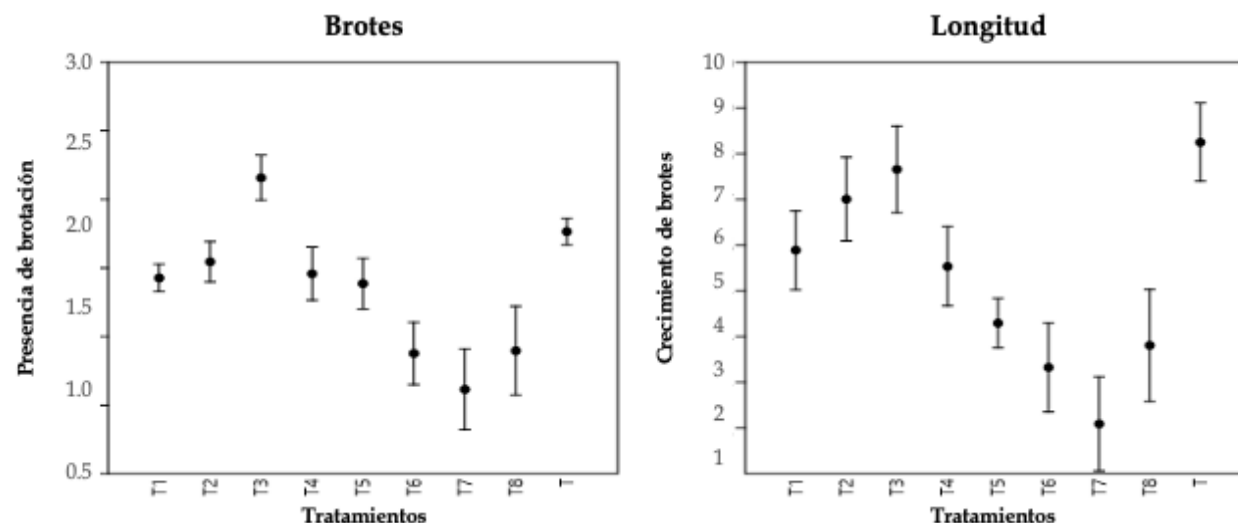
Nota: Etapas de la germinación *in vitro* de semillas de *Dasyllirion leiophyllum* (A) Inicio de germinación. (B) Raíz primaria. (C) Vaina cotiledonar.

Establecimiento *in vitro*

Después de 30 días de iniciados los tratamientos, fueron evaluados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, la cual, mostró diferencias significativas entre tratamientos respecto a las variables medidas: número de brotes ($p < 0.001$) y longitud ($p < 0.000$) (figura 2).

Figura 2.

Resultados de las distintas combinaciones de reguladores de crecimiento

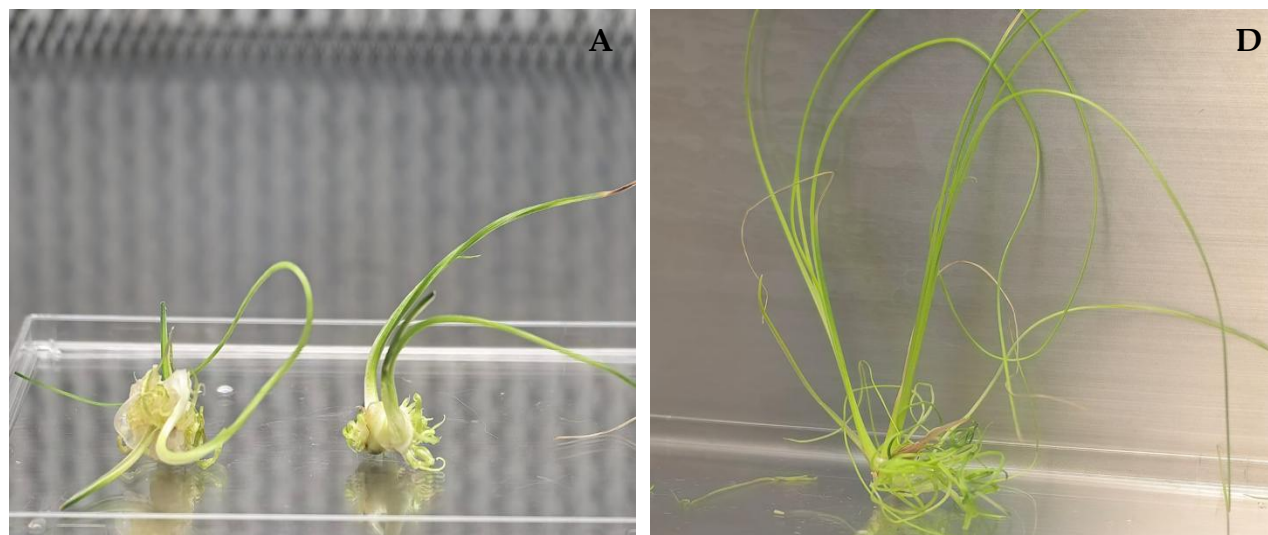


Nota. Los resultados representan el error típico de las medias (Tukey, 0.05) y comparación de Kruskal-Wallis. T (Medio basal MS al 100%), T1 (BAP 1 mg L⁻¹ y IBA 0.2mg L⁻¹), T2 (BAP 1 mg L⁻¹ y IBA 3 mg L⁻¹), T3 (BAP 1 mg L⁻¹ y IBA 4 mg L⁻¹), T4 (BAP 3 mg L⁻¹ y IBA 0.2 mg L⁻¹), T5 (BAP 3 mg L⁻¹ y IBA 3 mg L⁻¹), T6 (BAP 3 mg L⁻¹ y IBA 4 mg L⁻¹), T7 (BAP 1 mg L⁻¹ y AIA 0.2 mg L⁻¹) y T8 (BAP 1 mg L⁻¹ y IBA 3 mg L⁻¹).

