

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIAS SOCIOECONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE ADMINISTRACIÓN AGROPECUARIA



Micropropagación del Orégano Mexicano (*Lippia graveolens* Kunth)

Por

KEYLA PÉREZ VELÁZQUEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de

INGENIERO AGRONOMO ADMINISTRADOR

Saltillo, Coahuila, México.
Diciembre de 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIAS SOCIOECONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE ADMINISTRACION AGROPECUARIA

Micropropagación del orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth)

Por:

KEYLA PEREZ VELAZQUEZ

TESIS

Que somete a Consideración del H. Jurado examinador como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:

INGENIERO AGRONOMO ADMINISTRADOR



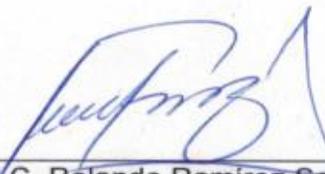
Dra. Hermila Trinidad García Osuna
Asesor principal



Dra. María Alejandra Torres Tapia
Coasesor



M.A.E. Francisco Ortiz Serafin
Coasesor



M.C. Rolando Ramírez Segoviano
Coordinador de la División de Ciencias Socioeconómicas

Saltillo Coahuila, México
Diciembre de 2021

A 01 de diciembre de 2021, Saltillo, Coahuila

DERECHOS DE AUTOR Y DECLARATORIA DE NO PLAGIO

DECLARO QUE:

El trabajo de investigación titulado “**Micropropagación de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth)**” es una producción personal, donde no se ha replicado, utilizado ideas, citas integrales e ilustraciones diversas, obtenidas de cualquier tesis, obra intelectual, artículo, memoria (en versión digital o impresa), sin mencionar de forma clara y exacta su origen o autor.

En ese sentido lo anterior puede ser confirmado por el lector, estando consciente de que en caso de comprobarse plagio o no se respetaron los derechos de autor, esto será objeto de sanciones del Comité Editorial, y/o legales a las que haya lugar, quedando, por lo tanto, anulado el presente documento académico, si derecho a la aprobación del mismo, ni a su nuevo envío.

Autor Principal



Keyla Pérez Velázquez

Nombre y Firma

Asesor Principal



Hermila T. García Osuna

Nombre y Firma

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Gracias porque hasta aquí me has ayudado y por tu amor que se ha manifestado en cada instante, por sostenerme en momentos difíciles, le doy gracias al señor por la vida misma.

A mi “Alma mater” La Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) gracias por abrirme sus puertas, por haberme acobijado y darme la oportunidad de formarme en el ámbito profesional.

A mi asesora

Quiero agradecer a la Dra. Hermila Trinidad García Osuna por aceptar ser el mentor principal de esta investigación, por darme su apoyo en la realización de este trabajo, por haberme brindado su amistad, su confianza, su tiempo y conocimiento, así como la motivación a través de sugerencias, recomendaciones y constancia para hacer posible la elaboración de este trabajo, infinitas gracias.

A mis coasesores

M.C. Reyna Rojas García por su apoyo incondicional, por sus valiosas opiniones y contribuciones en la colaboración y revisión en este trabajo.

Dra. María Alejandra Torres Tapia gracias por su apoyo y la disposición para la revisión y culminación de la presente investigación.

M.C. Francisco Serafín Ortiz por su participación en mi formación profesional, así como su valiosa ayuda en la revisión de este trabajo.

A Jessica Geraldine Rodríguez Flores por su apoyo en las actividades de laboratorio

Al Laboratorio cultivo de tejidos vegetales departamento de Fitomejoramiento por el apoyo otorgado para la realización de esta investigación, por facilitar las herramientas de trabajo, por darme un espacio y la oportunidad de ampliar mis conocimientos académicos.

DEDICATORIA

Con mucho cariño a mis PADRES:

ERNESTO PEREZ ORTIZ
ETELVINA VELAZQUEZ VELAZQUEZ

Por todo su esfuerzo, amor y fortaleza inquebrantable y por su constante apoyo en todo momento y por esa razón el más grande aliciente para el cumplimiento de mis objetivos que significan alegría y orgullo para mí y también para ustedes.

A MIS HERMANOS

Hermanas Leydi y Mari cruz por su compañía, su cariño y por ser parte de mi familia. A mis hermanos Gerónimo y José gracias por los sacrificios que han realizado para que yo pudiera terminar mis estudios por todo su cariño y por su confianza que en mi depositaron. Gracias a los cuatro que en el día a día con su presencia, respaldo y cariño me impulsan para salir adelante, además de saber que mis logros también son los suyos.

A MIS AMIGOS

Alma Castillo, Violeta Moreno, Blanca Roblero, Eugenia Torres, Javi Betan, Georgina Garcés y Karina Pérez por brindarme su sincera amistad por los momentos compartidos a lo largo de mi carrera hicieron mi instancia amena. Espero que el tiempo y la distancia no nublen la amistad y los recuerdos forjados.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera han contribuido en mi formación personal y profesional y que voluntariamente ha quedado omitidas, pero jamás olvidadas. ¡¡GRACIAS!!

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
1. Justificación	7
2. Objetivos.....	7
2.1 Objetivo general	7
2.2 Objetivos específicos	7
3. Hipótesis.....	7
CAPÍTULO I REVISIÓN DE LITERATURA.....	8
1.1 Generalidades	8
1.1.1 Taxonomía y descripción botánica.....	10
1.1.2 Distribución geográfica	11
1.1.3 Requerimientos ambientales	12
1.1.4 Composición química.....	13
1.1.5 Importancia económica y ecológica	13
CAPÍTULO II PROPAGACION IN VITRO.....	17
2.1 Establecimiento del cultivo aséptico	18
2.2. Etapa de Multiplicación	21
2.2.3 Etapa de enraizamiento	22
2.3. Etapa de aclimatación.....	23
CAPÍTULO III MATERIALES Y METODOS.....	25
3.1 Ubicación del experimento.....	25
3.2 Material Vegetal	25
3.3 Micropropagación de <i>L. graveolens</i>	25
3.3.1 Establecimiento del cultivo aséptico	25
3.3.1.1. Protocolo de asepsia	26
3.3.1.2 Siembra del explante	26
3.3.2 Etapa de propagación.....	27
3.3.3 Etapa de enraizamiento	28
3.3.4 Etapa de aclimatación.....	29
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSION.....	30
4.1 Establecimiento de cultivo aséptico	30

4.2 Etapa de propagación.....	31
5.3 Etapa de enraizamiento.....	37
5.4 Etapa de aclimatación.....	39
CONCLUSIONES.....	41
BIBLIOGRAFIA.....	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos y concentraciones de reguladores de crecimiento utilizados en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i>	28
Cuadro 2. Tratamientos para la etapa de enraizamiento.	29
Cuadro 3. Porcentaje de explantes contaminados, muertos y axénicos en la etapa de establecimiento de <i>L. graveolens</i>	30
Cuadro 4. Análisis de varianza para la variable número de brotes por explante en <i>L. graveolens</i>	31
Cuadro 5. Análisis de varianza para la variable altura de explantes en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i>	35
Cuadro 6. Análisis de varianza para longitud de raíz en la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i>	37
Cuadro 7. Análisis de varianza de los tratamientos en la etapa de aclimatación de <i>L. graveolens</i>	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica del orégano mexicano.....	12
Figura 2. Precios de orégano a nivel nacional en diversos estados y años	15
Figura 3. Fluctuación de precios de aceite esencial de orégano a nivel nacional e internacional durante el periodo de 2004-2018	16
Figura 4. Material vegetal de orégano obtenido para su propagación. Planta de orégano B) Expantes (yema apical y segmento nodal).	26
Figura 5. Número de brotes obtenidos en los diferentes tratamientos de propagación de <i>L. graveolens</i>	32
Figura 6. Propagación in vitro de <i>L. graveolens</i>	34
Figura 7. Promedio de altura de brotes de los tratamientos en la propagación de <i>L. graveolens</i>	36
Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de auxinas en la longitud de raíz de brotes <i>L. graveolens</i>	38
Figura 9. Porciento de sobrevivencia en la atapa de aclimatación de <i>L. graveolens</i> . Valores con la misma letra, no muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$).	40

RESUMEN

El orégano mexicano (*Lippia graveolens*) es una planta herbácea perteneciente a la familia Verbenaceae. Presenta una amplia distribución en México y con valor económico, social, y ecológico. México es el segundo exportador a nivel mundial, se colecta de poblaciones silvestres en época de lluvias, situación que lleva a sobreexplotación del recurso, con una disminución de las poblaciones naturales. El cultivo comercial está aún poco difundido en el país, por lo que se requiere generar información para establecer tecnologías eficientes. El objetivo de esta investigación fue implementar un protocolo para el establecimiento, propagación y aclimatación de *L. graveolens* a partir de brotes apicales de planta madre.

El material vegetal se colectó en El Amparo, municipio de Parras de la Fuente Coahuila, en enero de 2018. Se llevó a invernadero por un mes, y posteriormente se inició el protocolo de siembra.

En la etapa de establecimiento, se emplearon brotes apicales y se realizó la técnica aséptica con alcohol al 70% por 1 min, seguido con la aplicación de hipoclorito de sodio al 20% por 20 min y posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se sembraron en medio basal Murashige y Skooge (MS), haciendo una evaluación cada 15 días del porcentaje de explantes contaminados, muertos y sanos; se obtuvo una recuperación del 67.47% de explantes asépticos.

En la siguiente etapa de multiplicación, se llevó a cabo en dos tipos de explantes: yemas y segmento nodales en medio basal MS, adicionando 6-Benzilaminopurina (6-BAP) y Kinetina (Kin) a las concentraciones de 0.0, 1.0, 2.0 y 3.0 mg L⁻¹; se logró la mayor formación de brotes con la adición de 6-BAP a 3 mg L⁻¹ con 40.35 brotes por explante; mientras que en la variable longitud de brote, los explantes de segmento nodal en los tratamientos sin reguladores, resultaron con la mayor altura de brotes hasta 2.6 cm.

En la etapa de enraizamiento se logró la formación de raíces con y sin reguladores auxínicos (AIA, AIB) a concentraciones de 0.1, 0.3, y 0.5 mg L⁻¹; donde AIB a 0.5 mg

L⁻¹ produjo mayor longitud de raíz con 4.71 cm. En la última etapa de aclimatación se llevaron las plantas a dos fotoperiodos (16 y 24 h) con y sin la adición de micorrizas; encontrando que el fotoperiodo largo de 24h más la adición de *Glomus intraradicens* resultó con un efecto positivo al 86.11% de sobrevivencia.

Palabras clave: Orégano, micropropagación, *Glomus intraradicens*, fotoperiodo.

ABSTRACT

Mexican oregano (*Lippia graveolens*) is an herbaceous plant belonging to the Verbenaceae family. It has a wide distribution in Mexico and with economic, social and ecological value. Mexico is the second largest exporter worldwide. It is collected from wild populations in the rainy season, a situation that leads to overexploitation of the resource, with a decrease in natural populations. Commercial cultivation is still little spread in the country, so it is necessary to generate information to establish efficient technologies. The objective of this research was to describe a protocol for the establishment, propagation and acclimatization of *L. graveolens* from apical shoots the mother plant.

The plant material was collected in El Amparo, municipality of Parras de la Fuente Coahuila, in January 2018. It was taken to the greenhouse for a month, and then the sowing protocol was started.

In the establishment stage, apical shoots were used and the aseptic technique was performed with 70% alcohol for 1 min, followed by the application of 20% sodium hypochlorite for 20 min and subsequently rinsed three times with sterile distilled water. Murashige and Skoog (MS) were sown in basal medium, making an evaluation every 15 days of the percentage of contaminated, dead and healthy explants; were recovered 67.47% of aseptic explants.

In the next stage of multiplication, it was carried out in two types of explants: buds and nodal segment in basal MS medium, adding 6-Benzylaminopurine (6-BAP) and Kinetin (Kin) at concentrations of 0.0, 1.0, 2.0 and 3.0 mg L⁻¹; The highest shoot formation was achieved with the addition of 6-BAP at 3 mg L⁻¹ with 40.35 shoots per explant; while in the variable shoot length, the nodal segment explants in the treatments without regulators, resulted with the highest shoot height up to 2.6 cm.

In the rooting stage, the formation of roots was achieved with and without auxin regulators (AIA, AIB) at concentrations of 0.1, 0.3, and 0.5 mg L⁻¹; where IBA at 0.5 mg L⁻¹ produced greater root length with 4.71 cm. In the last acclimatization stage, the

plants were taken to two photoperiods (16 and 24 h) with and without the addition of mycorrhizae; finding that the long photoperiod of 24h plus the addition of *Glomus intraradicens* resulted in a positive effect at 86.11% survival.

Key word: oregano, micropropagation, *Glomus intraradicens*, photoperiod.

INTRODUCCIÓN

Con el nombre genérico del orégano se conoce a diversas especies de plantas pertenecientes a las siguientes familias botánicas: Compuestas, Labiadas, Leguminosas y Verbenáceas, abarcando 170 géneros y 3, 000 especies (Silva *et al.*, 2009). En México se encuentran representadas alrededor de 40 especies herbáceas, siendo algunas de ellas endémicas, las cuales se distribuyen en varios estados de la República Mexicana (Silva, 2005).

A nivel mundial la producción global del orégano se estima alrededor de 15,000 toneladas, siendo Turquía el principal productor seguido de México (García *et al.*, 2012). Los principales tipos de orégano de importancia económica son: Mexicano (*Lippia berlanderi* Schauer; *Lippia graveolens* Kunth), Turco (*Origanum onites* L.), Griego (*Origanum vulgare*), Español (*Coridohymus capitatus* L), (Soto *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2009).

Nuestro país es uno de los productores forestales no maderables de mayor importancia económica, ocupa un lugar importante entre las especies aromáticas debido a su uso gastronómico, como condimento en salsas y comidas, también destaca por sus propiedades medicinales de importancia industrial y farmacéutica, el aceite extraído (después de un proceso de desecación de las hojas) se utiliza en la industria cosmética y alimenticia, además, posee propiedades antibacteriales, antifúngicas, antiparasitarias, antimicrobianas y antioxidantes (Rivero-Cruz *et al.*, 2011).

La distribución silvestre del orégano mexicano se encuentra fundamentalmente en las regiones áridas y semiáridas de los estados de Durango, Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Guanajuato, Jalisco, Querétaro, San Luis Potosí, Puebla, Hidalgo, Oaxaca, Nuevo León, Sonora, México, Yucatán y Zacatecas. Siendo Coahuila, Chihuahua y Tamaulipas los que comercializan el 50% o más del orégano total del país (Silva, 2005).

