

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Germinación *In Vitro* y Micropropagación de Sotol
(*Dasyllirion cedrosanum* Trel.)

Por

JEREMÍAS CRUZ CRUZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Germinación *In Vitro* y Micropropagación de Sotol
(*Dasyliion cedrosanum* Trel.)

Por:

JEREMÍAS CRUZ CRUZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dra. Francisca Ramírez Godina
Asesor Principal



Dra. Hermila Trinidad García Osuna
Coasesor



M. P. Maria Alejandra Torres Tapia
Coasesor



Dr. Gabriel Sallegos Morales
Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios, sin duda alguna estoy totalmente agradecido porque sin él no hubiera sido posible culminar un sueño, una etapa más de mi vida profesional, por haberme cuidado en momentos tristes y por darme fuerza en momentos de desesperación, gracias también por darme salud, por guiar mi camino durante la estancia de la universidad y nunca abandonarme.

A mi Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (Alma Terra Mater), por el cobijo que me brindó durante estos cinco años, para poder realizar un sueño más en mi vida.

A la Dra. Hermíla Trinidad García Osuna, por permitirme trabajar con ella en la realización de este proyecto, bajo sus conocimientos, y por sus consejos en la parte laboral, por su paciencia que ha sido fundamental para culminar este trabajo de investigación.

A la Dra. Francisca Ramírez Godina, por la confianza y voluntad de apoyarme en la culminación de este trabajo de investigación.

A la M. P. María Alejandra Torres Tapia, por respaldar y brindarme su apoyo en la revisión y culminación de este proyecto.

Al Dr. Valentín Robledo Torres, por ser parte del comité de asesoría y por la culminación de este trabajo.

A la M.C Leticia Escobedo Bocardo, por el espacio brindado para la elaboración de este proyecto.

A la maestra Ana Ochoa, por la capacitación que me brindó en el laboratorio y para uso y manejo del mismo.

Al M.C. Javier S. Torres Arreguín, por sus sabios consejos, motivación y regaños que me han servido bastante, por brindarme su amistad, su confianza y por ser su gran amigo hasta hoy en día.

A todos los maestros que me impartieron clases agradecerles por lo que me enseñaron de sus conocimientos tanto de la profesión como de la vida, impulsándome siempre a seguir adelante.

A mis queridos padres, quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica, su esfuerzo y lucha interminable han hecho de ellos un gran ejemplo a seguir por mí.

A mi madre Antonia Cruz Cruz, que es el ser más maravilloso de todo el mundo. Gracias por el apoyo moral, cariño, amor y comprensión que desde niño me ha brindado, por guiar mi camino y estar junto a mí en los momentos más difíciles.

A mi padre Rafael Cruz Juárez, que desde pequeño ha sido para mí un gran ejemplo y hombre maravilloso al que siempre he admirado.

Gracias por guiar mi vida con amor y cariño, esto ha hecho que sea una persona noble y así lograr lo que más anhelaba en mi vida.

Estoy muy orgulloso y agradecido por haberme dejado la mejor

herencia, que es mi carrera. Se perfectamente que has sido un hombre luchador y que nunca se rindió ante ninguna circunstancia, gracias por todo.

Agradezco infinitamente a todos mis queridos hermanos (José, Francisco, Cristóbal, Patricia, Catalina, Genaro, Roselía, Cornelio e Ilda) por el cariño y apoyo moral que he recibido de cada uno de ustedes, fueron sin duda alguna las palabras que me motivaron y alentaron a culminar esta etapa de mi carrera profesional. En especial quiero agradecer a mi hermano Genaro Cruz, por su apoyo económico, es una persona con un corazón tan grande que no puedo expresarlo en estas pequeñas letras, en todo momento estuvo pendiente de nuestros gastos económicos, gracias hermano! Y tenlo por seguro que jamás te olvidare y te abandonare. A tí Ing. Cornelio, hermano y amigo de toda la vida, en todos los niveles de estudio, gracias por acompañarme y por ser mi gran hermano.

A mis multitudes de sobrinas y sobrinos, quiero agradecerles por el cariño y aprecio que me brindaron cuando me iba de vacaciones, no hubo ninguna vacación triste, todo era felicidad, pero sobre todo con ustedes Yoselín F., Julie M., y Kevin de la T. finalmente.

A mis cuñadas y cuñados, gracias por los consejos, gracias Antonia Sánchez, por lavarme la ropa, por darme de comer en todo momento, gracias Gilberto, por tu apoyo económico quizás no fueron miles y miles pero los que hayan sido me fue útil.

A mi tío Dany por su apoyo moral, motivación y grandes y sabios consejos, gracias.

A mis amigos de la generación CXIX, María del Rosario, Jorge Úrsula, Amalia Alvarado, Javier Camacho, Araceli Sánchez, Eri Pérez, Laura Heredia, Martha Lucía, Román Ponce, Mateo Pérez, Aldo García, Yanín Zarate, Teresa, Flor, gracias por compartir momentos con todos ustedes y de corazón les deseo un éxito en su labor y en todo lo que hagan tenga un futuro mejor.

Agradezco en especial a mi gran y mejor amigo Jorge Úrsula “alias el cheches” por brindarme su amistad, por pasar momentos inolvidables, haciendo mención una de muchas como aquella vez cuando tan solo faltaba un día de nuestra graduación y ya estábamos enfiestados, pero también no solamente agradezco por esos momentos, sino también por las veces que estudiábamos juntos para poder aprobar alguna materia que se nos complicaba, gracias

de verdad y te deseo mucho éxito en tu vida, siempre serás mi mejor amigo. También agradezco a mi mejor amiga, María del Rosario “alias chayito o rouss”, por sus consejos y amistad que me brindo en todo momento, por ofrecerme su compañía en momentos de desesperación, gracias Rouss y te deseo de todo corazón un éxito laboral y Dios te llene de muchas bendiciones. A mi gran amigo Javier Camacho “alias Javi” por ser un compañero y amigo de casi toda la generación, te deseo lo mejor para ti mi estimado.

Es sin duda alguna que durante el camino encontramos cosas buenas y cosas malas, más sin embargo en mi vida gracias a Dios han sido más cosas buenas que malas, por eso estoy totalmente agradecido por haber encontrado durante mi caminar a una persona tan única y especial en mi vida, con la que he compartido momentos únicos, la que me ha dado mucha felicidad, amor y seguridad, no me queda duda que a tu lado quiero vivir el resto de mi vida, porque los primeros dieciséis meses de tu compañía me has demostrado y transmitido muchas cosas buenas, y me ha dejado muy convencido de seguir adelante a tu lado, gracias por todo Haide Rivera Cortes, te amo.

D E D I C A T O R I A

A mis padres

La sra. Antonia Cruz Cruz y el Sr. Rafael Cruz Juárez.

Por estar al pendiente de mi en cada momento de mi vida y educándome de la mejor manera posible. Por forjar mi formación a base de enseñanzas y actitudes positivas y por darme el privilegio de dedicarles este logro que empezamos juntos y que hoy veamos realizado.

El camino no ha sido fácil, hemos sacrificado muchas cosas, muchos momentos, pero todo valió y valdrá siempre la pena de haber salido de casa.

A mis hermanos

José, Francisco, Cristóbal, Patricia, Catalina, Genaro, Roselia, Cornelio e Ulda.

Por ser la motivación a seguir adelante, en todas las etapas difíciles de mi vida. Especialmente a ti hermano Genaro te dedico este trabajo, porque juntos empezamos a construir este proyecto y más sin embargo hoy se ha culminado, gracias por tu apoyo moral y económico, siempre contarás conmigo.

A mi familia en general por todo el cariño y afecto que les tengo y por compartir tantos momentos bonitos.

Gracias

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág
AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA.....	VIII
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE CUADROS.....	XI
SIGNIFICADO DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I INTRODUCCIÓN	3
II OBJETIVOS	5
2.1 General.....	5
2.2 Específicos.....	5
2.3 Hipótesis.....	6
III REVISIÓN DE LITERATURA	7
3.1 <i>Dasyliirion cedrosanum</i> Trel.....	7
3.2 Descripción botánica.....	7
3.3 Descripción morfológica.....	8
3.4 Distribución geográfica.....	9
3.5 Requerimientos climáticos y edáficos.....	10
3.6 Usos e importancia de <i>D. cedrosanum</i>	11
3.7 Característica de la semilla de <i>Dasyliirion</i> spp.....	13
3.8 Germinación.....	14
3.9 Índice de velocidad de germinación.....	16
3.10 Micropropagación.....	17
3.11 Composición del medio.....	19
3.12 Reguladores de crecimiento vegetal.....	19
3.13 Prohexadiona de calcio.....	20
IV MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1 Ubicación del sitio experimental.....	22
4.2 Material vegetal.....	22
4.3 Etapa 1. Germinación de semilla de sotol en condiciones <i>in vitro</i> ..	22
4.4 Etapa 2. Micropropagación de brotes.....	24
4.5 Diseño experimental.....	26
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5.1 Índice de Velocidad de Germinación.....	27
5.2 Porcentaje de germinación.....	27
5.3 Micropropagación de brotes.....	29
VI CONCLUSIONES	35
VII BIBLIOGRAFÍA	36
VIII ANEXO	44