El Tratamiento 3 (BAP 1 mg L⁻¹ y IBA 4 mg L⁻¹), mostró la mejor respuesta significativa en términos de la variable brotación, alcanzando una media de 3.7 y un máximo de 9 brotes por explante, además de una media de 7.6 cm y una longitud máxima de 20 cm (figura 3A). El tratamiento testigo (MS al 100%), obtuvo una media de brotación de 2.3 con una máxima de 4 brotes por explante y una media de longitud de 7.3 cm con una máxima de 14 cm (figura 3B). Por otro lado la combinación que mostró menor respuesta significativa fue el tratamiento 7 (BAP 1 mg L⁻¹ y AIA 0.2 mg L⁻¹), en los resultados presentó solo una media de 1.6 brotes por explantes y una media de longitud de 0.2 cm.

Figura 3.

Desarrollo de plántulas a partir del tratamiento 3 y testigo



Nota. Crecimiento de plántulas de explantes de sotol. Tratamiento 3: (A) Longitud y (B) Desarrollo irregular de brotes. Testigo: (C) Longitud de brotes y (D) Brotación regular.

Discusión

Los resultados obtenidos en los tratamientos T3 y Testigo mostraron la mejor respuesta a comparación de los demás tratamientos, se perciben efectos bastante similares en cuestión a la longitud alcanzada. Sin embargo, se ve una diferencia significativa en la brotación de explantes, no obstante, a pesar de que la brotación generada a partir de la combinación de reguladores de crecimiento del T3, haya sido más alta, esta fue irregular, con brotes pequeños y con formas desiguales, lo que sería un problema a futuro, ya que no se tendría la certeza de su crecimiento rápido.

El tratamiento testigo aunque presentó menor media de brotación, obtuvo un crecimiento regular de sus hojas y una mayor longitud de brotes, lo que lo hace candidato a utilizarlo en esta etapa, ya que presenta un crecimiento regular y rápido; esto puede traducirse, en una disminución de costos de producción, ya que no sería necesaria la utilización de reguladores de crecimiento, representando una ventaja económica importante. Aunque no se descarta la utilización de otro tipo de reguladores y concentraciones para mejorar la respuesta.

Los resultados obtenidos en esta investigación se comparan con los hallazgos reportados por Cruz (2017), donde obtuvieron a partir de explantes de sotol, una brotación media de 3.5 brotes utilizando BAP y

P-Ca, sin embargo, el autor, no obtuvo brotes en su tratamiento testigo y contó con un tiempo de cultivo de 56 días (casi el doble que nuestro estudio). Resultados similares fueron reportados por INIFAP (2007), en la utilización de Benciladenina y Acidoindolacetico (mg L^{-1}), obteniendo medias de 2.5 brotes, sin embargo ellos no utilizaron tratamiento testigo. Los resultados comparados en esta sección son referentes a otras especies de sotol, debido a que hace falta seguir estudiando las particularidades de micropropagación para la especie *Dasyllirion leiophyllum*.

Conclusiones

Se establecieron los protocolos de desinfección y germinación, además el establecimiento *in vitro* de explantes con yemas de *Dasyllirion leiophyllum* mediante los tratamientos con respuesta significativa como el testigo (medio MS sin regulación del crecimiento vegetal) y el T3 (BAP 1 mg L^{-1} y IBA 4 mg L^{-1}), representando una mejor opción el tratamiento testigo, ya que por un lado, existe baja diferencia entre ambos tratamientos, además de presentar una ventaja económica al no utilizar reguladores de crecimiento.

Bibliografía

- Aguilar-Jiménez, D; Piña-Guillén, J; González-Vicente, R. D; Herrera-López, H; Salgado-Bravo, R. 2022. Establecimiento *in vitro* y regeneración celular de *Dasyllirion acrotrichum* en la mixteca poblana. Revista MIX-TEC, 2:74-87.
- Alcaraz, Meléndez, L. 2021. Cómo el cultivo de tejidos vegetales ayuda a la conservación y desarrollo de plantas de interés económico. Recursos Naturales y Sociedad, (3): 147-155. <https://doi.org/10.18846/renaysoc.2021.07.07.03.0011>.
- Cruz, J. 2017. Germinación *in vitro* y micropropagación de sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel) (pp 31-33). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Gobierno del Estado de Chihuahua. (2019). Folleto Anexo No. 03. Acuerdo N° 056/2019. PLAN MUNICIPAL DE DESARROLLO 2018-2021.
- INIFAP. (2007). Guía para la micropropagación y producción *in vitro* de plantas de sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.). Folleto Técnico Num. 37.
- Melgoza, A. y Sierra, J.S. (2003). Contribución al conocimiento y distribución de las especies de *Dasyllirion* spp. (Sotol) en Chihuahua, México. Revista Ciencia Forestal en México 28, 26-38.

- Reyes-Valdés, M.H; Benavides-Mendoza, A; Ramírez-Rodríguez, H. y Villarreal-Quintanilla, J.Á. (2012).
Biología e importancia del sotol (*Dasyilirion* spp). Parte I: Sistemática, genética y reproducción.
- Reyes-Silva, A. I., Morales-Muñoz, C. F., Pérez-Reyes, M. E., Pérez-Molphe, B. E. (2013). Propagación in vitro
de nolináceas mexicanas. *Investigación y Ciencia*. 21(58): 12-20.