En el estado de Coahuila se practica principalmente la recolección de hojas de orégano para su venta como condimento después del periodo de lluvias y finaliza con la llegada de las primeras heladas (Berlanga *et al.*, 2005; aporta el 11% de la producción de orégano a nivel nacional (Rionda *et al.*, 2006). La recolección de orégano es dada en los municipios de Parras de la Fuente, General Cepeda, Ramos Arizpe, San Pedro, Torreón, Sierra Mojada y Viesca, donde el 90% de la producción de hoja seca se destina al mercado de exportación; obteniendo la mayor producción en Parras de la Fuente, General Cepeda y Ramos Arizpe generando anualmente un promedio de 700 t de hoja seca (Villavicencio *et al.*, 2010). Las personas que se dedican a esta actividad viven en extrema pobreza y la recolección es su única fuente de ingresos; esta actividad la realizan los miembros de la familia y el producto es vendido a un intermediario por lo tanto es necesario el manejo adecuado de las poblaciones naturales de orégano, pues su deterioro implica alteraciones dentro del ecosistema natural y problemas socioeconómicos (Maldonado, 1998; García *et al.*, 2012).

El orégano es una especie que tiene demanda durante todo el año, por lo que se requiere de un abastecimiento continuo, actualmente, los mercados nacional e internacional requieren de esta materia prima; sin embargo, la falta de tecnologías para el establecimiento y manejo de plantaciones comerciales es una limitante para aumentar los volúmenes de producción e impulsar esta cadena productiva en el sector primario (SAGARPA, 2013).

La siembra de *L. graveolens* en campo de forma directa tiene poco éxito, debido al tamaño de la semilla que es muy pequeña, al bajo porcentaje de germinación y la fragilidad de la plántula para soportar las prácticas de cultivo, esto trae como consecuencia una baja densidad de población, lo cual se refleja en una cosecha reducida (Martínez-Hernández *et al.*, 2017).

1. Justificación

El aprovechamiento indiscriminado del recurso ha traído como resultado la sobreexplotación, además, la falta de información y tecnología para su cultivo, deriva, en una pérdida constante de la diversidad genética de las poblaciones.

Por lo cual la presente investigación pretende aportar un protocolo para su propagación con herramientas biotecnológicas, como es el cultivo de tejidos vegetales, lo que conlleva a facilitar un abasto de materia prima para su cultivo en campo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Desarrollar un protocolo para establecimiento *in vitro* de *Lippia graveolens* y su Micropropagación a partir de dos tipos de explante (yemas apicales y segmentos nodales).

2.2 Objetivos específicos

- Establecer explantes axénicos.
- Evaluar el efecto de reguladores de crecimiento en la generación de brotes.
- Evaluar el efecto de auxinas en el enraizamiento de brotes.
- Evaluar la aclimatación de plántulas bajo condiciones de invernadero.

3. Hipótesis

- El establecimiento de un protocolo de propagación *in vitro* permitirá la reproducción asexual de *Lippia graveolens* Kunth.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Generalidades

El género *Lippia* pertenece a la familia *Verbenaceae*, incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, matorrales y arboles pequeños. Bajo el nombre de *Lippia graveolens* se reconoce a un amplio grupo de plantas, ha sido mencionada como una especie variable y polimórfica formada por poblaciones con características morfológicas, fenológicas y fitoquímicas distintas (Soto *et al.*, 2007).

El orégano se considera como un producto duradero de consumo final, ya que una vez deshidratado conserva sus propiedades y no sufre descomposición, en México se usa para condimentar alimentos y como medicina popular (Vázquez, 2012).

Sus aplicaciones son múltiples:

Condimento alimenticio: Es usado en forma seca y fresca, se destina a la elaboración de productos alimenticios, principalmente como condimento, potenciador de sabor, ablandador, conservador y aromatizantes, entre otros. Sus hojas son un condimento ideal para platillos sobre todo en los tradicionales a los que les da un sabor y aroma exquisito, como fijador de olores basta una ramita de orégano en una botella de aceite o vinagre y transmite su fragancia, también se usa en productos horneados (como pizzas y panes) (Argueta, 1994; Farías *et al.*, 2010; CONAFOR, 2009).

Medicina tradicional: Desde tiempos antiguos la medicina tradicional ha usado diversas especies del género *Lippia* como analgésicos, antiinflamatorios, antipiréticos, contra diarrea, vómito, indigestión y disentería (Monroy & Castillo, 2000), también se ha usado como antiasmático (control del asma), antiespasmódico (alivio de cólicos), antitusígeno (control de la tos y del asma), antihelmíntico (contra lombrices, en mezcla con yerbabuena y tomillo), para gripas pasmadas, antiinfeccioso (acción específicamente contra *Staphylococcus aureus*), antimicrobiano en infecciones cutáneas, gástricas y respiratorias (Hernández *et al.*, 2009).

Es usado en aromaterapia y también como emenagogo (regulador de la menstruación), para dolores musculares y para la eliminación de gases (carminativo) (Cutter, 2000). Es útil para curar trastornos de los nervios, diuréticos y anoxias, retención de la orina y obstrucción de las vías respiratorias (Lewis, 1990). Se emplea como tónico expectorante, antihistamínico, antiparasitario, antirreumático, dermatitis, desinfectante y cicatrizante (Lewis, 1990; Rivero-Cruz *et al.*, 2011) en forma de infusiones, para tos, cólicos, padecimientos de los riñones y fiebre (Vázquez, 2012), también se emplea en el tratamiento de desórdenes hepáticos, repelente, antimalaria, tratamiento contra sífilis, gonorrea y diabetes (Arcila-Lozano *et al.*, 2004) estas propiedades son atribuidas a la presencia de carvacrol (5-isopropil-2- metilfenol) y de timol (5-metil-2-isopropilfenol) dos compuestos encontrados en sus aceite esenciales (Burt, 2004; Méndez, 2000).

Su aceite esencial es usado como medio de enjuague para las curaciones de los dientes (Silva-Vázquez, 2012).

Su consumo durante el embarazo no debe ser excesivo, pues se le han atribuido propiedades abortivas (Ávila-Sosa, 2001).

Industrial: Debido a la gran cantidad de ácidos fenólicos y flavonoides que tiene, es útil en la industria de la preservación de alimentos y es posible evitar posibles efectos adversos sobre la salud por ser un compuesto natural (Kulisic *et al.*, 2004). En la industria refresquera y licorera, el orégano se utiliza como fijador y saborizante, también es utilizado en la fabricación de aceite para aeronáutica, limpieza de piezas automotrices y en la elaboración de veladoras (Orona, 2017). Es muy usado en perfumería por su gran contenido de aceites esenciales los que resaltan y fijan sus aromas (Corella-Bernal *et al.*, 2013).

El timol y carvacrol que se obtiene de los aceites esenciales de orégano, se emplea en la industria alimenticia como inhibidor de crecimiento de hongos contaminantes y bacterias patógenas relacionadas con los alimentos (*E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *Salmonella sp.*), en alimentos procesados se emplea como antioxidante para la elaboración de embutidos su aplicación mejora la

refrigeración conservación de la carne de res, pollo y pavo a temperatura ambiente y en (Morales, 2005; De la Fuente, 2006; Nuyen, 2007).

Cosmético: El extracto de aceite de orégano se usa como esencia y fijador de olor de perfumes de marcas comerciales reconocidas, así como en la manufactura de jabones y productos de aromaterapia (SEMARNAT, 2015).

Agroindustrial: La especie tiene un gran potencial fungicida e insecticida en granos almacenados de trigo por lo que puede ser utilizada en lugar de los agroquímicos y así reducir el impacto ambiental. El aceite esencial de orégano se aplica en la producción de pollos de engorda debido a que mejora las características productivas de la canal y su carne, y la salud de los animales (Roofchae et al., 2011; Méndez-Zamora et al., 2015).

Los extractos aromáticos han sido examinados como una alternativa en la estrategia alimentaria del futuro, los aceites esenciales son productos naturales bioactivos empleados en la alimentación animal para mejorar el desempeño productivo e influir en el crecimiento y la salud de los animales.

1.1.1 Taxonomía y descripción botánica

L. graveolens fue descrita por el botánico alemán Carl Segismundo *Kunth* en 1818, a partir de muestras procedentes de Campeche. Según el Catalogue of Life (2013), tiene la siguiente clasificación botánica:

Reino: *Plantae*

Filo: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Verbenaceae*

Género: *Lippia*

Especie: *graveolens*

Autoridad: *Kunth*

Sinónimos: *L. berlandieri Schauer*.

Nombres comunes: Mejorana, orégano, salvia, romerillo de monte.

L. graveolens es un arbusto perenne, caducifolio (que tira sus hojas al no haber humedad en el suelo), delgado, muy ramificado y aromático, tiene un crecimiento relativamente rápido puede alcanzar hasta tres metros de altura y un metro de diámetro de cobertura foliar, esto dependiendo de las condiciones específicas de desarrollo y de la edad de la planta y un ciclo de vida corto de entre 5 y 10 años (Martínez 1994; Moreno, 2010).

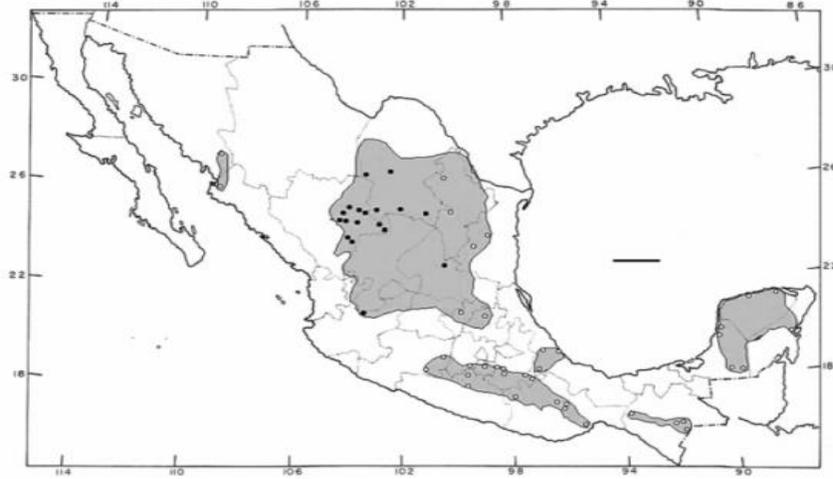
1.1.2 Distribución geográfica

En México, *L. graveolens* se establece a lo largo del litoral del Golfo, la vertiente del Pacífico, en la península de Yucatán, en las depresiones y valles interiores (Balsas, Tehuacán, Depresión de Chiapas, Istmo de Tehuantepec), en las zonas áridas Tamaulipeca e Hidalguense y en el Desierto Chihuahuense (García-Pérez, *et al.*, 2012).

Se distribuye en al menos 24 entidades, principalmente en las regiones áridas y semiáridas de los estados del País (Silva, 2005). Se enlista las siguientes localidades registradas en México: Veracruz, Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Chiapas, Guerrero, Puebla, Morelos, Edo. de México, Michoacán, Oaxaca, Sinaloa, Sonora; el tipo *berlandieri* en Hidalgo, Tamaulipas, Nuevo León, Querétaro, Guanajuato, San Luis Potosí; las poblaciones muy aromáticas del Desierto Chihuahuense y del suroeste del Altiplano en Jalisco-Zacatecas, Jalisco, Durango, Coahuila y San Luis Potosí, principalmente en pequeñas serranías por arriba de los 1350 m de altitud (Figura 1) (García-Pérez *et al.*, 2012).

Cabe destacar que Chihuahua, Durango, Tamaulipas y Coahuila, donde se localizan las áreas productoras de orégano comercial concentran 50% de los permisos de aprovechamiento (Villavicencio *et al.*, 2007).

Figura 1. Distribución geográfica del orégano mexicano



Fuente: SEMARNAT, 2005

1.1.3 Requerimientos ambientales

L. graveolens es una especie variable y polimórfica, está formada por poblaciones con características morfológicas, fenológicas y fitoquímicos distintas.

- Altitud: Se distribuye en zonas de altitud que van de 900 y 2,500 msnm hasta 3,000 msnm., (Sánchez-Ramos *et al.*, 2011).
- Precipitación: Requiere precipitaciones mayores de 150 a 300 mm considerándose ésta como un factor importante para el desarrollo y buena producción de biomasa. (Maldonado, 1998; De Jesús, 2010).
- Temperatura: Se produce con buen potencial en rangos de temperatura entre 17 y 21°C con 28°C como máxima y 5°C como mínima. Es susceptible a bajas temperaturas, por lo que, al ocurrir las primeras heladas, termina su ciclo productivo. (Martínez y Lara, 2003; De Jesús, 2010).
- Suelo: El orégano crece y se desarrolla en climas secos y semisecos, en terrenos de origen calizo, lomeríos rocosos, abanicos aluviales, riscos de difícil acceso, llanuras con alto contenido de arcilla, terrenos arenosos, terrenos de origen ígneo, valles, arroyos y mesas entre chaparrales y matorrales desérticos (Olhagaray *et al.*, 2005; Galván *et al.*, 2005). Se adapta a una amplia gama de suelos, siempre que no existan limitaciones graves de drenaje es importante

una buena nivelación del suelo, es altamente sensible a condiciones de humedad del suelo y no prospera en suelos salinos, prefiere suelos de textura ligera y media y en suelos someros, aunque produce más a medida que la profundidad aumenta (De Jesús, 2010).

1.1.4 Composición química

En los componentes químicos principales de *L. graveolens* se ha encontrado la presencia dominante de carvacrol y timol, los cuáles son los responsables del olor característico (Meléndez *et al.*, 2009).

En los aceites esenciales del orégano mexicano, se han identificado 33 compuestos, en su gran mayoría, los compuestos más abundantes son los monoterpenos y los ácidos fenólicos. Los monoterpenos son compuestos volátiles con olores intensamente pungentivos, principales responsables de las características sensoriales presentes en el orégano, dado que su concentración modifica el olor y el sabor de las hojas (Silva-Vázquez *et al.*, 2008).

Los principales compuestos fenólicos y flavonoides reportados para *Lippia graveolens* son: eriodictiol, galangina, naringenina, quercetina, taxifolina, apigenol, luteolina, luteolol, kampferol, diosmetol, naringenina, pinocembrina, lapachenol e icterogenina (Hutchings *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 2003; Arcila-Lozano *et al.*, 2004; García-Pérez, *et al.*, 2012).