Índice de figuras

Figura		Página
1.	Apariencia típica de sotol.....	9
2.	Distribución geográfica de <i>Dasyllirion cedrosanum</i>	10
3.	Fisonomía estructural del hábitat natural de <i>Dasyllirion cedrosanum</i>	11
4.	Usos. A) Flor artificial hecha con hojas de Sotol, y B) bebida alcohólica llamada “Sotol” destilada a partir de <i>D. cedrosanum</i>	13
5.	Semillas de <i>Dasyllirion cedrosanum</i> Trel.....	14
6.	Ejemplares de <i>Dasyllirion cedrosanum</i>	22
7.	Procedimiento de asepsia.....	23
8.	Formación de brotes de <i>Dasyllirion cedrosanum</i>	25
9.	Índice de Velocidad de Germinación de semillas de Sotol después de la siembra a una imbibición de 24 y 48 horas en agua desionizada estéril.....	27
10.	Porcentaje de germinación de <i>D. cedrosanum</i> Trel. A una imbibición de 24 horas y 48 horas en agua desionizada estéril.....	28
11.	Número de brotes de sotol a las 8 semanas en medio MS en presencia de BAP y P-Ca.....	31
12.	Número de brotes de sotol a las 8 semanas en medio PCL2 en presencia de BAP y P-Ca.....	32
13.	Respuesta morfológica en la formación de brotes (A) y raíces (B) de sotol.....	32

Índice de cuadros

Cuadro		Página
1.	Clasificación taxonómica de <i>Dasyilirion cedrosanum</i>	8
2.	Tratamientos establecidos en la micropropagación de brotes de sotol.....	25
3.	Análisis de Varianza para número de brotes generados de sotol desarrollándose en medio nutritivo MS con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca.....	29
4.	Análisis de Varianza para número de brotes generados de sotol desarrollándose en medio nutritivo PCL2 con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca	30

Significado de abreviaturas

Abreviatura	Significado
AIB	Ácido indolbutírico
BA	Benciladenina
BAP	6- Bencil Amino Purina
IVE	Índice de velocidad de emergencia
IVG	Índice de velocidad de germinación
KNO ₃	Nitrato de potasio
LMH	Longitud media de hipocotilo
MBM	Medio base de multiplicación
LMR	Longitud media de radícula
MS	Murashige and Skoog
NOM	Norma Oficial Mexicana
P-Ca	Prohexadiona de calcio
PCL2	Phillips & Collins
PH	Potencial de Hidrógeno
PPM	Partes por millón
Spp	Subespecie
ZEA	Zeatina

RESUMEN

El sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.) es una planta de la familia Asparagaceae y es nativa del desierto Chihuahuense, forma parte del matorral desértico rosetófilo. Es una planta de importancia económica. Con ella se produce una bebida alcohólica del mismo nombre. En la actualidad su demanda se ha incrementado y ha disminuido las poblaciones naturales, por lo cual se requiere una alternativa para la protección de las poblaciones silvestres. En este trabajo se propone la micropropagación de sotol para disminuir el impacto en las áreas naturales. Existe un protocolo de micropropagación vía organogénesis directa, sin embargo su eficiencia es todavía baja, además no se cuenta con antecedentes de la utilización de Prohexadiona de Calcio (P-Ca) para la multiplicación masiva. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue obtener plántulas *in vitro* de sotol, el experimento se realizó en dos etapas, en la primera se analizó el índice de velocidad de germinación y el porcentaje de germinación de la semilla al aplicar dos tratamientos de imbibición a las 24 y 48 h. En la segunda etapa se evaluaron dos medios MS y PCL2 y la concentración de reguladores de crecimiento de BAP y P-Ca (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 y 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg L⁻¹). El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con 16 tratamientos y cinco repeticiones y los resultados se sometieron a análisis de varianza y una comparación de medias Tukey (P≤0.01). Cada tratamiento consistió de cuatro explantes con cinco repeticiones. El mejor tratamiento fue la combinación de 2.0 mg L⁻¹ de BAP y 1.0 mg L⁻¹ de P-Ca con 3.5 brotes por explante (T15). Se puede observar que la aplicación de P-Ca incrementa el número de brotes.

Palabras clave: *Dasyilirion cedrosanum*, micropropagación, prohexadiona de calcio, sotol.

ABSTRACT

The sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.) is a plant of the family Asparagaceae and is native of the chihuahuense desert, form part of the rosetophile desert scrub. It is a plant of economic importance. It produces an alcoholic beverage of the same name. In the present their demand has increased and natural populations have declined, which requieres an alternative for the protection of wild populations. In this work we propose the micropropagation of sotol to reduce the impact in the natural areas. There is a protocol of micropropagation via direct organogenesis, however its efficiency is still low, in addition there is no history of the use of Prohexadione of Calcium (P-Ca) for massive multiplication. Therefore the objeive of the present work was to obtain seedlings *in vitro* of sotol, which was perfomed in two stages. The experiment was carried out in two stages. The first one analyzed the rate of germination and the porcentaje of germination of the seed when two treatments of imbibition were aplyed at 24 and 48 h. In the second stage two media MS and PCL2 and the concentration of BAP and P-Ca Growth regulators (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 y 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg L⁻¹) were evaluated. The experimental design used was completely randomized with 16 treatments. Each treatment consisted of four explants with five replicates. The results were subjected to analysis of variance and a Tukey mean comparison (P≤0.01). The best treatment was the combination of 2.0 mg L⁻¹ of BAP y 1.0 mg L⁻¹ of P-Ca wich 3.5 shoots for explant (T15). We can observe that the application of P-Ca increases the number of shoots.

Keywords: *Dasyilirion cedrosanum*; micropropagation; Prohexadione de calcium; sotol

I. INTRODUCCIÓN

El sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.) es una planta nativa del Desierto Chihuahuense, la cual se desarrolla en diversos tipos de terreno, es una planta muy rústica y componente del matorral desértico rosetófilo, aunque ocasionalmente forma parte del matorral desértico micrófilo (Cano *et al.*, 2005).

La especie *D. cedrosanum* Trel., conocido como Sotol o Sereque y en algunas regiones de Zacatecas, México, como cuchara del Desierto, es un recurso invaluable y con una amplia distribución, particularmente en Coahuila, México, donde aún se encuentra presente de manera abundante (UAC, 2006).

El género *Dasyilirion* se encuentra dentro de las plantas dioicas y está constituido por plantas de hojas fibrosas que parten de un tallo central formando una especie de corona, de la cual emerge un escapo compuesto de flores unisexuales. Este género se encuentra distribuido en zonas áridas y altas del suroeste de Estados Unidos y Norte de México (Bogler, 1994).

En los últimos años, a causa del aumento en la demanda de las bebidas alcohólicas tradicionales producidas a partir de agaves como el tequila y el mezcal, ha surgido el interés de producir sotol a escala industrial, de tal manera, que generó un aumento en el número de solicitudes para aprovechamiento de la especie. De acuerdo a esto, Coahuila es uno de los productores de sotol y posee un alto potencial en cuanto a la elaboración e industrialización de la misma como bebida destilada (Contreras y Ortega, 2005).

Hasta el momento no existe la explotación controlada de este recurso silvestre tan importante, por lo tanto, es importante generar información que nos proporcione las bases para promover e iniciar plantaciones dirigidas al uso industrial, con la finalidad de llevar a cabo el aprovechamiento de manera sustentable de *D. cedrosanum*, así como de otras especies usadas para la elaboración del “sotol”.

Por lo anterior, la micropropagación ofrece nuevas alternativas para el mejoramiento de la producción agrícola. Esta técnica consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de tejidos o células cultivadas bajo condiciones *in vitro*, es una herramienta muy útil, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada.

Con el uso de esta tecnología será posible producir material vegetativo para la región sotolera del norte del país, donde hay empresas dedicadas a la industrialización de esta bebida o bien productores del semidesierto, y gracias a esta tecnología obtendrán beneficios de establecimiento de plantas producidas *in vitro* con calidad fitosanitaria.

II. OBJETIVOS

2.1. General

- Obtener plántulas *in vitro* de sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.).

2.2. Específicos

- Evaluar el Índice de Velocidad de Germinación de Sotol (*D. cedrosanum* Trel.) para conocer su capacidad germinativa *in vitro*.
- Micropropagar *D. cedrosanum* Trel., optimizando la concentración y combinación de los reguladores de crecimiento.

2.3. HIPÓTESIS

Alguna de las concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento adicionadas al medio nutritivo de Murashige y Skoog (1962) y PCL2 promoverán la multiplicación masiva de plántulas de sotol.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. *Dasyllirion cedrosanum* Trel.

En México, las zonas áridas y semiáridas ocupan más del 60% del área total, donde las condiciones climáticas y ecológicas naturales permiten únicamente el desarrollo de ciertas especies vegetales como el *Dasyllirion cedrosanum* Trel. Esta comunidad es poco conocida y es sometida a una explotación intensa en sus comunidades nativas para distintos fines, razón por la cual hay un gran desconocimiento en torno a los efectos del uso de esta especie por el ser humano sobre la estructura de las comunidades silvestres o nativas (Encina-Domínguez *et al.*, 2013).

3.2. Descripción botánica

El género *Dasyllirion* es nativo del Desierto Chihuahuense (Sierra *et al.*, 2008), su nombre común es conocido en México como “sotol”, y en Estados Unidos de América como “desert spoon” (cuchara del desierto) (Gardea *et al.*, 2012). El género fue inicialmente ubicado en la familia Liliaceae, posteriormente se le separó en Agavaceae y se le ha localizado en Nolinaceae. Recientemente se le ubica en la familia Asparagaceae y la subfamilia Nolinoideae (USDA, ARS, National Genetic Resources Program, GRIN, 2013). Al parecer se relaciona fuertemente con los géneros *Nolina*, *Beaucarnea* y *Calibanus* con los cuales comparte morfología, hábitat y características del fruto (Reyes-Valdés *et al.*, 2012). En un análisis filogenético se muestra a las especies de *Dasyllirion* formando dos grupos, en uno de ellos se encuentran las especies del sur, centro y noreste de México en una relación estrecha, diferentes del otro grupo donde están las especies del sur de Texas, del norte de Coahuila y de

Sonora (Bogler, 1994). En el Cuadro 1 se muestra la clasificación taxonómica del sotol (USDA, ARS, National Genetic Resources Program, GRIN, 2013).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Dasyilirion cedrosanum* Trel.

