

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

PROPAGACIÓN DE *Lippia palmeri* WATSON POR CULTIVO DE TEJIDOS



TESIS PROFESIONAL

TODO LO LUMINAN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CON OPCIÓN EN RECURSOS NATURALES TERRESTRES

1942

PRESENTA:

JESÚS URÍAS VALDEZ

Hermosillo, Sonora

Mayo de 2014

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de **Jesús Urías Valdez**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que se aceptada como requisito para obtener el Título de **Licenciado en Biología** con Opción en Recursos Naturales Terrestres.

---

Dra. Gloria Irma Ayala Astorga

Director de Tesis

---

Dra. María Magdalena Ortega Nieblas

Sinodal Secretario

---

Dr. Rubén Armando Corella Bernal

Sinodal

---

M.C. Sergio Alfonso Cantúa Sesteaga

Sinodal suplente

## **DEDICATORIA**

A mí Familia y amigos.

A mis Padres José Luis y Maricela por apoyarme en terminar esta etapa de mi vida y  
alcanzar mis metas.

A mi hermana Clara Melissa por estar a mi lado siempre, te quiero mucho hermanita.

Muchas gracias.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por ser mi Alma Mater y darme la oportunidad de realizar mi formación académica.

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora.

A mi directora de tesis la Dra. Gloria Irma Ayala Astorga, por brindarme su apoyo en la culminación de esta etapa de mi vida y permitirme ser su estudiante, Gracias por su paciencia. A mis asesores de tesis, Dra. María Magdalena Ortega Nieblas y al Dr. Rubén Armando Corella Bernal por dejarme conocer un poco más del orégano y brindarme las facilidades para terminar mi tesis. Al M.C. Sergio Alfonso Cantúa Sesteaga por sus clases de química y sus correcciones. Gracias a todos.

A mis tíos: Mario, Adolfo, Marcela, Mayra, Lourdes y Alma por estar pendientes de mí; a mis primos Mayra, Maritza, Vianey y Víctor gracias por sus palabras de apoyo. A mis pequeñas sobrinas Mayem, Camila, Saori y a mi ahijado Santiago. A mi tía Judith por escucharme y entenderme.

A Valeria Ramírez por ser mi compañera de clases y de muchas aventuras durante la carrera y mis amigos de generación: Ileem, Fernanda y Lastra, Gracias por su amistad.

A mis compañeros de clases, Lulú, Lucy, David, Pacheco, Haydee, Alina y al Z13 por tantos momentos y experiencias vividas.

A la maestra Gloria Rozo (Q.E.P.D.) gracias por sus palabras de apoyo cuando más las necesité.

A Mitzy Abigail Serrano Prado Gracias por adentrarme al mundo de cultivo de tejidos y por aclararme todas mis dudas. A mis compañeros de laboratorio Miriam Preciado, Wendy de la Rosa e Isaac Hernández me fueron de gran ayuda

Y por último a mis amigas de toda la vida Alba, Fabiola, Danira y Claudia gracias por estar en todo momento conmigo.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>LISTA DE TABLAS</b>	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	viii
<b>RESUMEN</b>	ix
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>II. ANTECEDENTES</b>	4
II.1. Descripción	4
II.2. Clasificación Taxonómica	4
II.3. Orégano <i>Lippia palmeri</i> Watson	5
II.4. Usos y Aplicaciones de las Hojas y Aceite Esencial del Orégano	6
II.5. Propagación en Tejido Vegetal	7
II.5.1. Callo	8
II.5.2. Composición del Medio de Cultivo	8
II.5.2.1. Propiedades de las sales inorgánicas o macronutrientes utilizando un medio de cultivo	8
II.5.2.2. Funciones de las sales orgánicas o micronutrientes	9
II.5.2.3. Compuestos orgánicos	10
II.5.2.4. Sustancias gelificantes	11
II.5.2.5. Reguladores de crecimiento vegetal	12
II.5.2.6. Auxinas	12
II.5.2.7. Citocininas	13
II.6. Propiedades en los Parámetros del pH, Temperatura, Fotoperiodo y Desinfección	14
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	16
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	17
<b>V. OBJETIVO GENERAL</b>	18
V.1. Objetivos Específicos	19
<b>VI. METODOLOGÍA</b>	20
VI.1. Material Vegetal	20