1.1.5 Importancia económica y ecológica

El orégano es un recurso ampliamente utilizado a nivel nacional e internacional. En México es uno de los productos forestales no maderables de mayor importancia económica, pues satisface cerca de la mitad del consumo de esta especie en Estados Unidos (Orona *et al.*, 2017). México también aporta aproximadamente el 35% de la producción mundial, esta aceptación del orégano mexicano se explica por su calidad expresada en su gran poder saborizante (CONABIO, 2005). La Organización Mundial del Comercio (OMC) proyecta que la demanda insatisfecha de orégano en el mercado internacional será cada vez mayor (Gómez *et al.*, 2011).

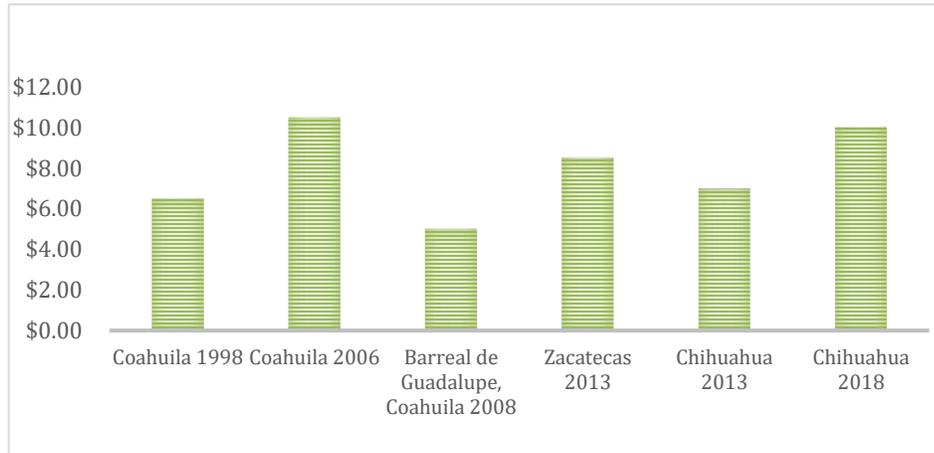
Los principales proveedores mundiales de orégano en orden de importancia son: Turquía, que supera las 10,000 toneladas anuales siendo el principal productor, México ocupa el segundo lugar en producción de orégano seco con alrededor de cuatro mil toneladas anuales (SAGARPA 2013), seguido de Grecia, Marruecos y Egipto (Villavicencio *et al.*, 2007; Koksai *et al.*, 2010) y los principales países productores en América Latina son: México, Brasil, Chile y Costa Rica (Sánchez, 2012).

La producción nacional de *L. graveolens* está sujeta al volumen irregular que se obtiene de poblaciones naturales y al efecto que tiene la oferta y demanda internacional del producto. *L. graveolens* alcanza una altura de 1.5 metros al tercer año, en nuestro país preferentemente se comercializa la hoja seca, se puede esperar una producción de 1,442 kg/turno de hoja seca en plantaciones de 10,000 plantas/ha (Martínez y Lara 2003).

Coahuila aporta el 11% de la producción de orégano a nivel nacional realizando el aprovechamiento desde hace más de 30 años, los principales municipios donde se realiza la recolección de orégano son: Parras de la Fuente, General Cepeda, Ramos Arizpe, San Pedro, Torreón, Sierra Mojada y Viesca (Villavicencio *et al.*, 2010).

El precio del orégano varía de acuerdo a la calidad del mismo, a su limpieza y algunos otros factores y obtiene un precio de acuerdo al estado o presentación en el mercado (Maldonado, 1998); algunas emisiones de precio en un lapso de 20 años se muestran en la siguiente Figura 2.

Figura 2. Precios de orégano a nivel nacional en diversos estados y años

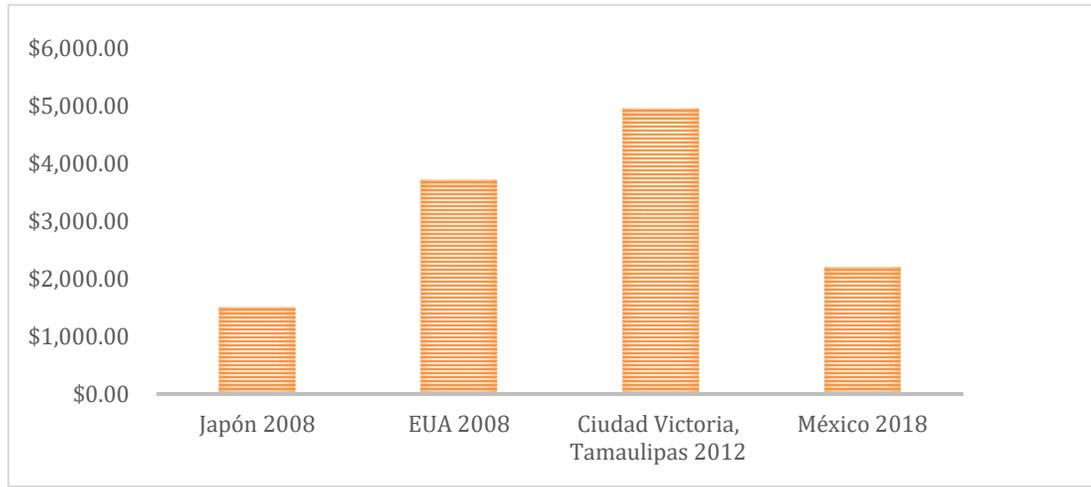


Fuente: Maldonado, 1998; Rionda, et al., 2006; Guerrero, 2008; CONAFOR, 2013; CONAFOR 2018.

No obstante, el valor económico de los aceites esenciales está directamente relacionado con su composición química, principalmente por su porcentaje de timol y carvacrol que confieren al orégano sus características, éstos se cotizan en altos precios en el mercado internacional (Aranda *et al.*, 2009); como se puede mostrar en la Figura 3, los precios alcanzados en los últimos 20 años de los aceites esenciales de manera nacional e internacional.

Silva-Vázquez (2012), menciona que el valor comercial del aceite esencial de orégano en los diferentes mercados internacionales se divisó en diferente precio: el norteamericano fue desde US\$100 hasta US\$130/litro; el europeo llegó hasta €130/kilo; mientras que el asiático fue hasta US\$180/litro (Figura 3).

Figura 3. Fluctuación de precios de aceite esencial de orégano a nivel nacional e internacional durante el periodo de 2004-2018



Fuente: Guerrero, 2008, Rojas-Pérez, et al., 2008, CONAFOR 2018.

La explotación del orégano se basa en la recolección del follaje de poblaciones silvestres, los efectos ecológicos de la cosecha del orégano pueden ser muy variados, su rango de impacto va desde el nivel de genes, individuos y poblaciones hasta comunidades y ecosistemas, los cuales pueden tener consecuencias importantes. Al respecto, es posible observar un deterioro en las poblaciones debido a que la época de recolección coincide con la época de floración que en consecuencia altera el desarrollo de frutos y semillas (Urrea, 2009), porque en el proceso, se incluye la inflorescencia y el fruto, y se afecta la dispersión natural de la especie (Caballero, 1985), además, solo un 11% de las flores produce frutos y éste contiene de 1 a 2 semillas, por otro lado, el porcentaje de germinación resulta bajo (Ocampo-Velázquez *et al.*, 2009; Llamas, 2015).

Ante este panorama, es necesario promover el aprovechamiento racional y sustentable de las poblaciones naturales de orégano mediante el manejo integral de los recursos forestales para poder impactar positivamente el nivel socioeconómico de las familias en las regiones donde se produce (Huerta, 1997, Orona *et al.*, 2017).

CAPÍTULO II PROPAGACION IN VITRO

La técnica de cultivo de tejidos es usada para el crecimiento de células, tejidos y órganos vegetales bajo condiciones axénicas (*in vitro*) para regenerar y propagar. Las diferentes técnicas de cultivo de tejidos vegetales, ofrecen ventajas sobre los diferentes métodos tradicionales de propagación (Iliev *et al.*, 2010).

La técnica de cultivo *in vitro* permite producir plantas durante todo el año, independientemente del factor climático (temperatura, luz y humedad) porque las condiciones de laboratorio en las que se realizan pueden ser controladas según la necesidad del cultivo (Calva, C. G., *et al.*, 2005; Segretin, M. E., 2006).

Para el proceso de la micropropagación *in vitro* se reconocen cuatro etapas: 1) Establecimiento del explante o del cultivo axénico; 2) Multiplicación *in vitro*; 3) Enraizamiento *in vitro*; y 3) Producción final de aclimatación en condiciones *ex vitro* (Iliev *et al.*, 2010).

Por otro lado, las especies del género *Lippia* han sido de gran interés para la comunidad científica y académica, debido a sus aplicaciones en diferentes actividades socioeconómicas; por esta razón se han desarrollado protocolos para la micropropagación de algunas especies pertenecientes a este género (Rodríguez, 2018).

Existe muy poca información en cuanto a las posibles herramientas de conservación del orégano mexicano (*L. graveolens*), especialmente en el área de micropropagación y el cultivo *in vitro*, ya que la mayoría de ellas se encuentra en estado silvestre, esto contrasta con lo que ocurre con el orégano europeo el cual ha sido ampliamente estudiado con la finalidad de domesticarlo, mejorarlo y proteger las especies (García-Pérez *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta el tamaño pequeño de las semillas del orégano se dificulta su manejo y, al tratarse de especies alógamas, la descendencia resulta genéticamente heterogénea característica no deseada en un cultivo comercial (Lenardis *et al.*, 2006).

2.1 Establecimiento del cultivo aséptico

En esta etapa se recibe la planta madre proveniente ya sea del invernadero o del campo abierto. Para iniciar con el proceso de cultivo *in vitro* es necesario desinfectar el material vegetativo extraído de la planta madre conocido como explante (ejemplos: yemas axilares, yemas apicales, segmentos nodales), la dosis de algún producto y tiempo de desinfección de acuerdo con el material vegetativo (Hudson, 1987).

Esta etapa tiene la finalidad de establecer cultivos viables y axénicos, su éxito está determinado por la calidad del explante a utilizar. Los principales procesos que controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes (Levitus *et al.*, 2010).

En el género *Lippia* y en plantas conocidas con el nombre de orégano se han establecido con éxito protocolos de asepsia en segmentos nodales y yemas apicales. En la especie *L. dulcis*, Urrea *et al.*, (2009) aplicaron un protocolo de desinfección en dos tipos de explantes (yemas apicales y nudos), haciendo un lavado inicial con jabón quirúrgico y abundante agua de grifo, luego se sumergieron en etanol al 70% por 10 seg y finalmente en dos concentraciones de hipoclorito de sodio (CaOCl) por 10 min, al 1,5% en yemas apicales y 2,0% en los segmentos nodales, y finalmente haciendo tres enjuagues con agua destilada estéril (ADE) antes de la siembra *in vitro*. Se obtuvieron bajos porcentajes de contaminación (20-30%).

En otra especie como *L. integrifolia*, se utilizaron segmentos de tallos con 10 a 15 nudos, desinfectados superficialmente por inmersión en etanol 70°GL por 2 min, después se sumergieron en CaOCl al 20% y en combinación con cloruro de benzalconio al 0.1 % por 30 min, seguido de un lavado con ADE cuatro veces, teniendo menor porcentaje de contaminación (8%) utilizando la combinación hipoclorito de sodio con cloruro de benzalconio (Passera & Ambrosetti, 1997). En otro estudio, se utilizaron segmentos nodales y ápices, haciendo una inmersión en etanol al 70% (1 min), seguido de una solución de CaOCl comercial al 10% (5,5% cloro activo) por 10 min y Tween 80 al 0,01%; haciendo enseguida tres lavados con ADE;

se logró recuperar el 86% de los explantes tratados; la contaminación por hongos y/o bacterias fue menor del 10% (Iannicelli *et al.*, 2016).

En la especie *Poliomintha longiflora*, los explantes se lavaron con agua y detergente por 5 min, luego se sumergieron en alcohol al 80% por 30 seg y posteriormente en una solución de Cloralex al 5, 10 y 15 % más una gota de tween 20, por cada 100 ml de solución por 15 min. Y finalmente se enjuagaron tres veces con agua bidestilada estéril. Logrando asepsia al 100%, no tuvo contaminación en las concentraciones de cloro empleadas (Carriles-Odriozola, 1994).

En la especie *L. gracilis*, los brotes jóvenes obtenidos de esquejes, se lavaron en agua corriente por 30 min. Durante este período se retiraron las hojas y los brotes se cortaron en segmentos, se lavaron con detergente comercial (10 gotas L⁻¹) por 10 min y se enjuagaron tres veces con ADE. Los segmentos se trataron asépticamente con alcohol al 70% durante 1 minuto, CaOCl al 3% por 10 min y realizaron tres lavados consecutivos con ADE. Posteriormente se seccionaron en segmentos nodales, conservando un brote por segmento y se colocaron en tubos de ensayo con medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), 1962 (Marinho *et al.*, 2011).

Capote *et al.*, (1999) utilizaron explantes yemas apicales y segmentos nodales de brotes jóvenes de plantas adultas de *L. micromera*, se lavaron con detergente comercial y enjuagaron con agua corriente varias veces. Para la desinfección, se sumergieron en una solución de lejía comercial (50 g/L de cloro activo) al 2% por 15 min, posteriormente se enjuagaron con ADE tres veces. Una vez desinfectados, se seccionaron las yemas apicales y los segmentos nodales y se sembraron en un medio MS.

En la especie de *L. graveolens* se realizó la germinación *in vitro* utilizando semillas como explante, las cuales fueron esterilizadas superficialmente con etanol al 70% (v/v) durante 30 seg y posteriormente con una solución de cloro comercial al 50% (v/v) (CaOCl al 3%) durante 12 min, seguido de tres enjuagues con ADE. A los 6 y 9 días después de la siembra, se obtuvo una germinación del 58%; con una contaminación microbiana del 20% en las semillas; de plántulas germinadas *in vitro*

de 15 y 20 cm de altura, se se trasvasaron segmentos nodales para proliferar yemas axilares Castellano-Hernández, *et al.*, (2013).

Para el protocolo de establecimiento de *L. sidoides* se emplearon segmentos nodales, lavados en agua corriente por 30 min, desinfectados en alcohol etílico al 70% por 30 seg y en solución de NaOCl en cuatro concentraciones (0.2, 0.4, 0.6 y 0.8%) y cuatro tiempos de inmersión (8, 12, 16 y 20 min), teniendo cuatro repeticiones, cada repetición/frasco contuvo tres explantes. No se tuvieron diferencias en las concentraciones, mientras que a 12 y 16 min de inmersión se obtuvo menor porcentaje de contaminación de 33.7 a 50.6% (Da Costa *et al.*, 2007).