Reino	Plantae
Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Superorden	Lilianaes
Orden	Asparagales
Familia	Asparagaceae
Subfamilia	Nolinoideae
Genero	<i>Dasyilirion</i>
Especie	<i>cedrosanum</i> Trelease

3.3. Descripción morfológica

Dasyilirion es una planta monocotiledónea, dioica; las flores hembra y macho nacen en plantas separadas. Es perenne, semisuculenta, semicilíndrica, espinosa, policárpica (UAC, 2006), de tallo corto o casi sin tallo, de 1-1.5 m, simple o con 2 ó 3 brazos (Martínez, 1979), parcialmente subterráneo. Las hojas son lineares, grisáceas pálidas a verde pálido, comúnmente forman una roseta desde la base, con espinas en los bordes y una base ancha y una púa terminal. Ambos sexos cuentan con un escapo (figura 1), la cual emite una inflorescencia con flores pequeñas en panículas que tiene una estructura conocida como inflorescencia, esto llega a medir hasta 5 metros de altura (Benavides *et al.*, 2010).



Figura 1. Apariencia típica de sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.)

3.4. Distribución geográfica

El área de distribución de las poblaciones naturales de sotol (*Dasyilirion spp.*) se reportan en las zonas áridas y semiáridas desde el sur de los Estados Unidos de América hasta Oaxaca, México (figura 2) (Cano *et al.*, 2011). La mayoría de las especies son endémicas de México (Reyes-Valdés *et al.*, 2012). Es importante hacer hincapié que el número de especies varía de acuerdo a los reportes de diferentes autores, Bogler (1994) menciona que en México existen 14 especies de este género las cuales son: *Dasyilirion ecotrichum*; *D. glaucophyllum* (estado de México.); *D. graminifolium*; *D. inermis* (San Luis Potosi); *D. leiophyllum* (Chihuahua y oeste de Coahuila); *D. longissimum*, (México); *D. miquihuanense* (Tamaulipas); *D. parrianum* (San Luis Potosí); *D. serratifolium* (sureste de México); *D. simplex* (Durango, México); *D. texanum* (norte de Coahuila); *D. texanum var. Avernas* (México); *D. wheeleri*

(Sonora, Chihuahua y Durango); *D. cedrosanum* (centro y sur de Coahuila); *D. heteroteca* (norte de Coahuila). Cano *et al.*, (2005) mencionan que existe alrededor de 14 a 18 especies. Mientras que Reyes-Valdés *et al.*, (2012) mencionan que comprende alrededor de 16 especies.



Figura 2. Distribución geográfica de *Dasyliiron cedrosanum* Trel.

3.5. Requerimientos climáticos y edáficos

Los factores climáticos del Altiplano Mexicano, lugar donde se localizan principalmente las plantas de sotol, se caracterizan por tener un clima seco, esto a su vez se caracterizan por una fuerte variación en su temperatura, con oscilaciones mayores a 14° C entre el mes cálido (Junio) y el mes más frío (Enero) es decir, que el sotol puede prevalecer en un rango de temperaturas medias, que va desde los 17 hasta los 21 °C y con un rango de precipitación media anual de 150 a 400 mm (Zárate, 2003). El hábitat de esta planta es el matorral xerófilo de zonas secas (figura 3), particularmente en los matorrales desértico rosetófilo y crasirrosulifolio espinoso (Arce *et al.*, 2003a).

Los factores edáficos que forman su distribución corresponden a suelos Xerosoles, Rendzinas y Regosoles, con una gran riqueza de carbonato de calcio, delgados, con poco desarrollo de horizontes de suelo, con buen drenaje y aireación, en posiciones fisiográficas de ladera, pie de monte y sobre abanicos aluviales, en donde los principales agentes formadores que intervienen son el arrastre por el agua (suelos aluviales) y el campo gravitacional (suelos coluviales) (Cano, 2011).



Figura 3. Fisonomía estructural del hábitat natural de *Dasyliirion cedrosanum* Trel.

3.6. Usos e importancias de *D. cedrosanum* Trel.

El sotol formó una parte importante de los recursos para el sostenimiento de la vida humana en la prehistoria y la historia de Aridoamérica, esta planta era un componente de la dieta de los pobladores nómadas, y se sabe que consumían su tallo o “piña” después de cocinarlo sobre rocas calientes dentro de un pozo (Poinar *et al.*, 2001). En la actualidad, hay comunidades que continúan utilizando esa planta como alimento, por ejemplo: las flores son guisadas y luego combinadas con otros alimentos (López-Barbosa y Portes-Vargas, 2002). Otros usos dados por los pobladores que la utilizan,

es la cestería que se desarrolla a partir de las hojas de esta planta. Su inflorescencia es usada en la construcción, como cerco, para la delimitación de propiedades o techos para sombra y en épocas de estiaje sirve como forraje para el ganado (Cano y Martínez-Burciaga, 2007). Melgoza y Sierra (2005), también mencionan que plantas de sotol actualmente tienen uso muy importante como el caso de la elaboración artesanal de una bebida alcohólica llamada sotol (figura 4). También es importante mencionar que el sotol fue utilizado desde la época prehispánica por los pobladores de Paquimé, al norte del estado de Chihuahua, lugar donde se encontraron grandes hornos para la producción de esta bebida. Así mismo hoy en día la planta del sotol presenta una problemática enorme respecto a la deforestación, aunque es una planta relativamente abundante en el Desierto Chihuahuense, la sobreexplotación es un grave problema, especialmente cuando se trata de las empresas más industrializadas que diariamente están en la elaboración de la bebida del sotol. Con respecto a la elaboración de licor, éste se remonta a la época colonial, con la introducción del proceso de destilación durante los siglos XVI al XVIII por los españoles en la región de la Nueva Vizcaya (López-Barbosa, 2005). De esta forma, se fueron creando factorías artesanales para fermentar el tallo del sotol y producir la bebida alcohólica, que hoy en día se llama también “sotol”. En forma permanente el sotol es comparado en clara competencia con otros licores como el tequila, mezcal y bacanora. El sotol como licor ha cumplido con la norma de regulación mexicana y ha recibido la misma con la identificación NOM-159-SCFI-2004, con la denominación de origen para los estados de Coahuila, Chihuahua y Durango (Secretaría de Economía, 2004).



Figura 4. Usos. A) Flor artificial hecha con hojas de Sotol, y B) bebida alcohólica llamada “Sotol” destilada a partir de *D. cedrosanum* Trel.

3.7. Característica de la semilla de *Dasyliirion* spp.

La semilla del sotol es de tipo esferoide con tres caras o lóbulos, más agudas en la parte inferior que en la superior (figura 5). Las semillas de todas las especies son de color café claro a café oscuro, con superficie más o menos rugosa; presentan un ancho de 2 a 3 mm y son ligeramente más largas que anchas. El embrión es cilíndrico y recto, se localiza en el eje central de la semilla y está rodeado por una delgada capa de endospermo. La cubierta o testa de la semilla es delgada y aparentemente resistente a las condiciones de sequía, lo que posiblemente le permite permanecer viable por años, aunque esto no se ha verificado. La semilla está cubierta por una delgada capa transparente de tres alas o brácteas que ayudan a su dispersión, por lo que también se le llama diáspora y las cuales retrasan la germinación por algunos meses (Vega *et al.*, 2006; Sierra *et al.*, 2008). La floración y producción de semilla presenta una gran variación entre años y regiones, procesos relacionados con la precipitación; no obstante, la madurez de la semilla se presenta en el verano y otoño dependiendo de

la especie y el sitio (Hernández-Juárez, 2008). En el caso de *D. leiophyllum* se ha observado un rango en la producción de semilla entre 0.25 a 2.70 kg por inflorescencia; producción muy relacionada a la longitud de la inflorescencia o quiole (Sierra *et al.*, 2008). Para el caso de *D. cedrosanum* se conoce muy poco sobre las características de la semilla, pero Hernández-Juárez (2008) menciona que son trígonas, de color café oro, y con una superficie más o menos plana y rugosa.



Figura 5. Semilla de *Dasyliirion cedrosanum* Trel.

3.8. Germinación

La germinación se lleva a cabo cuando la semilla termina de formarse, a veces el embrión entra en letargo y no germina, sino hasta que pasa un cierto tiempo, así puede permanecer muchos años. Posteriormente, aunque esté listo para proseguir su desarrollo si el medio no es apropiado no lo hace, pero tampoco muere, sino que sigue viviendo con sus procesos fisiológicos. El proceso de germinación se ha estudiado mucho, si bien no completo, pero se ha avanzado. Desde hace mucho tiempo se conocen las exigencias de las distintas especies con respecto a los factores del medio, como son agua, oxígeno, luz, temperatura, más sin embargo modernamente se han conocido a grandes rasgos los factores internos, que en síntesis se menciona; al hidratarse, las células del embrión sintetizan giberelina, que es secretada pasando por

las células del endospermo. Allí actúa induciendo la síntesis de amilasas, por lo que las reservas de la semilla son hidrolizadas y el embrión obtiene glucosa, fuente de la energía para el desarrollo. A continuación el embrión forma citocininas que estimulan la división de las células de los meristemos apicales y luego, a partir de las reservas de aleurona, se forman aminoácidos y ácido indolacético, bajo cuya inducción las células se alargan mientras el tallo y la raíz crecen y presentan polaridad (Rojas, 1979).