El protocolo de asepsia en la especie *L. turbinata* se inició a partir de la germinación *in vitro* de semillas, esterilizadas con etanol 70% durante 5 min, luego con NaOCl al 10 % durante 5 min, con lavados intermedios de ADE. Las semillas se sembraron en tubos de ensayo con 10 ml de medio de cultivo MS, diluido a la mitad de los minerales y suplementado con 30 g/L de sacarosa, agar 8 g/L, a pH 5,8 (Ortiz, *et al.*, 2007).

En la especie *L. origanoides*, Ramírez-Moreno, (2018) se utilizaron semillas y yemas (apicales y axilares), aplicando 16 tratamientos de desinfección para yemas apicales y axilares, en diferentes tiempos de inmersión en ADE con tres gotas de jabón alcalino, etanol al 70% y en NaOCl (0.5%, 1% y 1.5%) más tres gotas de jabón alcalino, después se aplicaron cuatro lavados con agua destilada. En el medio de cultivo se aplicaron antioxidantes y adsorbentes en distintas concentraciones.

Otro estudio, en *L. graveolens* se utilizaron yemas apicales y axilares como explantes, donde ningún tratamiento fue efectivo para evitar el oscurecimiento de los explantes, presentando un 90% de oxidación y un 10% de los explantes con tejido libre de oxidación y contaminación, teniendo un crecimiento foliar sin un desarrollo caulinar. Mientras que el explante semillas obtuvo el 65% de germinación y 10% de contaminación (Castellanos-Hernández *et al.*, 2013).

2.2. Etapa de Multiplicación

En esta etapa, los reguladores del crecimiento como las citoquininas se incorporan al medio de cultivo para estimular la división celular y controlar el proceso de morfogénesis, pues favorecen la formación de yemas axilares por la ruptura de la dominancia apical (Van Staden *et al.*, 2007). Una de las citoquininas más empleada en el cultivo *in vitro* es la 6-Bencilaminopurina (6-BAP) (De Feria *et al.*, 2009).

En especies del género *Lippia* se han encontrado diferentes efectos en la adición de citoquininas; por ejemplo, en *Lippia micromera*, variedad *Helleri*, en la etapa de multiplicación ocurrió con mejor resultado usando medio MS suplementado con 0.1 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) + 2.0 mg L⁻¹ BAP (Capote *et al.*, 1999). En la propagación *in vitro* en la especie *L. filifolia*, se logró un mayor promedio de brotes por explante (27 brotes) empleando segmentos nodales en un medio MS suplementado con 4.5 µM 6-BAP y 54 nM de ácido α-naftaleneacético (Peixoto *et al.*, 2006).

Rojas-Pérez *et al.*, (2008) obtuvieron dos brotes por explante en segmentos nodales de *L. berlanderi* con la combinación de los reguladores BAP y ANA a una concentración hormonal de 1 mg L⁻¹.

Para la multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de plántulas de *L. alba*, el medio MS más BAP a concentraciones (0; 0,5; 1.0 y 1.5 mg L⁻¹) y 30 g L⁻¹ de sacarosa, logró la proliferación de brotes al aumentar de concentración de citoquinas resultando hasta el mayor número de brotes a 1.5 mg L⁻¹ de BAP (Asmar *et al.*, 2012).

En la especie *L. integrifolia* se logró obtener mayor número de (15.6 ± 8.2), a añadir 2.2 µM de bencilaminopurina (BAP) al medio MS. (Iannicelli *et al.*, 2016).

Ramírez-Moreno (2018), a partir de segmentos nodales como explante provenientes de semilla de la especie *L. origanoides*, en la etapa de multiplicación sembró en medio MS más BAP a distintas concentraciones (0.5, 1, 1.5 mg L⁻¹) combinado con ANA (0.1 mg L⁻¹) y AG₃ (0.5, 1, 1.5 mg L⁻¹) y 3% de p/v de sacarosa. Obteniendo resultados favorables en el número de brotes (4.3±0.82) a una concentración de 1.5 mg L⁻¹ de BAP; además de presentar elongaciones desde 1.4

cm a 5.8 cm en la combinación de 1.5 mg L⁻¹ de BA, 0.1 mg L⁻¹ de ANA y 0.5 mg/L de AG₃.

En otra especie como *L. rotundifolia* se cultivaron segmentos nodales (1,0 cm) en medio MS suplementado con: BAP (0.0, 2.22, 6.66, 11.10 y 15.54 µM); más ANA (0.0, 2.68 µM) y TDZ (0.0, 2.27, 4.54, 6.81 y 9.08 µM) combinado con NAA (0,0 0.68 y 5.36 µM); resultando la combinación de 15.54 µM BAP + 2.68 µM NAA, con mayor número de brotes del explante (11.6 brotes); y la combinación de 6.81 µM TDZ con 2.68 µM ANA resultó hasta con 20 explantes (De Hsie *et al.*, 2019).

Castellanos-Hernández *et al.* (2013), cultivaron explantes nodales de *L. graveolens* en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP, NAA y la combinación de ambos. Resultando las concentraciones de BAP con diferencias significativas en la activación de brotes axilares hasta del 83% de los brotes, que en comparación del testigo (sin regulador de crecimiento) solo obtuvo 17% iniciaron brotes. La concentración de 1.5 mg L⁻¹ BAP obtuvo el número de brotes por explante (6.1±4.8).

2.2.3 Etapa de enraizamiento

El enraizamiento puede ser realizado en condiciones de cultivo *in vitro* o *ex vitro* (Bueno, 2014). Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento, o que solo contenga hormonas de tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea (Castillo, 2004).

En la micropropagación *in vitro* se incluyen las auxinas, como los ácidos indol-3-acético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) que inducen en los brotes de gran número de especies la formación de raíces adventicias, así como mayor tamaño de los brotes mediante el crecimiento de las células (Soto *et al.*, 2006).

En la etapa de enraizamiento en el género *Lippia* se han obtenido resultados favorables empleando diferentes tipos de reguladores; como es la especie *L. turbinata* que al adicionar en el medio basal 40 g/L de sacarosa y 1.0 mg/L de AIB se obtuvo 86% de eficiencia (Ortiz, *et al.*, 2007).

Brotos de altura 2 cm de la especie *L. integrifolia*, se transfirieron a medio MS a una disolución de 0.5 X suplementado con AIA, obteniendo hasta el 80% de las plántulas un desarrollo de raíces adventicias con 0.28 uM de AIA; logrando transferir estas plántulas, enraizadas y elongadas a condiciones *ex vitro* para su aclimatación (Ianicelli, 2016).

En otro estudio, la especie *L. rotundifolia* obtuvo 100% de enraizamiento al emplear medio MS suplementado con 0.5 mg L⁻¹ de BAP y en medio MS suplementado con ANA al 0,5 y 1.0 mg L⁻¹ (De Hsie, 2017).

Mientras que en la especie *L. origanoides* al adicionar una concentración completa del medio MS suplementado con 3% de p/v de sacarosa, concentraciones de BAP al 0.5, 1, 1.5 mg/L, combinado con ANA al 0.1 mg L⁻¹) y AG₃ al 0.5, 1, 1.5 mg L⁻¹; se tuvo un mayor desarrollo de la longitud de raíz (8.6±3.13 cm) en un medio MS suplementado con 0.5 mg L⁻¹ de AG₃, así como con el suplemento de 1.5 mg L⁻¹ de BA (Ramírez-Moreno, 2018).

2.3. Etapa de aclimatación

La aclimatación es la última etapa de la micropropagación y es de alta vulnerabilidad para el material vegetal. El ambiente *in vitro* está representado por baja intensidad lumínica (1200-3000 lux), una temperatura de 25 ± 2°C, alta humedad relativa, donde dichas condiciones llegar a alterar la morfología y fisiología de la planta; por ejemplo, los estomas en mayor densidad no funcionales, cutícula delgada y un sistema radical débil (Chandra *et al.*, 2010). Además, durante esta etapa si se llegar a modificar de manera repentina las condiciones ambientales como incremento de la intensidad lumínica (4000-12000lux), el rango de temperatura (26-36°C) o disminución de la humedad relativa, se puede provocar un estrés tanto biótico como abiótico en

las plántulas; por lo que es necesario un control gradual de las condiciones para lograr la mayor cantidad de plantas vivas al término de esta etapa.

Así, dentro de las estrategias para lograr la sobrevivencia de las plantas a una aclimatación, se han diseñado nuevas técnicas que favorecen el desarrollo del material vegetal. Una de estas estrategias está relacionada con la modificación del fotoperiodo.

El fotoperiodo regula diferentes procesos morfofisiológicos en las plantas, impacta directamente en la fotosíntesis y en consecuencia con el metabolismo primario y secundario (Fortini *et al.*, 2020). Además de afectar el desarrollo de la planta, coordina las respuestas adaptativas a los cambios ambientales (Serrano-Bueno *et al.*, 2017).

De Castro y colaboradores (2019) mostraron que la aplicación de 4, 8, 16 y 24 h de luz en *L. alba* en condiciones *in vitro*, presentó alta plasticidad fisiológica. En un periodo de luz continua se incrementó el crecimiento, organización anatómica del mesófilo, tallo, raíces, hubo mayor tasa fotosintética, pigmentos y síntesis de proteínas.

Por otro lado, la aplicación de la biotización, induce resistencia a las plántulas al ser inoculadas con bacterias u hongos benéficos. La inoculación de plántulas axénicas como hongos micorrízicos, la protege de infestación por saprófitos. Además, favorece el crecimiento, la captación de nutrientes, la resistencia a enfermedades, así mismo incrementa la productividad, modifica el pH del suelo, provee a la raíz de aireación y protección contra el estrés de agua (Chandra *et al.*, 2010).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1 Ubicación del experimento

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitomejoramiento ubicado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Buenavista, Saltillo, Coahuila.

3.2 Material Vegetal

La planta madre de *L. graveolens* Kunth se colectó de la comunidad del Amparo, Municipio de Parras, Coahuila en enero de 2018. El sitio se encuentra comprendido entre las coordenadas 25°26'48.80 N 102° 35' 35.35" O con una elevación de 1186 m.

3.3 Micropropagación de *L. graveolens*

3.3.1 Establecimiento del cultivo aséptico

Se tomaron como explantes segmentos nodales de los brotes jóvenes de la planta (Figura 4). Los explantes se desinfectaron de forma superficial durante 30 minutos en un contenedor con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10% (v/v) en la cual se añadieron cuatro gotas de detergente comercial; se enjuagaron con agua corriente y posteriormente se llevaron a la campana de flujo laminar en condiciones asépticas.

**Figura 4. Material vegetal de orégano obtenido para su propagación.
Planta de orégano B) Expantes (yema apical y segmento nodal).**



Fuente: Planta extraído de la comunidad del Amparo, Municipio de Parras, Coahuila en enero de 2018.

3.3.1.1. Protocolo de asepsia

En la campana de flujo laminar se procedió a realizar el protocolo de asepsia que consistió en sumergir los segmentos nodales en alcohol al 70% durante un minuto, luego se enjuagaron con agua destilada estéril (ADE) por un minuto. En seguida, los segmentos nodales se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 20% (v/v) durante 20 min, después de ese tiempo los segmentos nodales fueron enjuagados tres veces por un minuto con agua destilada estéril.

3.3.1.2 Siembra del explante

Los segmentos nodales se sembraron en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962), sin reguladores, suplementado con 0.1 mg L⁻¹ de myo-inositol, 0.001 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0.001 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl, 0.001 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 0.001 mg L⁻¹ de riboflavina, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 4 g L⁻¹ de phytigel a un pH de 5.7.

Se colocaron 20 ml de medio de cultivo en frascos tipo gerber. Una vez solidificado el medio se sembraron cuatro explantes por frasco dentro de la campana de flujo laminar. Se llevaron al cuarto de incubación a una temperatura de 25°C ± 2°C,

con un fotoperiodo de 18 h luz. Se realizó una evaluación del porcentaje de explantes contaminados, necrosados y axénicos, cada siete días a completar tres muestreos.

Los explantes se trasvasaron a medio nuevo cada 21 días y permanecieron en esta etapa por 60 días.

3.3.2 Etapa de propagación

De las plántulas generadas en la fase de establecimiento del cultivo se tomaron los brotes axilares generados en el establecimiento, de estos se obtuvieron segmentos nodales y brotes con cuatro hojas como explantes, con la finalidad de llevar a cabo la micropropagación. El medio utilizado para esta etapa fue MS adicionando 250 mg L⁻¹ de myo-inositol, 0.001 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0.001 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl, 0.001 g L⁻¹ de tiamina-HCl, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 4 g L⁻¹ de phytigel, regulando a un pH de 5.7; se esterilizó el medio en una autoclave a 121°C por 20 min. Los tratamientos fueron el resultado de la combinación de tipo de explante, tipo de reguladores (BAP y Kinetina) y concentraciones (0.0, 1.0, 2.0 y 3.0 mg L⁻¹) conformándose un total de 16 tratamientos (Tabla 1), cada uno con 5 repeticiones con cuatro explantes por frasco. Una vez realizada la siembra, se colocaron los frascos en el cuarto de incubación a 25 ± 1°C de temperatura, con un fotoperiodo de 18 h de luz. Cada cuatro semanas, se procedió a renovar el medio de cultivo; y a las ocho semanas de desarrollo se efectuó la evaluación del número de brotes. Las variables evaluadas fueron: número de brotes por explante y altura de brotes por explante (cm).

Se realizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial (2 x 2 x 4) donde los factores fueron: a) tipo de explantes: segmento nodal (SN) y yema apical (yema); b) reguladores: 6-Bencilaminopurina (BAP) y Kinetina (Kin); c) concentraciones (0.0, 1.0, 2.0 y 3 mg L⁻¹). Los resultados se analizaron por InfoStat versión 2011, y comparación de medias múltiple de Tukey (≤0.05).

Cuadro 1. Tratamientos y concentraciones de reguladores de crecimiento utilizados en la etapa de multiplicación in vitro.

Tratamiento	Tipo de explante	Regulador	Concentración
T1	Segmento nodal	BAP	0.0 mg L ⁻¹
T2	Segmento nodal	BAP	1.0 mg L ⁻¹
T3	Segmento nodal	BAP	2.0 mg L ⁻¹
T4	Segmento nodal	BAP	3.0 mg L ⁻¹
T5	Segmento nodal	Kin	0.0 mg L ⁻¹
T6	Segmento nodal	Kin	1.0 mg L ⁻¹
T7	Segmento nodal	Kin	2.0 mg L ⁻¹
T8	Segmento nodal	Kin	3.0 mg L ⁻¹
T9	Yema Apical	BAP	0.0 mg L ⁻¹
T10	Yema Apical	BAP	1.0 mg L ⁻¹
T11	Yema Apical	BAP	2.0 mg L ⁻¹
T12	Yema Apical	BAP	3.0 mg L ⁻¹
T13	Yema Apical	Kin	0.0 mg L ⁻¹
T14	Yema Apical	Kin	1.0 mg L ⁻¹
T15	Yema Apical	Kin	2.0 mg L ⁻¹
T16	Yema Apical	Kin	3.0 mg L ⁻¹

3.3.3 Etapa de enraizamiento

Una vez obtenido el material indispensable y de tamaño deseado de la multiplicación, se consideraron yemas axilares de 2.5 cm de longitud para la etapa de enraizamiento, donde fueron sembrados en frascos tipo gerber con 20 ml de medio MS con dos vitaminas (tiamina y myo inositol) y cisteína (50 mg L⁻¹); así mismo, se adicionó como reguladores el Ácido Indol Acético (AIA) y el Ácido Indol butírico (AIB) a concentraciones de 0.0, 0.1 0.3, 0.5 mg L⁻¹ y ajustado a un pH de 5.7. El medio se esterilizó en la autoclave por 20 min a 1.2 atmosferas de presión. Teniendo ocho tratamientos en total, como se describen en el Cuadro 2. El material trasvasado se llevó al cuarto de incubación a una temperatura de 25±1°C con 16h luz y 8 de oscuridad a 2500 lux. Después de 30 días se procedió a la evaluación de la variable longitud de raíz.

Cuadro 2. Tratamientos para la etapa de enraizamiento.

Tratamiento	Regulador	Concentración
T1	AIB	0.0 mg L ⁻¹
T2	AIB	0.1 mg L ⁻¹
T3	AIB	0.3 mg L ⁻¹
T4	AIB	0.5 mg L ⁻¹
T5	AIA	0.0 mg L ⁻¹
T6	AIA	0.1 mg L ⁻¹
T7	AIA	0.3 mg L ⁻¹
T8	AIA	0.5 mg L ⁻¹

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con diseño completamente al azar, con arreglo factorial (2 x 4) donde los factores fueron: a) reguladores (AIA y AIB); b) concentraciones (0.0, 0.1, 0.3 y 0.5 mg L⁻¹) mediante el programa InfoStat versión 2011 y comparación de medias múltiple de Tukey(p≤0.05).

3.3.4 Etapa de aclimatación

En la aclimatación se seleccionaron plántulas de 3.0-3.5 cm de altura, se establecieron cinco tratamientos: 1) Testigo (con riegos); 2) Fotoperiodo de 16 h (2500 lux), 3) Fotoperiodo de 24 h (2500 lux) más micorrizas; 4) Fotoperiodo de 16 h (2500 lux) y 5) Fotoperiodo de 24 h (2500 lux) más micorrizas. Para el endurecimiento de las plántulas se abrieron los frascos una semana antes de su colocación en invernadero, posteriormente las plántulas fueron removidas del medio de cultivo y lavadas con agua destilada; a los tratamientos T3 y T5 se aplicó micorrizas (*Glomus intraradicens* 46 esporas gr⁻¹). Cada tratamiento consistió en 36 plántulas colocadas en charolas con sustrato peat-moss:perlita (1:1). El material vegetal se colocó en el invernadero, con equipo humidificador (Hidrofogger) aplicando 1.5 l h⁻¹ cada 4 horas y a los 30 días se evaluó el porcentaje de sobrevivencia.

Se realizó un Análisis de varianza y prueba de medias de Tukey (p≤0.05) con el software InfoStat versión 2011.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Establecimiento de cultivo aséptico

En el Cuadro 3, se muestran los resultados de la etapa de establecimiento del cultivo aséptico, con el método de desinfección empleado se logró obtener el 67.47% de explantes axénicos en un tercer conteo, resultados que fueron similares a los reportados por Marinho *et al.*, (2011) en la especie *L. gracilis*, que obtuvieron un 63.55% de material aséptico de plantas provenientes de campo.

Así mismo, en el porcentaje de contaminación se obtuvo un 29.26% en el último conteo (Cuadro 3), teniendo una mejor respuesta en el estudio en comparación a otros resultados observados en diferentes protocolos de asepsia en *Lippia*, donde obtuvieron desde 70.6 % de explantes contaminados en *L. lacunosa* provenientes de planta de campo (José *et al.*, 2019), hasta 3% de contaminación en *L. grata* de plantas provenientes de invernadero aplicando un tratamiento fitosanitario previo (Palhares *et al.*, 2018).

Cuadro 3. Porcentaje de explantes contaminados, muertos y axénicos en la etapa de establecimiento de *L. graveolens*.

	Porcentaje contaminados	Porcentaje muertos	Porcentaje asépticos	Total
Primer conteo	6.91	0	93.08	99.99
Segundo conteo	25.60	0.81	73.57	99.98
Tercer conteo	29.26	3.25	67.47	99.98

A pesar de que los resultados del estudio fueron similares a otros trabajos del mismo género, se requiere evaluar otros aspectos para una estandarización de protocolo de asepsia, como es identificar el compuesto químico, la concentración y el tiempo de exposición del explante que logre una mayor efectividad en la desinfección de *Lippia* haciendo nula la contaminación.

Para ello, sería necesario contar con la suficiente información acerca de la planta madre, su procedencia, calidad fitosanitaria, tipos de microorganismos patógenos que cohabitan en esta especie vegetal y se lleguen a diseminar durante la etapa de establecimiento *in vitro*, lo que puede ser el aspecto inicial y más decisivo para la selección del compuesto químico, concentración y tiempo de exposición para obtener un material vegetal sano durante esta etapa.

Cuando el material vegetal proviene de campo es de esperar una alta tasa de contaminación; en cambio, si el material proviene de invernadero se reduce esta tasa debido a una mejor condición ambiental, un buen manejo fitosanitario preventivo durante su desarrollo de la planta, causando una disminución en la pérdida del material vegetal por contaminación.

4.2 Etapa de propagación

En esta etapa se utilizaron brotes obtenidos en la etapa de establecimiento.

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) en la formación de brotes mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.01$) para tratamientos, reguladores y concentraciones, así como para la interacción reguladores por concentraciones (Cuadro 4), a diferencia de las interacciones explante por reguladores y explante por concentraciones que tuvieron diferencias significativas, lo que indica que fue indistinta la respuesta de la formación de brotes por el tipo de explante en una medio MS complementado con reguladores a diferentes concentraciones.

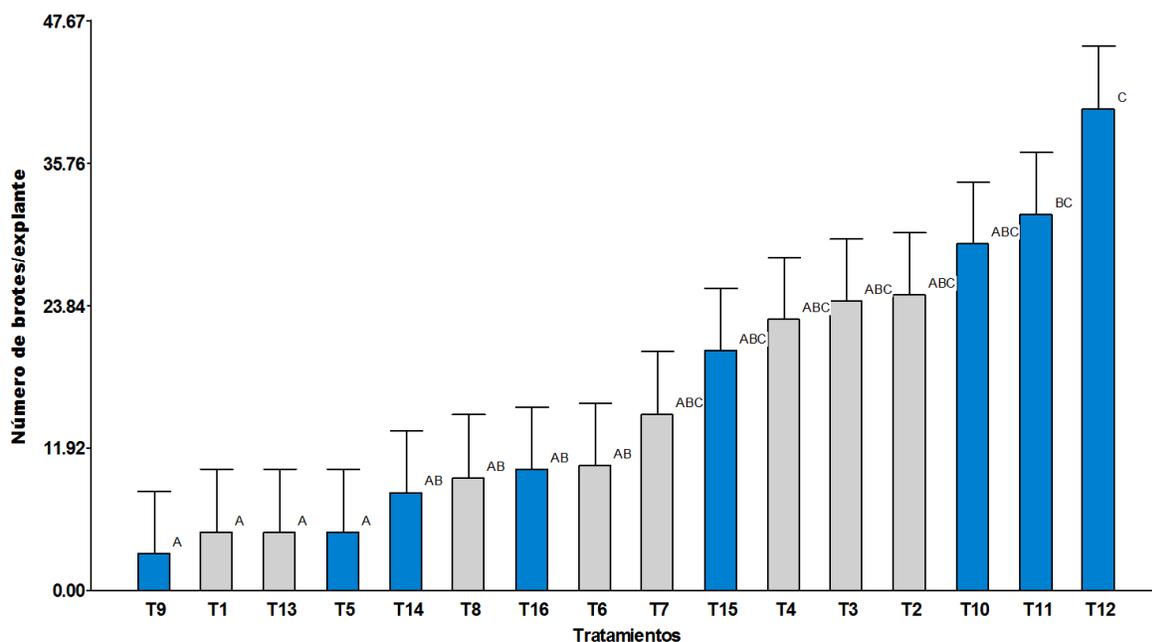
Cuadro 4. Análisis de varianza para la variable número de brotes por explante en *L. graveolens*.

F.V.	SC	GL	CM	F	P valor
Tratamiento	9556.34	15	637.09	4.72	<0.0001
Explante	301.26	1	301.28	2.23	0.1399
Reguladores	2985.96	1	2985.96	22.14	<0.0001
Concentraciones	4048.02	3	1349.34	10.00	<0.0001
Explante*reguladores	176.27	1	176.27	1.31	0.2572
Explante*concentraciones	325.57	3	108.52	0.80	0.4959
Reguladores*concentraciones	1469.82	3	489.94	3.63	0.0174
Explante*reguladores*concentraciones	249.43	3	83.14	0.62	0.6069
	8631.53	64	134.87		
	18187.86	79			

. V.=Fuentes de variación, SC=Suma de cuadrados, GL=Grados de libertad, CM=Cuadrados medios, F= F calculada

Sin embargo, se logró detectar una diferencia significativa ($p \leq 0.01$) que existieron efectos en la formación de brotes por el enriquecimiento de reguladores a diferentes concentraciones, tal fue el caso de la aplicación de citocininas (Kin, BAP) en sus respectivas concentraciones en el medio, donde se mostró un efecto significativo en la tasa de proliferación. Por la significancia dada en la interacción reguladores por concentraciones, se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$), mostrando que BAP a una concentración de 3 mg L^{-1} (T4) resultó ser el mejor regulador al obtener 40.36 brotes por explante, seguidos por los tratamientos T3 (BAP a 2.0 mg L^{-1}) con 27.89 brotes por explante y T2 (6-BAP al 1.0 mg L^{-1}) con 26.90 brotes; mientras que T1, T5, T9 y T13 (0.0 mg L^{-1}) resultaron con el menor número de brotes con una media de 4.92 brotes por explante (Figura 5).

Figura 5. Número de brotes obtenidos en los diferentes tratamientos de propagación de *L. graveolens*.



Valores con la misma letra, no muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Este estudio al tener respuestas ampliamente variables en la tasa de proliferación de brotes adventicios mostró una cierta coincidencia con otras investigaciones en el género *Lippia*, al incrementar la proliferación de brotes cuando se aplican diferentes concentraciones de citocininas o en combinación con auxinas.

En *L. alba* se aplicó BAP al 5.0 mg L⁻¹ obteniendo en promedio 6.4 brotes por explante (Gupta *et al.*, 2001); en *L. javanica* con BAP al 0.25 mg L⁻¹ se tuvieron 2.42 brotes por explante (Ara *et al.*, 2010); así mismo en *L. rotundifolia* al aplicar BAP a 0.33 μM se registró un promedio de 2.6 brotes (Resende *et al.*, 2015); mientras que en *L. integrifolia* con BAP a 2.2 μM se obtuvo una media de 16 brotes por explante (Iannicelli *et al.*, 2016).

En otros estudios, la aplicación de BAP a mayor concentración y en combinación con auxinas, se logró un mayor promedio de brotes por explante, por ejemplo, en *L. lacuosa* al aplicar BAP a 2 mg L⁻¹ se obtuvieron 43.83 brotes (José, *et al.*, 2019); en *L. organoides* sin BAP se obtuvo 9.67 brotes por explante en cambio con BAP a una concentración de 8.8 μM se obtuvo 8.37 brotes por explante y con Kinetina a 4.6 μM se obtuvieron 7.91 brotes por explante (Castilho *et al.*, 2019); así mismo, en *L. filifolia* al combinar BAP al 4.5 μM BAP con ANA al 54ηM se formaron hasta 27.03 brotes por explante (Pexioto, *et al.*, 2006) y en *L. junelliana* al aplicar BAP al 4.4 μM BAP más AIB al 0.04μM se obtuvieron 13.5 brotes por explante (Juliani *et al.*, 1999).

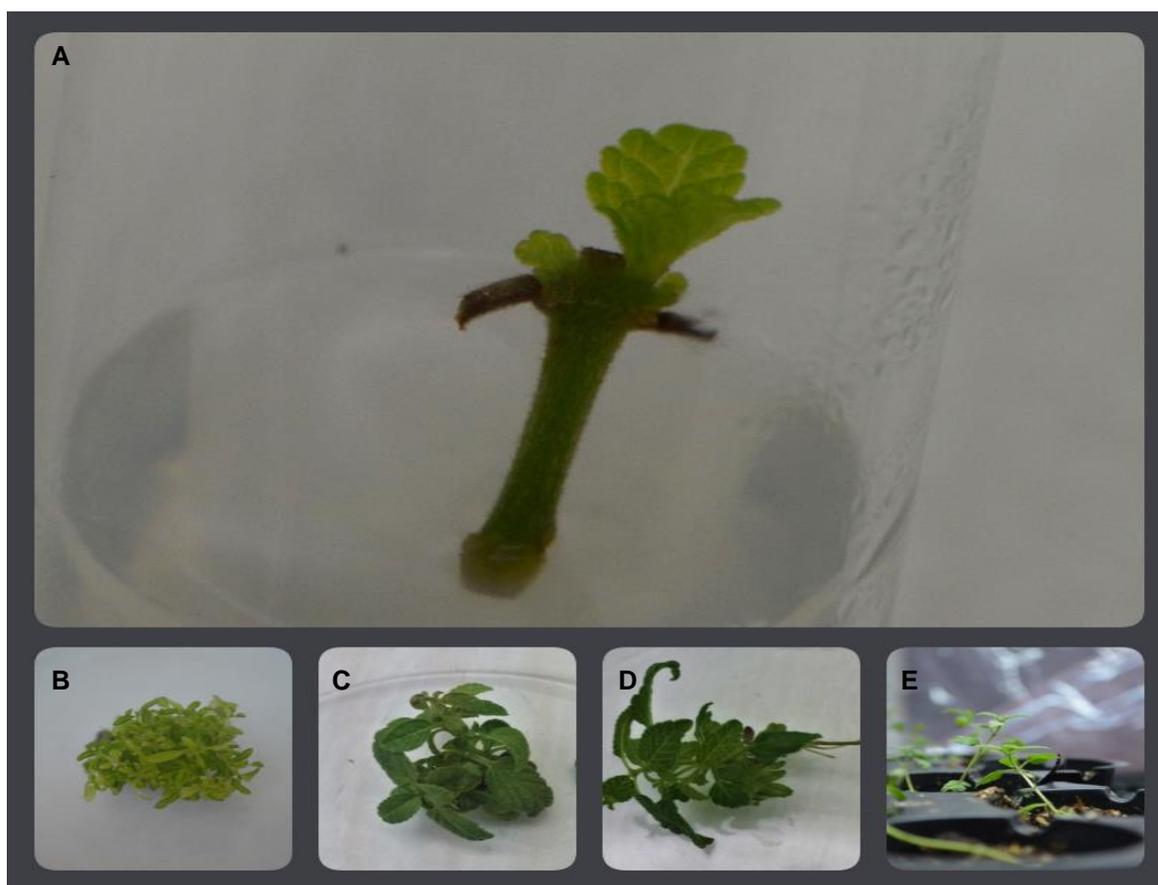
Entre otros estudios más recientes de *L. graveolens* al aplicar BAP al 1.5 mg L⁻¹ se obtuvieron en promedio 6.1 brotes por explante (Castellanos-Hernández *et al.*, 2019); inclusive a una 0.5 mg L⁻¹ se lograron obtener de 3.5 a 6.4 brotes por explante, sin embargo, describen que la composición genética de los materiales evaluados genera una respuesta diferente en la formación de brotes (Muñoz-Miranda *et al.*, 2019).