Existen diferentes métodos para lograr la germinación de las semillas, entre ellos: procedimientos químicos con ácidos o bases, tratamientos mecánicos como frotar las semillas con papel de lija, inmersiones en agua, inmersiones en agua caliente, tratamientos con temperaturas, almacenamiento y otros.

Obtener buenos resultados mediante el empleo de cualquiera de los métodos para obtener la germinación, depende de algunas alteraciones en la integridad física de la cubierta de las mismas, o bien, de la eliminación de barreras que provoquen la producción de inhibidores de la germinación y eviten la hidratación y crecimiento del embrión, ya sea en forma física (con el uso de temperaturas o escarificación) o en forma química (con promotores de la germinación) (Faría *et al.*, 1996).

Hoy se sabe que el uso de hormonas y otros compuestos, como el ácido giberélico, ácido Abscísico, citocininas, etileno, nitrato de potasio, hipoclorito de sodio y cloroformo, pueden promover la germinación (Miransari y Smith, 2014).

Cruz (2011), realizó un trabajo sobre evaluación del efecto de los biorreguladores aplicados en semillas de *D. cedrosanum* Trel., a través de pruebas de germinación y

vigor en condiciones de laboratorio, se aplicaron catorce tratamientos a base de bioreguladores, micorriza (0.0125, 0.025 y 0.0375 g/mL), *Bacillus subtilis* (100, 75, 50 y 25%), ácido fúlvico (1500, 2500, 3500, 4500 y 5500 ppm), KNO₃ (1 y 2%) y un testigo con agua. Se determinó la capacidad fisiológica del material genético mediante pruebas de Viabilidad, Capacidad de Germinación, Índice de Velocidad de Emergencia (IVE), Longitud Media de Hipocótilo (LMH) y Radícula (LMR); se aplicó 5 mL cada uno de los biorreguladores por caja Petri sobre papel filtro. Respecto a la viabilidad encontró un 85%. En la variable capacidad de Germinación se encontraron plántulas normales por arriba del 72 %; mientras que el testigo se encontró con un 54.67 %. Con respecto a la variable plántulas anormales presentaron por arriba del 42.6 % de anomalías. En lo que respecta al Vigor de la especie con tratamientos se encontró que en el IVE, T11 sobresalió con 20.9 de plántulas por día siendo el mejor de todos los tratamientos.

3.9. Índice de Velocidad de Germinación (IVG)

El Índice de Velocidad de Germinación propuesto por Maguire (1962), es uno de los parámetros más utilizados (Villagra, 1997; Nakagawa, 1999) y se hace referencia a los conteos diarios del número de semillas germinadas.

Juárez (2014) en su trabajo de eliminación de latencia en semillas de cortadillo (*Nolina cespitifera* Trel.), bajo condiciones de laboratorio e invernadero, utilizando tratamientos físicos, químicos y mecánicos, realizó seis tratamientos para eliminar este fenómeno para lo cual fueron los siguientes; T1 testigo; T2 escarificación con lija; T3 remojo en agua potable a 48 horas; T4 remojo en agua potable a temperatura de 60°C por 5 minutos; T5 inmersión en nitrato de potasio (KN₃) al 0.2% por 10 minutos; T6 inmersión

en ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 100 ppm. En los datos estadísticos encontró que hubo diferencias en el índice de velocidad de germinación y emergencia, y se observó que el T2 logro 68% de IVG en condiciones de laboratorio y 52% IVE en invernadero y para el T3 logro 72% de IVG en condiciones de laboratorio y 54% de IVE en invernadero.

En la agricultura, la calidad de semilla es un componente básico para obtener una mayor eficiencia productiva. Las pruebas de germinación se hacen normalmente bajo condiciones favorables de temperatura y humedad, es importante hacer hincapié que la mayoría de las veces los resultados de estas pruebas no corresponden a los resultados obtenidos en campo.

3.10. Micropropagación

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.

La importancia de la micropropagación radica principalmente en que permite la obtención de plantas de excelente calidad fitosanitaria ya que al someter el tejido vegetal a este sistema de cultivo se logran eliminar completamente bacterias, hongos y en algunas ocasiones hasta virus; las plantas multiplicadas por esta técnica son réplicas exactas entre sí y copias genéticamente iguales que la planta progenitora; el potencial de multiplicación es muy amplio, el número de individuos obtenidos por este método es muy superior al obtenido por cualquier otro método de propagación, es

posible acortar los tiempos de producción de plantas, de igual manera es posible tener en espacios relativamente pequeños un gran número de plántulas, además de que facilita el manejo, almacenaje y transporte de plantas, reduciendo costos por estos conceptos y se logra establecer uniformidad genética de toda una población (Becerril, 2008).

Actualmente en plantas que pertenecen a la familia Nolinaceae, se está comenzando a utilizar la técnica de cultivo de tejidos vegetales, al igual que en otras especies de la familia Agavaceae (Martínez *et al.*, 2003; Reyes *et al.*, 2013; Flores-García *et al.*, 2009). 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 y 4) inducción de brotes a partir de ápices o yemas axilares, para su posterior enraizamiento.

Samyn (1997) reporta la propagación *in vitro* de *Beaucarnea recurvata* en un medio con benciladenina (BA) y ácido giberélico, obteniendo un poco más de tres nuevas plantas por explante. Por otra parte, Flores-García *et al.*, (2009) reportan la propagación de la especie *Nolina parviflora* a través de organogénesis, a partir de explantes tomados de plántulas obtenidas *in vitro*, en medios de cultivo con combinaciones de citocininas con auxinas, de las cuales obtuvieron 4.2 brotes por explante. Villavicencio *et al.*, (2007) reportaron un trabajo sobre la inducción de brotes mediante organogénesis directa, es decir a partir de tejido somático sin pasar por la etapa de callo, a partir de epicótilos considerados como explantes, los cuales se

establecieron en un medio de cultivo base de multiplicación (MBM), adicionado con 1.10 μM de BA + 10.36×10^{-1} μM de AIB, ambas fitohormonas son las que promovieron la inducción de brotes de sotol, registrando una tasa de multiplicación de 7 brotes/explante.

3.11. Composición del medio nutritivo

Existen diferentes medios de cultivo, por lo que su selección depende del objeto que se persiga, ya sea establecimiento *in vitro* o multiplicación. El medio base que se utilizó para la producción de plántulas *in vitro* de sotol es el de Murashige y Skoog (1962) y PCL2 (Phillips y Collins 1978) el cual se complementó con diferentes concentraciones de fitohormonas, vitaminas y minerales (Anexo).

3.12. Reguladores de crecimiento vegetal

Los biorreguladores en general actúan modificando el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de su acción sobre vías y procesos fisiológicos y bioquímicos específicos (Jankiewicz, 2003).

Los fitorreguladores o reguladores del crecimiento vegetal son todos los compuestos orgánicos (no considerados nutrientes) que en pequeñas cantidades son capaces de fomentar, inhibir o modificar cualquier proceso fisiológico de la planta. El término fitorregulador puede incluir un rango amplio de compuestos, puede aplicarse para los compuestos naturales producidos dentro de la planta, como para los compuestos sintetizados artificialmente.

Actualmente se reconocen varios tipos básicos de sistemas químicos de reguladores del crecimiento vegetal, como son: Auxinas, Citocininas, Giberelinas, Acido Abscísico, Etileno y Prohexadiona de Calcio.

Las auxinas y las giberelinas estimulan principalmente la elongación celular, las citocininas estimulan la división celular. Mientras que cada uno es diferente a los demás en sus características químicas y en su capacidad de inducir respuestas de crecimiento, cada uno de los fitorreguladores (incluyendo el ácido abscísico y el etileno) son capaces de influir en muchos aspectos del crecimiento (por división o alargamiento celular), de la diferenciación y en muy diversos fenómenos del desarrollo de las plantas, promoviéndolos o inhibiéndolos (Leopold y Kriedemann, 1975).

En algunos casos, la presencia y acción conjunta de dos fitohormonas (por ejemplo auxinas y citocininas) puede inducir y fijar un tipo determinado de expresión morfológica de acuerdo a los niveles relativos entre sí, o de cada una de ellas en un tejido, así por ejemplo, auxinas de acuerdo a su nivel relativo pueden conducir a la formación de raíces y las citocininas a la formación de brotes (Jordán y Casarito, 2006).

3.13. Prohexadiona de calcio

La Prohexadiona de calcio es un inhibidor de la biosíntesis de giberelinas. En la biosíntesis de las Giberelinas, la prohexadiona de calcio (P-Ca), actúa de la forma primaria en la inhibición de la 3 β -hidroxilación, como consecuencia de estos se reducen los niveles de la GA₁ (activa) y provoca la acumulación de su precursor inmediato, GA₂₀, además también evita el catabolismo de GA₁ a GA₈ inactivo mediante el bloqueo de la 2 β -hidroxilación (Evans *et al.*, 1999).

La prohexadiona de calcio presenta interesante herramienta complementaria para las prácticas culturales y el material genético usado para conseguir y mantener un equilibrio vegetativo-reproductivo en cultivos hortícolas y ornamentales, así mismo se

asume que se evita la elongación celular, teniendo como efecto una reducción de la estructura morfológica de las plantas (Costa *et al.*, 2001).

Algunos autores han observado que el número de flores no es afectado por la aplicación de P-Ca en cultivos como el arroz y frambuesa. Esto es debido al hecho de que las giberelinas están asociados con la elongación celular y no a la división celular (Kim *et al.*, 2007; Palonen *et al.*, 2008).

El conocimiento sobre la influencia de P-Ca en la fisiología vegetal de varios cultivos hortícolas, permite considerar a este retardante de crecimiento como un biorregulador que puede contribuir a controlar el crecimiento vegetativo-reproductivo de varias especies hortícolas (Ramírez *et al.*, 2005).

Otra ventaja de este regulador de crecimiento es que lleva bajo potencial de bioacumulación en el medio ambiente y tiene un efecto toxicológico insignificante sobre los mamíferos, por lo tanto, se ha sugerido como una alternativa sobre el daminozide (ácido aminosuccínico) por ser un producto químico fitotóxico.

P-Ca ha sido poco aplicado en cultivo de tejidos, entre los artículos que mencionan el uso de este retardante de crecimiento se encuentra el descrito por García-Osuna *et al.*, (2011) quienes evaluaron la disminución de hiperhidricidad en *Turbinicarpus valdezianus*; Sansberro *et al.*, (2001) confirmaron que P-Ca inhibe la biosíntesis de giberelinas, lo que se refleja en la disminución del crecimiento longitudinal de los brotes en *Ilex paraguariensis*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del sitio experimental

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.



Figura 6. Ejemplares de *Dasyliirion cedrosanum* Trel.

4.2. Material vegetal

Semillas de *Dasyliirion cedrosanum* Trel.

Diferentes actividades planteadas en la presente investigación, fueron llevadas a cabo en las siguientes dos etapas:

4.3. Etapa I: Germinación de semilla de sotol en condiciones *in vitro*

4.3.1 Desinfección de la semilla

Uno de los pasos principales de la germinación de semillas *in vitro* es la asepsia, para esto se colocaron 160 semillas recién cosechadas y sin brácteas de *D. cedrosanum* en un vaso de precipitado y se le aplicaron 3 gotas de tween 20 y se enjuagaron con agua corriente. Posteriormente en la campana de flujo laminar se mantuvieron en alcohol al 70% por 1 minuto, en seguida se enjuagaron con agua destilada estéril por

tres ocasiones (figura 7), luego se depositaron en una solución de hipoclorito de sodio al 30 % por 10 min, se volvió a enjuagar por tres veces en agua destilada estéril por 1 minuto.



Figura 7. Procedimiento de asepsia.

4.3.2 Establecimiento de semilla *in vitro*

Después de haber finalizado la fase de asepsia, las semillas se sometieron a dos periodos de imbibición, la primera durante 24 horas y la segunda por 48 horas en agua destilada estéril, transcurrido el tiempo se procedió a realizar un nuevo protocolo de asepsia en la campana de flujo laminar.

Se realizó la preparación del medio nutritivo de MS suplementado con 100 mg de mio-inositol, 0.001 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0.001 mg mg L⁻¹ de piridoxina-HCl, 0.001 mg mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 0.002 mg L⁻¹ de glicina más, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 4 g L⁻¹ de phytigel a un pH de 5.7. Se colocaron 25 ml de medio de cultivo en frascos tipo gerber, considerando cada frasco como una repetición y se contó con 5 repeticiones, los que posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Después de haber solidificado el medio se realizó la siembra de 16 semillas por unidad experimental con 5 repeticiones en los dos tratamientos (24 y 48 h). Los frascos se

transfirieron al cuarto de incubación a una temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, con 16 horas luz y 8 de oscuridad a 2500 lux.

4.4. Etapa 2.- Micropropagación de brotes

Los brotes obtenidos de la etapa 1 se utilizaron como fuente de explantes secundarios, se realizaron cortes superiores de las plántulas, utilizando únicamente los tallos en segmentos de 0.5 cm de largo, esto dentro de la campana de flujo laminar.

Se estableció una comparación entre medios MS y PCL2 adicionado con 250 mg L^{-1} de myo-inositol, 0.001 g L^{-1} de ácido nicotínico, 0.001 g L^{-1} de piridoxina-HCl, 0.001 g L^{-1} de tiamina-HCl, 0.02 g L^{-1} de glicina, 80 mg L^{-1} de adenina, 30 g L^{-1} de sacarosa y 4 g L^{-1} de phytigel a un pH de 5.7. Se agregaron además diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento, BAP y P-Ca a 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg L^{-1} y 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg L^{-1} que constituyeron los 16 tratamientos (cuadro 2). Se colocaron 20 ml de medio de cultivo en frascos tipo gerber, considerando cada frasco como una repetición y se contó con 5 repeticiones, los que posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Una vez solidificado el medio se trasvasaron los explantes que se obtuvieron seccionando las hojas, conservando el tallo y eliminando las raíces de las plántulas. Se colocaron cuatro explantes por frasco bajo la campana de flujo laminar. Los frascos se colocaron en el cuarto de incubación a una temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 18 h luz. Se renovó el medio de cultivo cada 4 semanas por dos ocasiones y se evaluó el número de brotes a las 8 semanas de desarrollo.

Cuadro 2. Tratamientos establecidos en la micropropagación de brotes de sotol.

TRATAMIENTOS	REGULLADORES DE CRECIMIENTO	
	BAP	P-Ca
T1	0.0	0.0
T2	0.0	0.5
T3	0.0	1.0
T4	0.0	2.0
T5	0.5	0.0
T6	0.5	0.5
T7	0.5	1.0
T8	0.5	2.0
T9	1.0	0.0
T10	1.0	0.5
T11	1.0	1.0
T12	1.0	2.0
T13	2.0	0.0
T14	2.0	0.5
T15	2.0	1.0
T16	2.0	2.0

La variable a evaluar fue contabilizar el número de brotes por cada tratamiento y repetición a los 4 meses de desarrollo como se muestra en la Figura 8



Figura 8. Formación de brotes de *D. cedrosanum*.

4.5. Diseño experimental

Las variables utilizadas para la etapa de germinación fueron el índice de velocidad de germinación y porcentaje de germinación. Así mismo para obtener el índice de Velocidad de Germinación se empleó la fórmula propuesta por Maguirre (1962), es uno de los más utilizados y se expresa como número de semillas germinadas por día. Su fórmula de cálculo es:

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_i}{N_i} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$$

IVG = Índice de Velocidad de Germinación.

G₁ = Representan número de semillas germinadas en el día.

N₁ = Representan número de días desde la iniciación del experimento de germinación.

Para la etapa 2 se utilizó un diseño completamente al azar de 16 tratamientos con cinco repeticiones. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias (Tukey $P \leq 0.01$) mediante software estadístico Infostat 2014.

4.5.1. Variables evaluadas

Las variables que se evaluaron en este trabajo de investigación fueron: porcentaje de germinación, Índice de velocidad de germinación y número de brotes por explante a los 4 meses del desarrollo.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Índice de velocidad de germinación

En la Figura 9 se observan que en el Índice de velocidad de germinación hay diferencias entre las horas de imbibición. El mejor resultado fue durante la imbibición por 48 horas, donde se alcanzó 9.56 de IVG en tan solo 16 días, mientras en la imbibición de 24 horas, se obtuvo 7.13 de IVG en 22 días.



Figura 9. Índice de Velocidad de Germinación de semillas de sotol con imbibición de 24 y 48 horas en agua desionizada estéril.

5.2 Porciento de germinacion

Durante el trabajo realizado también se calculó el porciento de germinación, siendo para la imbibición de 24 horas un 98.12 % de germinación y para la imbibición de 48 horas se obtuvo el 95.62 % de semillas germinadas (figura 10).

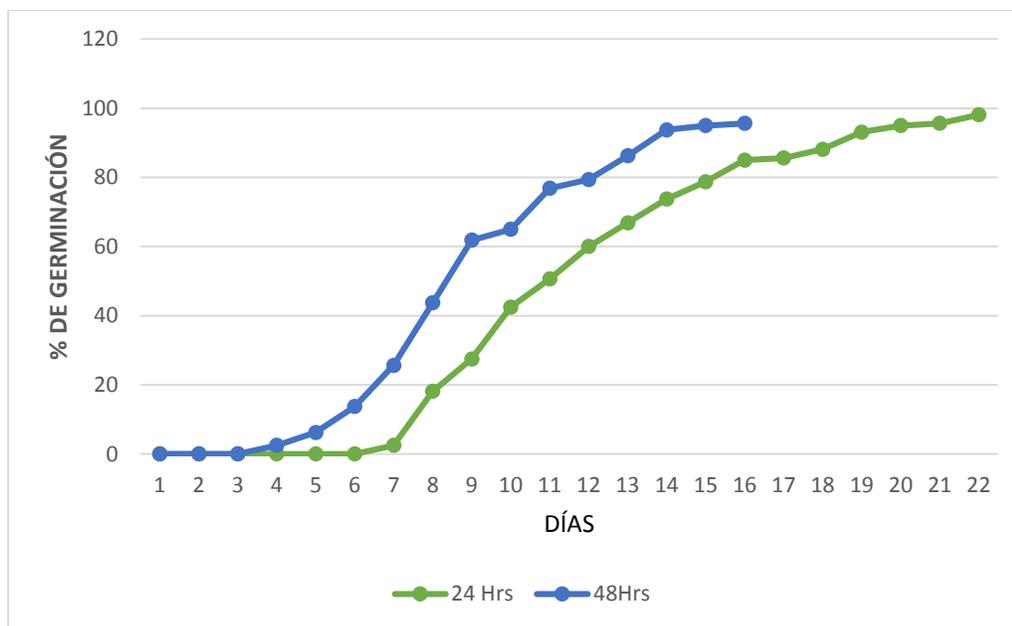


Figura 10. Porcentaje de germinación de *D. cedrosanum* Trel. Con una imbibición de 24 horas y 48 horas en agua desionizada estéril.