Por lo anterior, se puede señalar que las diversas respuestas del género *Lippia* se deben a múltiples factores como es el genotipo, el efecto de los reguladores, que independientemente de sus concentraciones y combinaciones, demuestran

especificidad en respuesta al genotipo, y establecen un balance hormonal entre los reguladores exógenos y endógena en cada especie (Resende *et al.*, 2015; Muñoz-Miranda *et al.*, 2019; Castilho *et al.*, 2019).

Con respecto a la variable altura de brote, el análisis de varianza mostró diferencias significativas ($p \geq 0.01$) entre el tipo de explante, reguladores y las concentraciones aplicadas en el medio nutritivo (Cuadro 5), indicando que al menos un tipo de explante, de la misma forma un regulador y al menos a una concentración se provocó una mayor elongación del tejido aéreo de los brotes. En la Figura 6 es posible observar las respuestas del explante en las diferentes etapas.

Figura 6. Propagación in vitro de *L. graveolens*.



Fuente: Planta extraído de la comunidad del Amparo, Municipio de Parras, Coahuila en enero de 2018.
Nota: A) explante axénico; B) micropropagación en medio basal MS con BAP a 3 mg L⁻¹; C) crecimiento en medio MS, D) enraizamiento con AIB a 0.5 mg L⁻¹ de AIB; y F) aclimatación de plántulas en invernadero.

De igual forma, el ANOVA indicó diferencias significativas ($p \geq 0.01$) en las interacciones, reflejando que uno de los tipos de explante sembrados en un medio complementado con alguna concentración de algún regulador de los valorados en el estudio generó una mayor altura en los brotes de esta especie *L. graveolens*, como se muestra en la Figura 7.

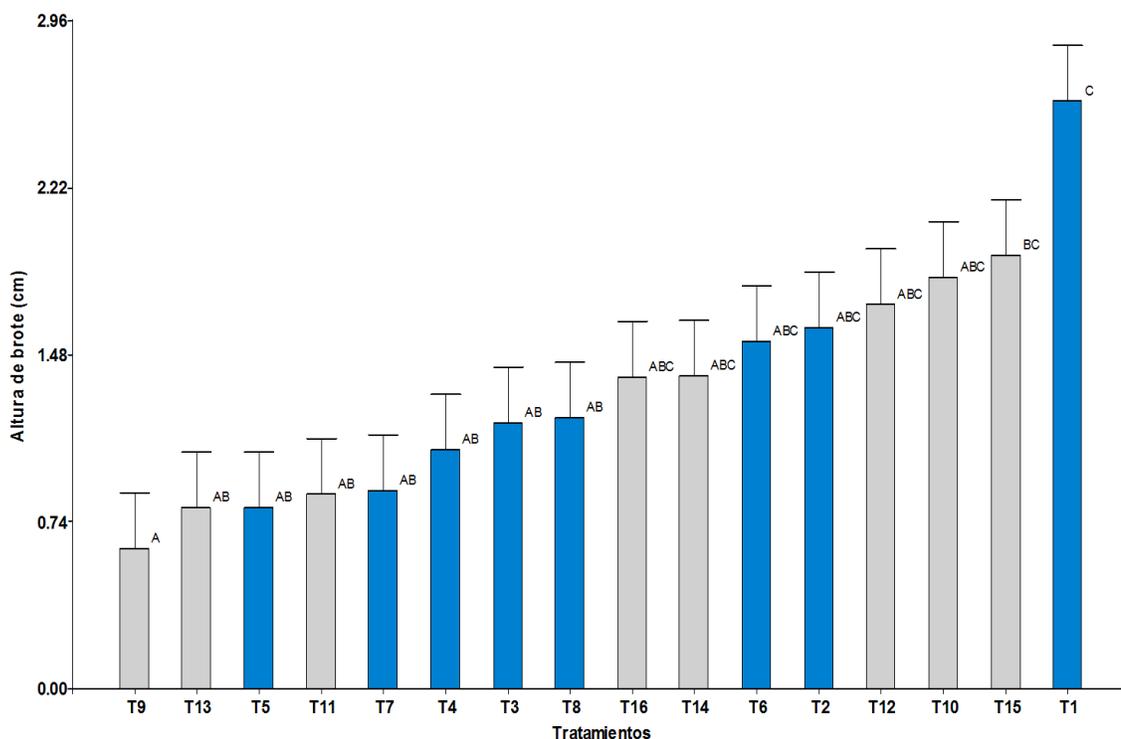
Cuadro 5. Análisis de varianza para la variable altura de explantes en la etapa de multiplicación in vitro.

F.V.	SC	GL	CM	F	P valor
Tratamiento	20.31	15	1.35	4.52	0.0001
Explante	0.04	1	0.04	0.15	0.7024
Reguladores	0.74	1	0.74	2.46	0.1218
Concentraciones	1.91	3	0.64	2.12	0.1059
Explante*reguladores	1.96	1	1.96	6.53	0.01
Explante*concentraciones	6.35	3	2.12	7.06	0.0004
Reguladores*concentraciones	3.61	3	1.20	4.02	0.01
Explante*reguladores*concentraciones	5.69	3	1.90	6.33	0.008
	19.19	64	0.30		
	39.50	79			

. V.=Fuentes de variación, SC=Suma de cuadrados, GL=Grados de libertad, CM=Cuadrados medios, F= F calculada

Dadas estas diferencias significativas en los tratamientos, se realizó una prueba de medias de Tukey (< 0.05) indicando que los tipos de explante yema y segmentos nodales presentaron una diferencia de 1.98 cm entre tratamientos. En la Figura 7, se muestra que los segmentos nodales logran obtener mayor altura del brote con un promedio de 2.6 cm en un tratamiento sin regulador (T1, de 0.0 mg L⁻¹). Sin embargo, al aplicar Kin se pueden presentar también respuestas positivas, tal fue el caso de T8 (3.0 mg L⁻¹ Kin), T6 (2.0 mg L⁻¹ Kin) y T5 (1.0 mg L⁻¹ Kin) que resultaron con alturas de 1.92, 1.54 y 1.34 cm, respectivamente. Por el contrario, la aplicación de BAP reduce la posibilidad de incrementar la altura de los brotes como resultó en los tratamientos T3 (2.0 mg L⁻¹ BAP), T2 (1.0 mg L⁻¹ BAP) y T4 (3.0 mg L⁻¹) quienes presentaron menores alturas de 1.21, 1.12 y 0.62 cm cada uno, señalados en la misma Figura 7.

Figura 7. Promedio de altura de brotes de los tratamientos en la propagación de *L. graveolens*.



Valores con la misma letra, no muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Considerando de los resultados de las variables evaluadas en esta etapa del estudio, se puede apreciar que conforme aumenta el número de brotes disminuye su altura, como se reflejó en el testigo que obtuvo 4.02 brotes por explante, con una altura promedio de 2.6 cm de longitud siendo el más alto; en contraste T4 (BAP a 3.0 mg L^{-1}) que obtuvo 40.35 brotes por explante, pero con una altura promedio de 0.91 cm.

Con respecto a los resultados en el tipo de explante con yemas apicales del estudio llegó a coincidir con lo reportado por Urrea *et al.*, (2009) en la especie *L. dulcis* utilizando dos tipos de explante aplicando los reguladores AIA a 0.1 mg L^{-1} y BAP a 1.0 mg L^{-1} , así como en su combinación. Sin embargo, concluyeron que alcanzan la mayor altura sin la adición de hormonas.

De igual forma, este estudio coincidió con otras especies como *L. junelliana* (Juliani *et al.*, 1999) y *L. javanica* (Ara *et al.*, 2010), que presentaron una tendencia

negativa en la elongación del brote conforme incremento la concentración de BAP, lo cual indicó que incremento de BAP es inversamente proporcional a la altura de la planta.

Por otro lado, la aplicación de citocininas tiende a romper la dominancia apical y puede llegar a estimular la iniciación de brotes, provocando que la biomasa de los brotes podría ser más afectada por la tasa de proliferación, que, por el crecimiento de los brotes individuales, y en consecuencia existiría una reducción en la longitud del explante (Thiyagarajan and Venkatachalam, 2012; Taiz and Zeiger, 2013; Grzegorzcyk-Karolak *et al.*, 2015).

5.3 Etapa de enraizamiento

En el análisis de varianza para la variable longitud de raíz se encontraron diferencia significativa ($p < 0.05$) en la aplicación de reguladores y en la interacción reguladores por concentraciones; y al $p < 0.01$ en las concentraciones (Cuadro 6). Lo que indica que los tratamientos tuvieron diferentes efectos en esta variable, sobre todo las distintas concentraciones, ya que posiblemente inciden de alguna manera en la longitud de la raíz en la etapa de enraizamiento.

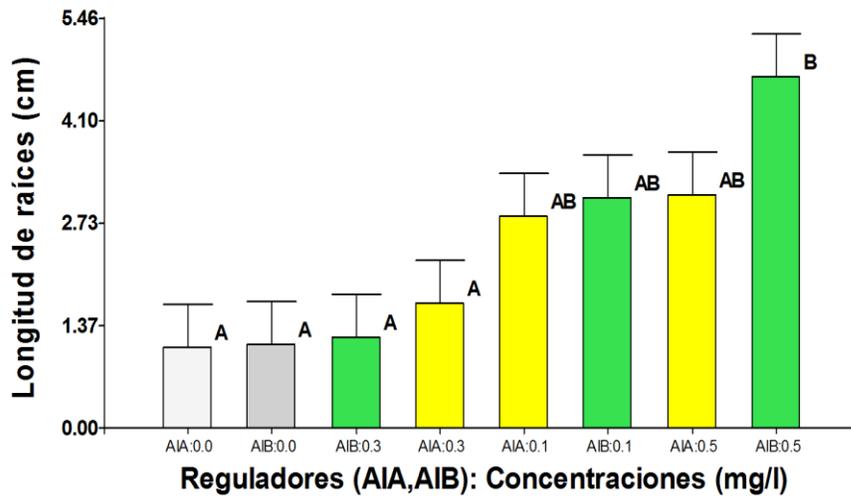
Dadas las significancias, se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), encontrando al T4 (AIB a 0.5 mg L^{-1}) como el mejor tratamiento al obtener el mayor promedio de longitud con 4.71 cm, señalado en la Figura 7. Seguido por T8 (AIB a 0.5 mg L^{-1}), T2 (AIB a 0.1 mg L^{-1}) y T6 (AIA a 0.1 mg L^{-1}) con longitudes de 3.13, 3.10 y 2.8 cm, respectivamente.

Cuadro 6. Análisis de varianza para longitud de raíz en la etapa de enraizamiento *in vitro*.

F.V.	SC	GI	CM	F	P valor
Tratamientos	419.24	7	59.89	5.15	<0.0001
Reguladores	8.55	1	8.55	0.74	0.3918
Concentraciones	369.94	3	123.31	10.61	<0.0001
Reguladores*concentraciones	40.64	3	13.55	1.17	0.3233
Error	3242.94	279	11.62		
Total	3662.18	286			

F. V.=Fuentes de variación, SC=Suma de cuadrados, GL=Grados de libertad, CM=Cuadrados medios, F= F calculada

Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de auxinas en la longitud de raíz de brotes *L. graveolens*.



Valores con la misma letra, no muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En cambio, los tratamientos T7 (AIA a 0.3 mg L^{-1}), T3 (AIB a 0.3 mg L^{-1}), T1 (AIA a 0.0 mg L^{-1}) y T5 (AIB a 0.0 mg L^{-1}) resultaron con las más bajas longitudes de 1.66, 1.20, 1.05 y 1.10 cm cada uno.

En el estudio de *L. graveolens*, la aplicación de AIB resultó con un mayor efecto en la longitud de raíz, coincidiendo con lo reportado por Castellanos-Hernández *et al.* (2013), en la especie *L. graveolens*, al aplicar AIB a una concentración de 1.5 mg L^{-1} y obtener valores de $10.0 \pm 4.7 \text{ cm}$ de longitud en los brotes.

Cabe señalar que la AIB se caracteriza por ser una de las auxinas sintéticas más utilizadas en promover el enraizamiento de plantas *in vitro*; además de ser un regulador efectivo en la inducción de raíces y posee la capacidad de desarrollar una raíz principal fuerte y de buena consistencia (Castellanos-Hernández *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2012).

5.4 Etapa de aclimatación

El análisis de varianza en el porcentaje de sobrevivencia se encontró diferencia significativa ($p < 0.01$) entre los tratamientos aplicados en la etapa de aclimatación, indicando que al menos existió un efecto diferente entre el fotoperiodo, sin o con la adición de micorrizas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de varianza de los tratamientos en la etapa de aclimatación de *L. graveolens*.