Los resultados muestran optimización de los tratamientos de germinación de la semilla de sotol sobre otros trabajos experimentales. Calderón (2004), trabajo con semillas de *D. cedrosanum* Trel., de tres semanas de ser cosechadas, y obtuvo un 77 % de germinación, los tratamientos utilizados fueron: escarificación química con ácido sulfúrico a 75 ppm, y un 67% de germinación con la aplicación de ácido sulfúrico a 150 ppm. Dzib (2003), reportó que las semillas de sotol, después de un año de ser cosechadas y siendo sumergidas en ácido sulfúrico a 500 ppm durante un minuto se obtiene un alto porcentaje de germinación, alcanzando hasta un 93.66%. Por otro lado, Palma (2000), trabajo con semillas de *Dasyllirion spp*, con un periodo de almacenamiento de 2 años y concentraciones altas de ácido sulfúrico a 15 %, logrando un 92 % de germinación. Sin embargo existen durante la vida de la semilla muchos factores que afectan ligera o totalmente la calidad de la semilla, uno de ellos, es la

edad, que conforme aumenta se va perdiendo su viabilidad y más cuando su almacenamiento no es el adecuado como menciona Pidi (1981).

Sierra y Morales (2002), mencionan que las semillas de sotol con brácteas y una edad postcosecha de cuatro y siete meses, presentan un rango de germinación entre 0 y 15% sin aplicarle ningún tratamiento.

En otro estudio donde se aplicó extractos de raíz de lechuguilla (*Agave lechuguilla*) en semillas de sotol sin brácteas, se logró incrementar la germinación de 87.6 a 96% (Arce *et al.*, 2003b).

5.3. Micropropagación de brotes

Se estudió el efecto de diferentes Medios y concentraciones de BAP con P-Ca en la micropropagación de sotol. No se observaron diferencias significativas entre el medio MS y PCL2 (cuadro 3). La variable evaluada fue el número de brotes, se observó en el análisis de varianza y la comparación de medias de Tukey ($p < 0.01$) que la combinación de BAP con P-Ca en el medio de cultivo incrementa hasta un 43 % el número de brotes cuando se incluyó el retardante del crecimiento (cuadro 4).

Cuadro 3. Análisis de Varianza para número de brotes generados de sotol desarrollándose en medio nutritivos MS con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculada	P>F
Tratamientos	15	95.18	6.35	33.77	<0.0001
Error Exp.	64	12.02	0.19		
Total	79	107.20			
Coeficiente de variación 32.65%					

Cuadro 4. Análisis de Varianza para número de brotes generados de sotol desarrollándose en medio nutritivo PCL2 con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento BAP y P-Ca

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculada	P>F
Tratamientos	15	92.93	6.20	13.41	<0.0001
Error Exp.	64	29.56	0.46		
Total	79	122.49			
Coeficiente de variación 52.68%					

El mejor tratamiento fue el T15 en ambos medios alcanzando un promedio máximo de 3.5 brotes por explante cuando el medio fue adicionado con 2.0 mg L⁻¹ de BAP y 1.0 mg L⁻¹ de P-Ca, los siguientes tratamientos que presentaron mejor respuesta fue la concentración de BAP de 2.0 mg L⁻¹ con P-Ca (T14 y 16) a concentraciones de 0.5 y 2.0 mg L⁻¹. Los tratamientos T9 a T13 no presentaron diferencias significativas (figura 11). La menor cantidad de brotes se observó en los tratamientos T2 a T8.

El tratamiento sin reguladores T1 y con una concentración de P-Ca a 0.5 mg L⁻¹ (T2) no presentaron brotes en el medio PCL2 (figura 12) y en el medio MS fue mínimo en esa concentración.

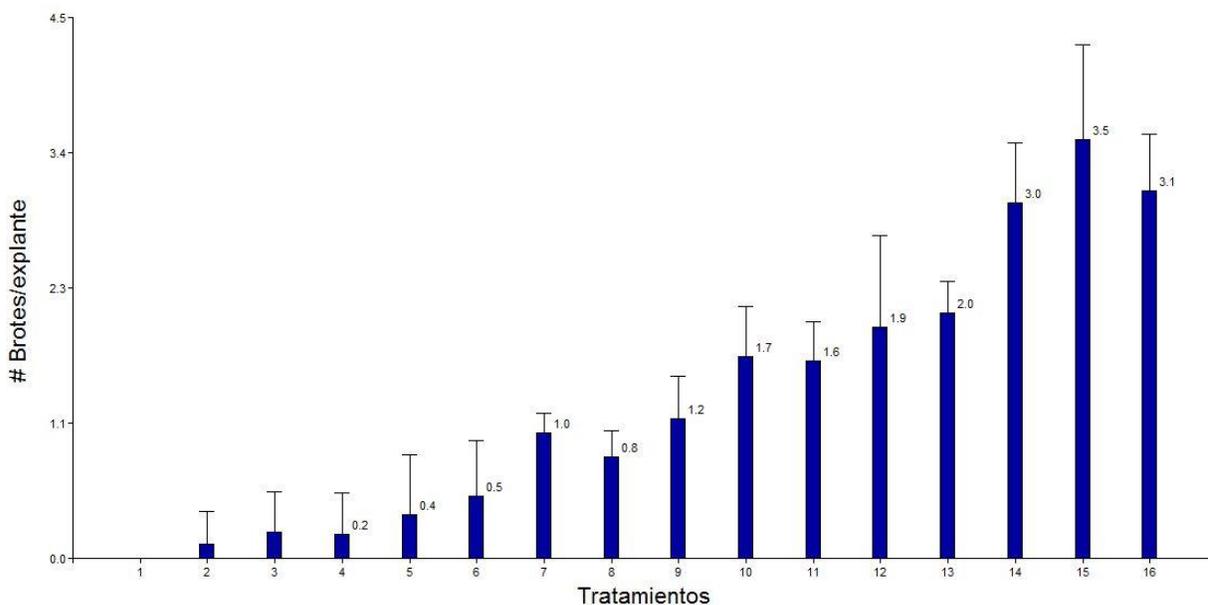


Figura 11. Número de brotes de sotol a las 8 semanas en medio MS en presencia de BAP y P-Ca.

La respuesta al medio presentó variados efectos. Se observó clorosis en la parte distal de la hoja en los explantes en el medio MS cuando se combinó con P-Ca en una concentración de 2 mg L⁻¹. Por otro lado, se observó hiperhidricidad en los tratamientos con BAP solo a concentración de 2 mg L⁻¹ (T14). Posiblemente estas respuestas pueden ser explicadas a la deficiencia nutricional de uno de los medios de cultivo (MS), ya que el PCL2 contenía sulfato y enriquecido con vitaminas, el cual favoreció el desarrollo de las plántulas.

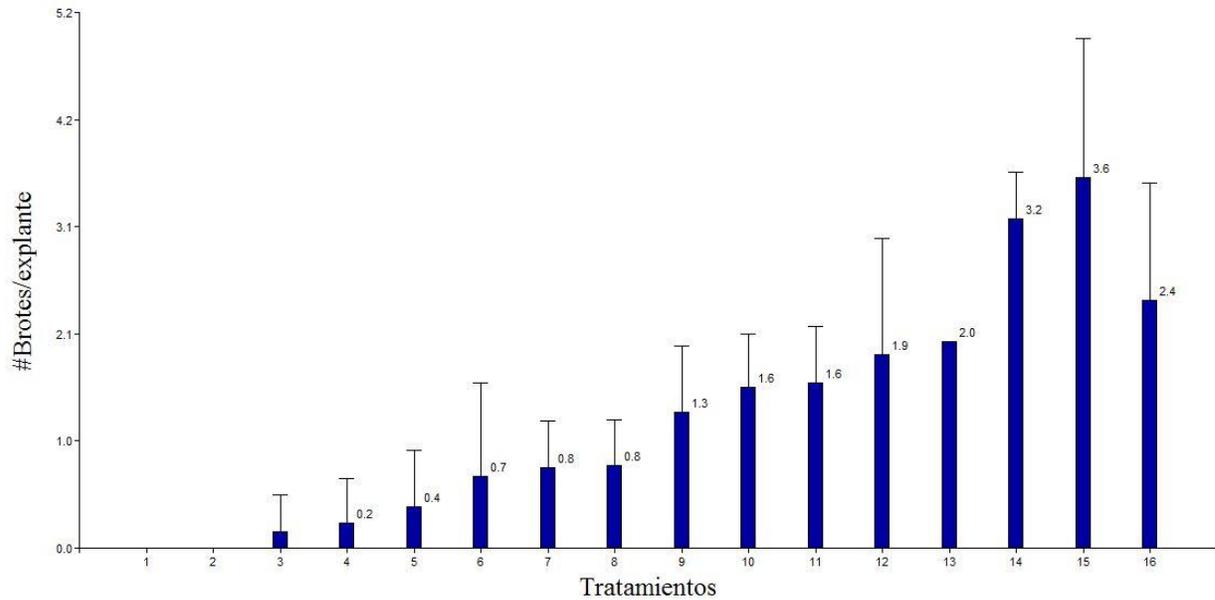


Figura 12. Número de brotes de sotol a las 8 semanas en medio PCL2 en presencia de BAP y P-Ca

Los brotes se trasvasaron a las 8 semanas en un medio libre de reguladores lo que favoreció la producción de raíces a las 4 semanas posteriores (figura 13B).