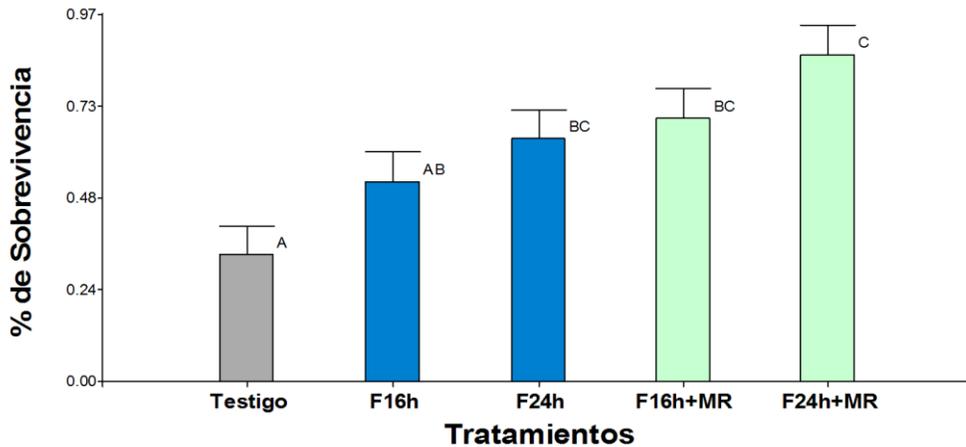
F.V.	SC	GL	CM	F	P valor
Tratamientos	5.56	4	1.39	6.53	<0.0001
Error	37.22	175	0.21		
Total	42.78	179			

F. V.=Fuentes de variación, SC=Suma de cuadrados, GL=Grados de libertad, CM=Cuadrados medios, F= F calculada

Al realizar la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), se obtuvo que el mejor tratamiento fue T5 al presentar el mayor valor de sobrevivencia con 86.11 %, seguidos T3, T4 y T2 con 69.44, 63.88 y 52.77%, respectivamente, mientras el testigo resultó con el menor porcentaje de sobrevivencia con 33.33 % (Figura 7).

Estos resultados muestran que posiblemente la combinación de los factores físicos (fotoperiodo) y biológicos (micorrizas) pueden modificar la respuesta de las plántulas hasta alcanzar el incrementar la probabilidad de sobrevivencia; ya que Fortini y colaboradores (2020), mencionan que el fotoperiodo llega a establecer cambios morfofisiológicos en las plantas; así mismo, el aumento del régimen lumínico incrementa la tasa fotosintética, el crecimiento y la biomasa, y afecta o modifica el metabolismo primario y secundario. En algunas especies, por ejemplo, se ha observado un incremento del área foliar y de la clorofila, lo que repercute en un rendimiento fotosintético (Adams y Langton, 2005).

Figura 9. Porcentaje de sobrevivencia en la atapa de aclimatación de *L. graveolens*. Valores con la misma letra, no muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$).



Por otro lado, la biotización favorece e induce resistencia a las plántulas por ser inoculadas con bacterias u hongos benéficos. La inoculación de plántulas axénicas como hongos micorrízicos, puede llegar a protegerlas de infestación por organismos saprófitos. Además de favorecer el crecimiento, colabora en la captación de nutrientes, modifica el pH del suelo, genera la resistencia a enfermedades, provee a la raíz de aereación, hasta puede llegar a incrementar la productividad y proteger contra el estrés hídrico (Chandra *et al.*, 2010).

Otros estudios confirman que la micorrización es una herramienta biotecnológica efectiva por incrementar el porcentaje de sobrevivencia en las plantas; también logran modificar la función y densidad de los estomas y en consecuencia hacer cambios en los procesos metabólicos y fotosintéticos (Da Silva *et al.*, 2017; De Souza *et al.*, 2020). Ejemplo de ello, en plantas micropropagadas de *Agave grijalvensis*, se logró un gran incremento de fructanos, número de hojas y mayor longitud de raíz al aplicar micorrizas (Santiz-Gómez *et al.*, 2019).

CONCLUSIONES

La presente investigación logró implementar un protocolo para propagación *in vitro* de *Lippia graveolens*.

El establecimiento de explantes nodales de *L. graveolens* se obtiene el mayor porcentaje axénico con alcohol al 70% por 1 min, enjuague con agua destilada, en seguida con hipoclorito de sodio al 20% por 20 min y enjuagar tres veces con agua destilada por un minuto.

En la multiplicación de *L. graveolens* en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) suplementado con reguladores de crecimiento como BAP a una concentración de 3.0 mg L⁻¹ genera un efecto favorable en la producción de mayor número de brotes por explante.

En la etapa de enraizamiento de plantas de *L. graveolens*, se tiene el mismo efecto el suplementar el medio de cultivo MS con la auxina AIB a diferentes concentraciones que carecer de la hormona en la formación de raíz.

En la etapa aclimatación en *L. graveolens*, se logra una mayor supervivencia de las plántulas en condiciones de invernadero con fotoperiodos largos de 24 horas y con la aplicación de micorrizas como *Glomus intraradicens*.

BIBLIOGRAFIA

Adams, S. R. & Langton, F. A. 2005. Fotoperiodo y crecimiento vegetal: una revisión. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80 (1), 2-10.

Ara, N., Azam, F. S., Lithy, S. S., & Rahmatullah, M. 2010. A study of plant growth hormones on in vitro clonal propagation of fever tea (*Lippia javanica*): a medicinal shrub. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 4(3), 274-279.

Aranda, R. J., Silva, V. R., Franco, H. D. I. 2009. Caracterización del aceite esencial de orégano liso (*Poliomintha longiflora Gray*) de la localidad Infiernillo en el municipio de Higueras, Nuevo León, México. *Revista Salud Pública y Nutrición*, Vol. 10 No. (1).

Arcila-Lozano, C. C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., & González de Mejía, E. 2004. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de nutrición*, 54(1), 100-111.

Argueta, A. 1994. Atlas de las plantas medicinales tradicionales mexicanas. Instituto Nacional Indigenista, México.

Asmar, S. A., Resende, R. F., Araruna, E. C., Morais, T. P., & Luz, J. M. Q. 2012. Concentrações de BAP sobre a proliferação in vitro de brotos de *Lippia alba* [(Mill.) NE Brown]. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14, 149-153.

Ávila-Sosa, S. R. 2001. Estudio químico y biológico de las fracciones de oregano (*Origanum vulgare L.*). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chihuahua.

Berlanga, R. C. A., Villavicencio, G. E. E., Martínez, B. O. U., y Cano P. A. 2005. Vegetación asociada al orégano *Lippia graveolens (HBK)* y sus características dasonómicas en algunas comunidades de Coahuila. Segunda Reunión Nacional sobre Orégano. Salaires, Chih., México. pp. 21-24.

Bueno, D. A. Y. 2014. Estimulación abiótica de la acumulación de compuestos bioactivos en dos especies de *Lippia*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco, A.C. Guadalajara, Jalisco.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*. Vol. 94(3), 223-253.

Caballero, N. J. 1985. Exploración de recursos genéticos y potenciales. Edit. SOMEFI. En Memorias del Seminario sobre la Investigación Genética Básica en el Conocimiento y Evaluación de los Recursos Genéticos, Jardín Botánico, Instituto de Biología –UNAM, y Sociedad Mexicana de Fitogenética.

Calva, C. G., & Pérez, V. J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro

Capote, A., Fuentes, V., Blanco, N., & Pérez, O. 1999. Micropropagación y regeneración de plantas *in vitro* de oreganillo *Lippia micromera Schau.* in DC. var. *helleri* (Britt.) Mold. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 139-142.

Carriles-Odrizola, R. 1994. Propagación *in vitro* de orégano (*Poliomintha longiflora* [Gray]). Universidad Autónoma de Nuevo León. N. L.

Castellanos-Hernández, O. A., Acevedo-Hernández, G. J., Torres-Morán, M. I., Zurita, F., Gutiérrez-Lomelí, M., Del Toro-Sánchez, C. L., & Rodríguez-Sahagún, A. 2013. In vitro clonal propagation and regeneration of the commercially important plant Mexican oregano (*Lippia graveolens*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(5), 620-625.

Castillo, A. 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA.

Castilho, C. V., Leitão, S. G., Silva, V. D., Miranda, C. D. O., Santos, M. C. D. S., Bizzo, H. R., & da Silva, N. C. 2019. In vitro propagation of a carvacrol-producing type of *Lippia origanoides* Kunth: A promising oregano-like herb. *Industrial Crops and Products*, 130, 491-498.

Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., & Chandra, R. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology letters*, 32(9), 1199-1205.

CONABIO (Comisión Nacional de Biodiversidad). 2005. Orégano Mexicano: Oro Vegetal. *Biodiversitas* 15:8-13.

Comisión Nacional Forestal (Conafor). 2009. Fichas de información comercial de productos forestales. Coordinación General de Educación y Desarrollo Tecnológico, Gerencia de Desarrollo y Transferencia de Tecnología. Fondo Sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal, SEMARNAT, México, D. F. pp. 8-9

CONAFOR. 2013. Estrategia Nacional de Manejo Forestal Sustentable para el Incremento de la Producción y Productividad (EINAPROS) 2013-2018.

Comisión Nacional Forestal (Conafor)-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt). 2013. Fondo sectorial para la investigación, el desarrollo y la innovación tecnológica forestal Conafor-Conacyt. Sistema Nacional de Gestión Forestal. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Corella-Bernal, R. A., & Ortega-Nieblas, M. M. 2013. Importancia del aceite esencial y la producción de orégano *Lippia palmeri* Watson en el estado de Sonora. *Biotecnia*, 15(1), 57-64. Hermosillo, Sonora.

Cutter, C. N. 2000. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection*, 63(5), 601-607.

Da Costa, A. S., Arrigoni-Blank, M. D. F., Blank, A. F., de Mendonça, A. B., Amancio, V. F., & Ledo, A. D. S. 2007. Estabelecimento de alecrim-pimenta in vitro. *Horticultura Brasileira*, 25(1), 68-72.

Da Silva, A. R., de Melo, N. F., & Yano-Melo, A. M. 2017. Acclimatization of micropropagated plants of *Etingera elatior* (Jack) RM Sm. inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *South African Journal of Botany*, 113, 164-169.

De Castro, K. M., Batista, D. S., Fortini, E. A., Silva, T. D., Felipe, S. H. S., Fernandes, A. M., de Jesus, de Queiroz L. S. M. & Otoni, W. C. 2019. Photoperiod modulates growth, morphoanatomy, and linalool content in *Lippia alba* L. (*Verbenaceae*) cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 139(1), 139-153.

De Feria, M., Chávez, M., Barbón, R., La O, M., Pérez, M., Jiménez-Terry, F., Quiala, E. & Agramonte, D. 2009. Multiplicación *in vitro* de plantas de *Pinus caribaea* var. *caribaea*. *Biología Vegetal*, 9(4): 217-224.

De Hsie, B. S. 2017. Reguladores de crescimento, qualidade e intensidade de luz, sistema de ventilação natural e análise da fração volátil na Micropropagação de *Lippia Rotundifolia Cham.* Universidade Federal de Lavras. pp. 115

De Hsie, B. S., Bueno, A. I. S., Bertolucci, S. K. V., de Carvalho, A. A., da Cunha S. H. B., Martins, E. R. & Pinto, J. E. B. P. 2019. Growth regulators induced shoot regeneration and volatile compound production in *Lippia rotundifolia Cham.*, a threatened medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 137, 401-409.

De Jesús, A. C. 2010. Calidad fisiológica de semilla de nueve ecotipos de orégano de tres estados del norte de México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.

De la Fuente, E. M. P. 2006. Aplicación de aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) en la conservación de carne de pollo (Doctoral dissertation, Tesis Ingeniería en Ciencias y Tecnología de los Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coah. México), 69 p.

De Souza Ferrari, M. P., da Cruz, R. M. S., dos Santos Queiroz, M., de Andrade, M. M., Alberton, O., & Magalhães, H. M. 2020. Efficient ex vitro rooting, acclimatization, and cultivation of *Curcuma longa* L. from mycorrhizal fungi. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 23(5), 469-482.

Farías, G., Brutti O., Grau R., Lira D.L. P., Retta D., Van Baren, C., Vento S., y Bandoni A. L. 2010. Descriptores morfológicos, de rendimiento y de calidad de cuatro clones de *Origanum* spp. (*Lamiaceae*) del banco de germoplasma de la región litoral argentina. *Cultivos y productos industriales*, 32 (3), 472-480.

Flores, M. D., Chacon, C. R., Jiménez, Bonilla. V. & Ortiz, S. F. 2012. Enraizamiento de mora (*Rubus adenotrichus*) en medio líquido en el sistema de inmersión temporal y su aclimatación en invernadero. *Tecnología en Marcha*, 25(2), 3-9

Fortini, E. A., Batista, D. S., de Castro, K. M., Silva, T. D., Felipe, S. H. S., Correia, L. N. F. & Otoni, W. C. 2020. Photoperiod modulates growth and pigments and 20-hydroxyecdysone accumulation in Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] grown in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 142(3), 595-611.

Galván, L. R., Berzoza, M. M & Silva, V. R. 2005. Adaptación y producción de orégano *Lippia graveolens* (H.B.K.) bajo riego por goteo y gravedad. 2ª Reunión Nacional sobre Orégano. Salta, Chihuahua, México.

García-Pérez, E., Fernando Francisco, C. Á., Gutiérrez-Urbe, J. A., & García-Lara, S. 2012. Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutracéuticas del orégano mexicano. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(2), 339-353.

Gómez, L. C. F., Orejón, E. D. F., Raymundo, S. J. A. 2011. Proyecto de exportación de orégano seco al mercado de Brasil. Instituto Continental. Huancayo, Perú.

Grzegorzczak-Karolak, I., Kuźma, Ł., & Wysokińska, H. 2015. The effect of cytokinins on shoot proliferation, secondary metabolite production and antioxidant potential in shoot cultures of *Scutellaria alpina*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(3), 699-708.

Guerrero, M. E. 2008. El valor del orégano. Instituto tecnológico y de Estudios superiores de Monterrey.

Gupta, S. K., Khanuja, S. P. S. & Kumar S. 2001. In vitro propagation of *Lippia alba*. *Current Science* 81 (2): 206-209.

Hernández, T., Canales M., Ávila J. G., García A. M., Meraz S., Caballero J., & Lira R. 2009. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* HBK (Verbenaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(4), 295-300.

Hudson, H., & Dale, K. 1987. Propagación de plantas: principios y prácticas. Tercera edición en español de la cuarta en Ingles; Editorial CECSA; México p. 596-601

Huerta, C. 1997. Orégano mexicano: oro vegetal. *Biodiversitas. Bol. CONABIO* 3(15):8–13.