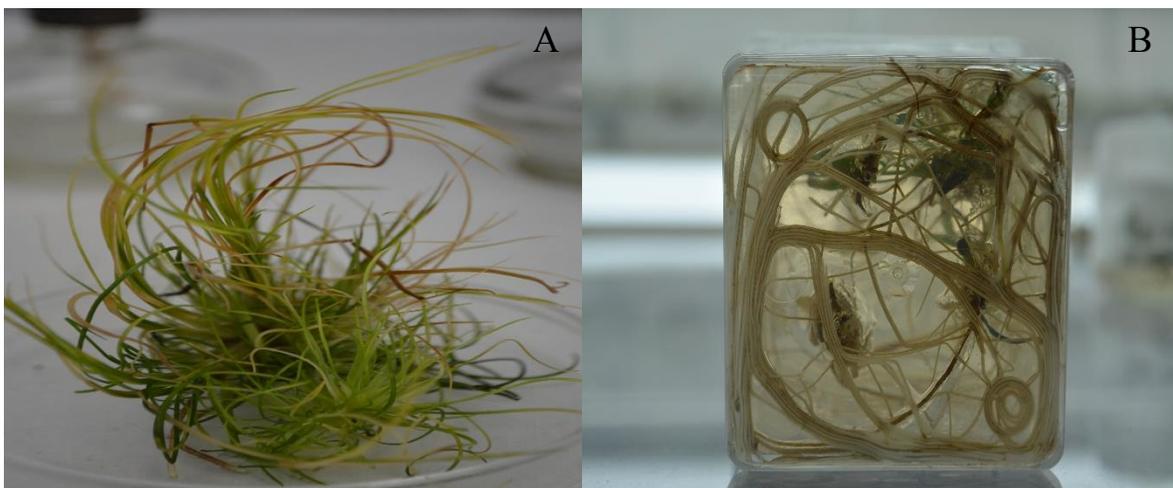


Figura 13. Respuesta morfológica en la formación de brotes (A) y raíces (B) de sotol.

La tasa de multiplicación de brotes fue significativa con la combinación de los dos reguladores obteniéndose 3.5 brotes por explante. BAP y P-Ca actuaron sinérgicamente, además P-Ca favoreció la síntesis de citocininas endógenas (Rademacher, 2000).

Este valor fue menor a los valores obtenidos para el género (Reyes *et al.*, 2013) donde se obtuvo hasta 10.3 brotes por explante con BA a una concentración de 3 mg L⁻¹, de igual forma, para la especie (Villavicencio *et al.*, 2007) donde se obtuvo un promedio de 7 brotes por explante.

Los resultados de este trabajo de investigación pueden ser explicados al considerar la edad fisiológica de los explantes, donde la presencia de citocininas endógenas favorece la organogénesis. Al respecto Alleweldt y Radler (1962), mencionan que el potencial organogénico de un explante es inversamente proporcional a su edad fisiológica y características morfogénicas, además, el tipo, concentración y combinación de algunas fitohormonas (citocinina y auxina) afecta la inducción y proliferación de brotes. Así mismo Skoog y Miller (1965), menciona que un alto nivel de citocinina contra un bajo nivel de auxina provoca la formación de brotes en tejidos. Villavicencio *et al.*, (2007), realizaron un estudio sobre micropropagación y producción *in vitro* de sotol, 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 complementó con diferentes concentraciones de fitohormonas, vitaminas y ajustes osmóticos. Se obtuvieron nuevos brotes a partir de epicotilos considerados como explante, los cuales con una relación citocinina-auxina de 10:1, mostraron que la respuesta morfogénica está relacionada con la presencia de fitohormonas, siendo la interacción BA-AIB (benciladenina-ácido indolbutírico) la que promueve la inducción de brotes de esta

especie, 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.

Los reguladores de crecimiento son los factores más importantes involucrados en la regulación del desarrollo bajo condiciones *in vitro*. Cuando las concentraciones de los reguladores de crecimiento no son fisiológicas se observa una expresión morfológica del estrés. En el caso de la aplicación de BAP solo, se observó brotes con hiperhidricidad, mientras al combinarse con P-Ca favoreció la formación de plantas sin esta respuesta fisiológica. La aplicación de Prohexadiona de calcio ha demostrado promover la formación de brotes en diferentes cultivares (Hisamatsu *et al.*, 1998; Sansberro *et al.*, 2001; Ramírez *et al.*, 2005; García-Osuna *et al.*, 2011).

La P-Ca favorece la brotación por inhibición de la GA_3 y GA_7 las cuáles pueden inhibir el crecimiento en ciertos tejidos por bloqueo de la 3 β -hidroxidación; por otro lado también puede impedir la formación de GA_1 y GA_4 por 2 β -hidroxilación que conduce a la formación de GA_8 y GA_{34} (Sanberro *et al.*, 2001).

El crecimiento de la planta requiere de una combinación de división celular y expansión, la cual es ampliamente regulada por factores ambientales y endógenos, como las fitohormonas.

VI. CONCLUSIONES

- La germinación *in vitro* de las semillas de sotol presentan un porcentaje de germinación alto con el proceso de imbibición de 24 a 48 hrs. El IVG fue mayor con el tratamiento con 48 h de imbibición.
- Los medios evaluados fueron adecuados para la propagación masiva. La combinación de la citocinina (BAP) y el inhibidor de giberelina (P-Ca) resultaron en producción significativa de brotes. Y de una mejor calidad de brotes en comparación con el BAP solo.
- La calidad del brote fue mejor en el medio PCL2.
- Se recomienda probar la P-Ca con otras citocininas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alleweldt, G. y Radler, F. 1962. Interrelationship between photoperiodic behavior of grapes and growth of plant tissue cultures. *Plant Physiology*, 37(3): 376.
- Arce, G. L., Valdés, R. J., Valdés, O. A., Gallegos Del T. A. y Calderón, G. E. R. 2003a. Rompimiento de latencia en semillas de *sotol* (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.) mediante escarificación física y ácido sulfúrico. En: Resultados de Proyectos de Investigación 2003. Dirección de Investigación, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah. México. 496-500 p.
- Arce, G. L., R. J. Valdés, O. A. Valdés, Del T. A. Gallegos y Padilla, V. G. 2003b. Pruebas de germinación de semillas de sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.) utilizando extractos secos de lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) bajo condiciones de laboratorio. En: Resultados de Proyectos de Investigación 2003. Dirección de Investigación, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah. México. pp. 492-495.
- Becerril, T. M. C. 2008. Micropropagación de plantas ornamentales. Memoria por experiencia profesional. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 48 pp.
- Benavides-Mendoza, A., Hernández-Valencia, R. E.M., Ramírez-Rodríguez, H., y Sandoval-Rangel, A. 2010. Tratado de Botánica Económica Moderna. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. 332 pp.
- Bogler D. J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Dasyilirion* (Nolinaceae). Ph. D. Dissertation. The University of Texas at Austin. 583 pp.

- Cano, P. A., Berlanga, R. C.A., Castillo, Q. D., Martínez, B. O.U. y Zarate L. A.. 2005. Análisis dimensional y tablas de producción de sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.) para el estado de Coahuila. INIFAP-CIRNE. Campo experimental Saltillo. Folleto técnico No. 18. Saltillo, Coahuila, México. 24 pp.
- Cano, P., A. y Martínez-Burciaga, O.U. 2007. Determinación de áreas potenciales para el establecimiento de plantaciones de sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.) en el estado de Coahuila. Folleto Técnico 31. INIFAP-CIRNOR. México 28 p.
- Cano, P. A.; Martínez, B. O.U.; Berlanga, R. C.A.; Villavicencio, G. E.E.; Castillo, Q. D. 2011. Guía para la evaluación de existencia de sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.) en poblaciones naturales del Estado de Coahuila. Centro de investigación Regional Noreste. Campo experimental Saltillo. Folleto técnico No. 43. Saltillo, Coahuila, México. 25 pp.
- Contreras D. C. y Ortega, R. I. 2005. Bebidas y regiones: historia e impacto de la cultura etílica en México. Plaza y Valdez. México. 200 pp.
- Costa, G., Andreotti, C., Bucchi, F., Sabatini, E., Bazzi, C., Malaguti, S. and Redemacher, W. 2001. Prohexadione-Ca (Apogee®): Growth regulation and reduced fire blight incidence in pear. *Horticultural Science*, 36(5): 931-93
- Cruz, L. H. F. 2011. Efecto en la capacidad fisiológica en semillas de sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.), con aplicación de biorreguladores. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah. México.
- Dzib, C. M. E. 2003. Rompimiento de latencia en semillas de sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.) utilizando algunos métodos de físicos y químicos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah. México.

- Encina-Domínguez, J. A.; Meave, J. A and Zarate-Lupercio, A. 2013. Structure and Woody species diversity of the *Dasyllirion cedrosanum* (Nolinaceae) rosette scrub of central and southern Coahuila state, México. *Botanical Sciences* 91(3):335-347
- Evans, J. R., Evans, R. R., Regusci, C. L. and Redemacher, W. 1999. Mode of action, metabolism, and uptake of BAS 125W, prohexadione-calcium. *Horticultural Science*, 34(7): 1200-1201.
- Faria, M. J., G. Aguilar y Silva A. 1996. Escarificación química de semillas de tres especies de Centrosoma para Sabanas bien drenadas. *Zootecnia Tropical*. 15(2): 221-237.
- Flores-García, A., Álvarez-Moctezuma, J. G., Rodríguez de la O, J. L., Corona-Ambriz, A. 2009. Respuestas orgánicas *in vitro* de *Nolina parviflora* (H. B. K.) Heml. *Foresta Veracruzana*, 11:25-32.
- García-Osuna. H. T., Benavides, M. A., Escobedo, B. L., Villarreal, Q. J. and Cornejo, O. E. 2011. Hyperhydricity control of in vitro shoots of *Turbinicarpus valdezius* (Möller) G and F. *Phyton*. 175.
- Gardea, A. A., Findley, L T., Orozco, A. J.A., Bañuelos, N., Esqueda, M., Huxman, T.H. 2012. Bacanora and sotol: Sofar, So close. Coordinación de desarrollo regional, Hermosillo, México. *Estudios Sociales* 2:153-168
- Hernández, J. A. 2008. Caracterización morfológica, anatómica e histológica del sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.) Tesis ingeniero en Agrobiología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah.
- Hisamatsu, T., Koshioka, M., Kubota, S., and King, R. W. 1998. Effect of gibberellin A₄ and GA biosynthesis inhibitors on growth and flowering of stock [*Matthiola*