Hutchings, A., & van Staden, J. (1994). Plants used for stress-related ailments in traditional Zulu, Xhosa and Sotho medicine. Part 1: Plants used for headaches. *Journal of Ethnopharmacology*, 43(2), 89-124.

Iannicelli, J., De la Torre, M. C. P., Coviella, M. A., Aguirre, E. D. V., Elechosa, M. Á., Van Baren, C. M. Pacheco, M. G., Escandón, A. S. Escandón, A. S. 2016. Propagación in vitro de *Lippia integrifolia* (Griseb.) Hier. y detección de inestabilidad genética a través de marcadores ISSR de plantas cultivadas in vitro. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 115 (1), 67-76.

Iliev, I., Gajdosová A., Libiaková G. & Jain S.M. 2010. Plant micropropagation in Plant Cell Culture Essential Methods. Eds. Davey and Anthony: Wiley-Blackwell. 358 pp.

José, D. P., De Campos, J. M. S., Viccini, L. F., Alkimim, E. R., & de Oliveira Santos, M. 2019. Micropropagation and ploidy stability of *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer: an endangered brazilian medicinal plant. *Revista de Agricultura Neotropical*, 6(1), 1-7.

Juliani, H. R., Koroch, A. R., & Trippi, V. S. 1999. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59(3), 175-179.

Koksal, O., Gunes, E., Ozer, O. O. & Ozden, M. 2010. Analysis of effective factors on information sources at Turkish Oregano farms. *African Journal of Agricultural Research*, 5(2), 142-149.

Kulisc, T., Radonic A., Katalinic V., & Milos M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food chemistry*, 85(4), 633-640.

Iannicelli, J., De la Torre, M. C. P., Coviella, M. A., Aguirre, E. D. V., Elechosa, M. Á., Van Baren, C. M. Pacheco, M. G., Escandón, A. S. Escandón, A. S. 2016. Propagación in vitro de *Lippia integrifolia* (Griseb.) Hier. y detección de inestabilidad genética a través de marcadores ISSR de plantas cultivadas in vitro. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 115 (1), 67-76.

Lenardis, A. E., Gil A., & Morvillo C. 2006. Orégano. *Cultivos Industriales*. Ed: Facultad de Agronomía EFA, Buenos Aires, Argentina. pp. 509-544.

Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina, 258 pp.

Lewis, W.H. 1990. *Medical Botany Plants Affecting Man`s Health*. John Wiley, New York.

Llamas, T. I. 2015. Propuesta para el ordenamiento y manejo sustentable del orégano Mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K. *verbenaceae*) en el noreste de Yucatán México. Centro de investigación Científica de Yucatán, AC.

Maldonado, R. J. A. 1998. El orégano Silvestre en México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. No. SB307.

Marinho, M. J. M., Albuquerque, C. C., Morais, M. B., Souza, M. C. G., & Silva, K. M. B. 2011. Estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Lippia gracilis* Schauer. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13 (2), 246-252.

Martínez, D. M. 1994. El manejo técnico del orégano, *Lippia berlandieri* Schauer, en Jalisco. Guadalajara, Jalisco, México: Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.

Martínez-Hernández, R., Villa-Castorena, M. M., Catalán-Valencia, E. A., & Inzunza-Ibarra, M. A. 2017. Producción de plántula de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) por semilla en vivero para trasplante. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 23(1), 61-73.

Martínez, B. O. U. & Lara, G. G. J. 2003. Potencial productivo de áreas de temporal en el estado de Coahuila. Una propuesta de conversión productiva. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Saltillo. Publicación Especial, (1). Coahuila, México. 89 pp.

Meléndez, N., Rodríguez R., Silva R. 2009. El orégano mexicano. Facultad de Ciencias Químicas. *Revista Ciencia cierto* No. 20.

Méndez-Zamora., G., García M., J. A., Durán-Meléndez, L. A., Herman-Lara, E., Santellano Estrada, E., & Silva Vázquez, R. 2015. Aceite esencial de orégano

(*Lippia berlandieri Schauer*) en variables de calidad de la canal de pollo. Ecosistemas y recursos agropecuarios, 2(4), 41-51.

Méndez, C. S. 2000. Efecto del ajo en polvo sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* usando como ambiente de interacción ensalada de atún. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas; Chihuahua, Chihuahua; 58 p.

Monroy, C., & Castillo P. 2000. Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos, Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Morales, A. G. 2005. Aplicación de aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) en la conservación de carne de res. Tesis Ingeriría en Ciencias y Tecnología de los Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coah. México. 53 p.

Moreno, Z. J. A. 2010. Evaluaciones antifúngicas in vitro de extracto etanolicos y de una fracción polifenólica de *Lippia graveolens* sobre *Penicillium sp.* Tesis. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila.

Muñoz-Miranda, L. A., Rodríguez-Sahagún, A., Acevedo Hernández, G. J., Cruz-Martínez, V. O., Torres-Morán, M. I., Lépiz-Ildefonso, R. & Castellanos-Hernández, O. A. 2019. Evaluation of somaclonal and ethyl methane sulfonate-induced genetic variation of Mexican oregano (*Lippia graveolens HBK*). Agronomy, 9(4), 166.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 (3):473-497.

Nuyen, D. C. 2007. Aplicación de aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri Schauder*) en la conservación de carne de pavo. Tesis Ingeniería en Ciencias y Tecnología de los alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Saltillo, Coah. México. 85 p. (No. TP 390. D52 2007).

Ocampo-Velázquez, R. V., Malda-Barrera, G. X., & Suárez-Ramos, G. 2009. Reproductive biology of Mexican oregano (*Lippia graveolens Kunth*) in three exploitation conditions. Agrocienca, 43(5), 475-482.

Olhagaray, E., Serrato, R., Del Río, F., & Casas, A. 2005. Cuantificación de orégano (*Lippia berlandieri Schauer*) en diez localidades del municipio de Nazas, Durango, México. 2da Reunión Nacional sobre orégano. Centro de Investigación para los Recursos Naturales, Saltaices, Chihuahua, México.

Orona, C. I., Salvador, A. A. J., Espinosa, A. J. J., & Vázquez, V. C. 2017. Recolección y comercialización del orégano (*Lippia spp*) en el semi-desierto mexicano, un caso de estudio: reserva ecológica municipal sierra y cañón de Jimulco, México. Revista Mexicana de Agronegocios, 41, 684-695. ISSN: 1405-9282.

Ortiz, L., Palacio, L., Brunetti, P., Lloret, C., Cantero, J., & Goleniowski, M. 2007. Regeneración *In vitro* de Plantas de Poleo (*Lippia turbinata Griseb var. turbinata*). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 6(6), 403-404. ISSN: 0717-7917

Palhares, N. L., de Souza L. M., de Morais M. B., de Albuquerque C. C., Rangel C. T., Ulisses C. 2018. Controlling hyperhydricity in micropropagated plants of *Lippia grata Schauer (Verbenaceae)*, a native species of a dry seasonal tropical forest with pharmacological potential. Brazilian Journal of Botany, 41(3), 529-538.

Passera, C. B., & Ambrosetti, J. A. 1997. In vitro propagation of "incayuyo", *Lippia integrifolia (Gris.) Hier. (Verbenaceae)*, a medicinal and aromatic plant of Monte Phytogeographical Province, Argentina. In // WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, Part 3: Agricultural Production, Post Harvest Techniques, Biotechnology 502 (pp. 319-324).

Peixoto, P. H. P., Salimena, F. R. G., de Oliveira Santos, M., da Silva-García, L., de Oliveira-Pierre P. M., Viccini L. F., Otoni, W. C. 2006. In vitro propagation of endangered *Lippia filifolia* Mart. and Schauer ex Schauer. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. 42(6): 558-561.

Ramírez-Moreno, J. S. 2018. Cultivo In vitro del Orégano de Monte (*Lippia Origanoides HBK*). Doctoral dissertation, Escuela De Biología, Universidad Industrial de Santander, España.

Resende, C. F. D., Bianchetti, R. E., Oliveira, A. M. S. D., Braga, V. F., & Peixoto, P. H. P. 2015. In vitro propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian Campos Rupestres. Revista Ciência Agronômica, 46 (3), 582-589.

Rionda, R. J. I., Zúñiga, H. M. C., Lomelí, C. V. Y., Cruz H. D., y Vallejo, A. C. A. 2006. Impacto de las políticas públicas en la calidad de vida de la población (Monitoreo de la marginación en cuatro municipios del occidente de México: de Nayarit, Ixtlan del rio y Tepic; de Guanajuato, Valle de Santiago y Guanajuato, 1995 y 2000). ISBN: 84-690- 0668-1.

Rivero-Cruz, I., Duarte G., Navarrete A., Bye R., Linares E., & Mata, R. 2011. Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. Journal of food science, 76(2), C309-C317.

Rodríguez, A. M. 2018. Cultivo *In vitro*: Alternativa al Cultivo tradicional de plantas medicinales. Universidad Complutense, Madrid, España.

Rojas-Pérez, M. A., Montes-Rivera, G., Silva-Vázquez, R. & Diaz-Ramirez, B. 2008. Respuesta al balance hormonal en segmentos nodales de orégano (*Lippia berlandieri Schauer*). 3ra. Reunión Nacional sobre Orégano. Ed. Especial No. 1. Saltillo, Coahuila, México.

Roofchae, A., Irani, M., Ebrahimzadeh, M. A., & Akbari, M. R. 2011. Effect of dietary oregano (*Origanum vulgare L.*) essential oil on growth performance, cecal microflora and serum antioxidant activity of broiler chickens. African Journal of Biotechnology, 10(32), 6177-6183.

SAGARPA, 2013: Plantaciones de orégano para zonas semidesérticas del sur de Coahuila.

Sánchez, S. M. 2012. Estadística de productividad del orégano Bolivia vs otros Países. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia.

Sánchez-Ramos, G., Quezada, F. H., Lara-Villalón, M., Medina-Martínez, T., & Pérez-Quilantán, L. M. 2011. Parámetros ambientales y abundancia del orégano mexicano (*Lippia graveolens*) en el estado de Tamaulipas. *CienciaUAT*, 6(1), 24-31. ISSN: 2007-7521

Sánchez-Zamora, N., Silva-Vázquez, R., Rangel-Nava, Z. E., Hernández-Martínez, C. A., Kawas-Garza, J. R., Hume, M. E. & Méndez-Zamora, G. 2019. Inulina de agave y aceite de orégano mejoran la productividad de pollos de engorda. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 6(18), 523-534.

Santiz-Gómez, J. A., Rincón-Rosales, R., Abud-Archila, M., Ruíz-Valdiviezo, V. M., Gutiérrez-Miceli, F. A., Dendooven, L. & Gonzalez-Mendoza, D. 2019. Influence of Mycorrhization on the Growth and Fructan Production in Micropropagated Agave grijalvensis (B. Ullrich) Plantlets. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90(2), 375-380.

Segretín, M. E. 2006. Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología, 2, 5-8.

SEMARNAT. 2005. Informe de la Situación del medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. México 380 p.

SEMARNAT. 2015. Catálogo de recursos forestales maderables y no maderables Árido, Tropical y Templado.

http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/Catalogo_de_recursos_forestales_M_y_N.pdf.

Serrano-Bueno, G., Romero-Campero, F. J., Lucas-Reina, E., Romero, J. M., & Valverde, F. 2017. Evolution of photoperiod sensing in plants and algae. *Current opinion in plant biology*, 37, 10-17.

Silva, V. R. 2005. El orégano (*Lippia berlandieri Schauer*): Una alternativa agroindustrial para las zonas áridas y semiáridas de México. Segunda Reunión Nacional sobre Orégano. Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIReNa). Saltaices, Chihuahua, México. pp 8-14.

Silva-Vázquez, R., Gastélum-Franco, M. G., Torres-Muñoz, J. V., Nevárez-Moorillón, G. V. 2008. Las especies de orégano en México. In: Aguilar CN (ed) *Fitoquímicos sobresalientes del semidesierto mexicano: de la planta a los químicos naturales y a la biotecnología*. Saltillo Coahuila, México, pp. 136–153.

Silva, V. R., Aranda R. J., Franco H, D. I. 2009. Caracterización del aceite esencial de orégano liso (*Poliomintha longiflora Gray*) de la Localidad Infiernillo en el municipio de Higuera, N.L., México. *Revista salud pública y nutrición*, 10(1).

Silva-Vázquez, R. (2012). El Orégano (*Lippia Berlandieri Schauer*) una alternativa agroindustrial para las zonas áridas y semiáridas de México. Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIReNa). Publicado por Sociedad Científica del Orégano A.C. Saltaices, Chihuahua.

Soto, R. J., Hernández A. F., Franco R. C., Silva R. 2007. Identificación y selección de genotipos de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) sobresalientes en producción de timol y carvacrol. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. 6(1), 25-36.

Soto, L. E., Mata, J. J., Hernández, J. J. V., Rosas, H. G., & Alcalá, V. M. C. 2006. Efecto de diferentes dosis de AIB sobre el enraizamiento de *Ficus benjamina* L. en diferentes épocas del año. *Ra Ximhai: Revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible*, 2(3), 795-814.

Taiz, L. & Zeiger, E. 2013. Fisiología Vegetal. 5ª ed. Porto Alegre, Artmed. pp. 918.

Thiyagarajan, M., & Venkatachalam, P. 2012. Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 111-117.

Urrea, A. I., Castrillón, P. A., & Monsalve, Z. 2009. Propagación *in vitro* y desdiferenciación tisular en *Lippia dulcis*. Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Colombia. *Actualidades Biológicas*, 31 (90), 21-29.

Van-Staden, J. E.; Zazimalova-George, E. F. 2007. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonist. In George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J Plant propagation by tissue culture 3rd Edition The Background Exegetic Basingstone UK. 205-226 pp.

Vásquez, C. D. R. 2012. El orégano de monte (*Lippia organoides*) del Alto Patía: Efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Colombia.

Villavicencio, G., E. E., Cano, P. A. & García, C. X. 2010. Metodología para determinar las existencias de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.) en rodales naturales de Parras de la Fuente, Coahuila. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias (ed), Saltillo Coahuila México, Folleto Técnico Núm. 42, ISBN: 978-607-425-295-8.

Villavicencio, G. E. E., Martínez, B. O. U., Cano, P. A., y Berlanga R. C. A. 2007. Orégano, recurso con alto potencial. *Revista Ciencia y Desarrollo*, 33 (211):60-66.

Wagner, K. H., & Elmadfa, I. 2003. Biological relevance of terpenoids. *Annals of Nutrition and metabolism*, 47(3-4), 95-106.