- incana* (L.) R. Br.]. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science*, 67: 537–543
- Jankiewicz, L. S. 2003. Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Ediciones Mundi Prensa. 487 pp.
- Jordán, M. y Cassareto, J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: Auxinas, giberelinas y citocininas. *Fisiología Vegetal*, Ediciones Universidad de la Serena, Chile. Vol. 15.
- Juárez, D. A. 2014. Eliminación de latencia en semillas de cortadillo (*Nolina cespitifera* Trel.), bajo condiciones de laboratorio e invernadero, utilizando tratamientos físicos, químicos y mecánicos. Tesis de maestría en ciencias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. Pp 103.
- Kim, H. Y., Lee, I. J., Hamayun, M., Kim, J. T., Won, J. G., Hwang, I. C. and Kim, K. U. 2007. Effect of prohexadione calcium on growth components and endogenous gibberellins contents of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193(6): 445-451.
- López-Barbosa, L. A y Portes-Vargas, L. 2002. El sotol una planta muy especial. Manual del productor. Print Power, S.A de C.V. México, D.F. 34 p.
- López Barbosa LA. 2005. El sotol en Coahuila, potencialidades y limitaciones. En: Conteras Delgado C y Orega Ridaura I (eds). *Bebidas y regiones, historia e impacto de la cultura etílica en México*. Plaza y Valdés, S.A. México. pp. 63-84.
- Leopold, C. A. y Kriedemann, P.E. 1975. *Plant growth and development*. Ed, 2da. McGraw-Hill Book, U.S.A.
- Maguirre, J. D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science, Madison*, (2): 176-177.

- Martínez, M. 1979. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*, 3ª. reimp. 1994. Ed. Fondo de Cultura Económica. México.
- Martínez, P.A., Ortega-Larrocea, M. P., Chavez, V. M and Bye, R. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoria-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 74(2): 135-142.
- Melgoza, C. A. y Sierra, J. S. 2005. Contribución al conocimiento y distribución de las especies de *Dasyllirion* spp. (Sotol) en Chihuahua, México. *Ciencias Forestales en México*. 28(93): 25-40
- Miransari, M. and Smith, D. L. 2014. Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 99: 110-121.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497 pp
- Nakagawa. 1999. Teste de vigor baseado no desempenho das plântulas. Cap. 2 de vigor de sementes: conceitos e testes. ED. Abrates. Londrina, PR Brasil.
- Osorio-Rosales, M. L., Mata-Rosales, M. 2005. Micropropagation of endemic and endangered Mexican species of ponytail palms. *Hortscience*, 40:1481-1484.
- Palma, E.J.I. 2000. Bases para la propagación de sotol (*Dasyllirion* spp.) vía in Vitro y por semillas. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales. Secretaria de investigación y Postgrado. Universidad Autónoma de Chihuahua. Cd. Delias, Chihuahua; México.
- Palonen, P., Pehkonen, E. and Rantanen, M. 2008, Vegetative Growth, Cropping and Winter Hardiness of Selected Raspberry Cultivars as Affected by ProCa. *Acta Horticulturae*. 838: 99–102.

- Phillips, G. C. and Collins, G. B. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Science*, 19(1): 59-64.
- Poinar, H., Kuch, M., Sobolik, K., Barnes, I., Stankiewicz, A., Kuder, T., Apaulding, W., Braynt, V. and Paabo, S. 2001. A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native Americans. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 98:4317-4322.
- Pidi, N., 1981. La multiplicación de las Plantas. Editorial de Vecchi. Barcelona, España.
- Rademacher W. 2000. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual Review of Plant Biology* 51(1): 501-531.
- Ramírez, H., Peralta, M. R., Benavides, M. A., Sánchez, L. A., Robledo, T. V. y Hernández, D. J. 2005. Efecto de prohexadiona-ca en tomate y su relación con la variación de la concentración de giberelinas y citocininas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11(2): 283-290.
- Reyes-Valdés, M. H., Benavides-Mendoza, A., Ramírez-Rodríguez, H. y Villarreal-Quintanilla, J. A. 2012. Biología e importancia del sotol (*Dasyllirion* spp). Parte I: Sistemática, genética y reproducción. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. *Planta*. (14):11-13 pp.
- Reyes, S. A. I., Morales M. C. F., Pérez R. M. E., Pérez M.B.E. 2013 Propagación *in vitro* de Nolináceas Mexicanas. *Investigación y Ciencia* 21(58):12-20.
- Rojas, G. M. 1979. El embrión y la germinación, fisiología vegetal aplicada. Segunda edición. Editorial num. 465 Mexico D.F. pp.192.
- Samyn, G. L. J. 1997. Micropropagation of *Beaucarnea recurvata* Lem. Syn. *Nolina recurvata* (Lem.) Hemmmsl.(Ponytail palm). In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.).

- Biotechnology in Agriculture and Forestry vol. 40. High-Tech and Micropropagation VI. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 264-275 pp.
- Sánchez, Y. P. y Ramírez M. V. 2006. Tratamientos Pregerminativos en Semillas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. y *Prosopis juliflora* (Sw.) Dc. *Revista Facultad de Agronomía*. (Luz), 23:257-272.
- Sansberro, P. A., Mroginski, L. A. and Bottini, R. 2001. *In vitro* morphogenetic responses of *Ilex paraguariensis* nodal segments treated with different gibberellins and Prohexadione-Ca. *Plant Growth Regulation*, 34(2): 209-214.
- Secretaría de Economía. 2004. NORMA Oficial Mexicana NOM-159-SCFI-2004, Bebidas alcohólicas-Sotol-Especificaciones y métodos de prueba. <<http://www.aduanas-mexico.com.mx/claa/ctar/normas/nm159asc.htm>>
- Sierra, T.J.S., C. Morales N. 2002. Características físicas y de germinación en la semilla de sotol (*leiophyllum*). Memorias XXXVIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Puebla, Mex.
- Sierra, T. J.S., Lara, M. C.R., Carrillo, R. R., Mendoza, C. A., Morales, N. C. y Royo, M.M.H. 2008. Los sotoles (*Dasyilirion spp*) de Chihuahua. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de investigación Regional Norte-Centro. Sitio experimental la Campana-Madera. Folleto 20. Chihuahua, Chih., México.
- Skoog, F. and Miller, C.O. 1965. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11: 118–131.

- UAC. 2006. Conociendo el sotol. Universidad Autónoma de Coahuila. México.
Disponible en:
<http://www.uadec.mx/hub.cfm?FuseAction=simple.especiales.603>.
- USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN) [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Disponible en: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxfam.pl> (17 January 2013).
- Valdez, O. A.; Ceballos, R. I.; Facio, P. F. y Arce, G. L. 2005. Eliminación de la latencia en semillas de Costilla de vaca (*Atriplex canescens*), bajo condiciones de laboratorio e invernadero, utilizando tratamientos físicos, químicos y mecánicos. Revista Agraria Epoca. No. 3. V. 2, año II.
- Vega-Cruz J., Melgoza-Castillo A., y Sierra Tristán J.S. 2006. Caracterización del crecimiento de dos especies (*Dasyllirion leiophyllum* Engelm. ex Trelease y *D. sereke* Bogler) fertilizadas con nitrógeno y fósforo. *Revista de Ciencia Forestal en México* 31:55-71
- Villagra, P. 1997. Germination of *Prosopis argentea* and *P. alpataco* seeds under saline conditions. *Journal of Arid Environments* 37:261-67.
- Villavicencio, G. E, Cano P. A., Juárez S. A. 2007. Guía para la micropropagación y producción *in vitro* de plantas de sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.). *Folleto Técnico* Núm. 37. INIFAP.
- Zárate L., A. 2003. Inventario de las poblaciones de sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.) en el Estado de Coahuila. Secretaría de Fomento Agropecuario del Estado de Coahuila. 24 pp.

XII. ANEXOS

Medio MS

Componentes químicos para medio MS

COMPUESTOS	SOLUCIÓN MADRE 10L (g)
MACRONUTRIENTES	
NH ₄ NO ₃	16.50
KNO ₃	19.00
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0.3322
KH ₂ PO ₄	1.70
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	3.70
MICRONUTRIENTES	
MnSO ₄ . 4H ₂ O	0.128
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.086
H ₃ BO ₃	0.0620
KI	0.083
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.0025
CoCl ₂	0.00025
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.00025
SOLUCIÓN DE FIERRO	
Na ₂ EDTA	0.373
FeSO ₄ 7 H ₂ O	0.278

Medio PCL2

Componentes químicos para el medio PCL2

COMPUESTO	SOLUCIÓN MADRE 10L(G)
MACRONUTRIENTES	
NH ₄ NO ₃	10
KNO ₃	21
MgSO ₄ .7 H ₂ O	4.35
KH ₂ PO ₄	3.25
NaH ₂ PO ₄	0.073
CLORURO DE CALCIO	
CaCl ₂	4.56
CaCl ₂ .H ₂ O	6.0
MICRONUTRIENTES	
MnSO ₄ H ₂ O	0.15
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0.05
H ₃ BO ₃	0.05
KI	0.01
NaMoO ₄ .2 H ₂ O	0.004
CoCl ₂	0.001
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0.001
SOLUCIÓN FIERRO	
Na ₂ .EDTA	0.3731
FeSO ₄ 7 H ₂ O	0.25
VITAMINAS	
Myo-inositol	2.50
Ácido nicotínico	0.01
Piridoxina	0.01
Tiamina	0.01