VI.2. Desinfección y Siembra	21
V1.3. Medio de Cultivo	22
V1.4. Cortes Vegetativos	23
V1.5. Tratamientos	25
VI.6. Siembra e Incubación de Yemas Germinadas en Laboratorio en los Tratamientos	26
AIB y BAP	
VI.7. Siembra e Incubación de los Tratamientos BAP y cinetina en Yemas Laterales	27
VI.8. Registro de Datos	27
V.I.9. Diseño Experimental	27
<b>VII. RESULTADOS</b>	28
VII.1. Germinación de Semillas de <i>Lippia palmeri</i> Watson	28
VII.2. Tratamiento con Ácido-indol-3-butírico y 6-Bencilaminopurina	28
VII.3. Selección de Tratamiento BAP y Cinetina en Yemas <i>in vitro</i>	32
VII.4. Resultados en el Tratamiento con BAP y Cinetina en Yemas <i>in vitro</i>	32
VII.5. Resultados con Distintas Concentraciones de BAP en Yemas <i>in vitro</i>	35
VII.6. Resultados con Distintas Concentraciones de 6-Bencilaminopurina y Cinetina en Yemas Laterales	39
<b>VIII. DISCUSIONES</b>	42
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	45
<b>X. RECOMENDACIONES</b>	46
<b>XII. LITERATURA CITADA</b>	47

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
I	Composición de nutrientes del medio cultivo basal Woody Plant Medium (WPM).	22
II	Composición de nutrientes del medio cultivo basal de Murashige y Skoog (MS).	23
III	Concentraciones de los reguladores de crecimiento AIB y BAP (M).	25
IV	Concentraciones de 6-Bencilaminapurina (BAP).	26
V	Concentraciones de cinetina.	26
VI	Efectos de la 6-Furfurilaminopurina ( $\text{mgL}^{-1}$ ) sobre yemas <i>in vitro</i> de <i>Lippia palmeri</i> en cuatro semanas de incubación en MS.	33
VII	Efectos de la 6-Bencilaminopurina ( $\text{mgL}^{-1}$ ) sobre yemas <i>in vitro</i> de <i>Lippia palmeri</i> en cuatro semanas de incubación en medio de cultivo MS.	35
VIII	Efectos de la 6-Furfurilaminopurina ( $\text{mgL}^{-1}$ ) sobre yemas <i>in vitro</i> de <i>Lippia palmeri</i> en cuatro semanas de incubación en WPM.	38
IX	Efectos de la 6-Bencilaminopurina ( $\text{mgL}^{-1}$ ) sobre yemas <i>in vitro</i> de <i>Lippia palmeri</i> en cuatro semanas de incubación en WPM.	38
X	Efectos de la 6-Furfurilaminopurina ( $\text{mgL}^{-1}$ ) sobre yemas laterales de <i>Lippia palmeri</i> en cuatro semanas de incubación en MS	39
XI	Efectos de la 6-Bencilaminopurina ( $\text{mgL}^{-1}$ ) sobre yemas laterales de <i>Lippia palmeri</i> en cuatro semanas de incubación en WPM.	39
XII	Efectos de la 6-Furfurilaminopurina ( $\text{mgL}^{-1}$ ) sobre yemas laterales de <i>Lippia palmeri</i> en cuatro semanas de incubación en WPM.	40
XIII	Efectos de la 6-Bencilaminopurina ( $\text{mgL}^{-1}$ ) sobre yemas laterales de <i>Lippia palmeri</i> en cuatro semanas de incubación en WPM.	40



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Pág.</b>
1	Planta de <i>Lippia palmeri</i> silvestre del Puerto Orégano, Álamos, Sonora, México.	5
2	Hojas y frutos colectados de <i>Lippia palmeri</i> Watson.	6
3	Estructura química de una Auxina: Ácido Indol-3-butírico (AIB).	13
4	Estructura química de dos citocininas. a) 6-Benciloaminopurina (BAP). b) 6-Furfurilaminopurina (cinetina).	14
5	Semillas maduras e inmaduras de <i>Lippia palmeri</i> Watson	20
6	Cámara de flujo laminar.	21
7	Cortes vegetativos: a) Selección de la plántula <i>in vitro</i> . b) Cortes de yemas.	24
8	Crecimiento obtenido, a partir de yemas de plantas germinadas <i>in vitro</i> , en medio MS. a) Medio de cultivo MS b) BAP 3 M c) BAP 6 M en cuatro semanas de incubación.	29
9	Crecimiento obtenido a partir de yemas de plantas germinadas <i>in vitro</i> , en medio MS. a) Medio de cultivo MS b) AIB 1 M c) AIB 1.5 M.	30
10	Crecimiento obtenido, a partir de yemas de plantas germinadas <i>in vitro</i> , en medio WPM. a) Medio de cultivo WPM b) BAP 3.	31
11	Crecimiento obtenido de las muestras en el medio de cultivo MS yemas <i>in vitro</i> . a) Medio de cultivo MS b) cinetina 2 mgL <sup>-1</sup> c) cinetina 4 mgL <sup>-1</sup> d) cinetina 6 mgL <sup>-1</sup> .	34
12	Crecimiento obtenido de las muestras en el medio de cultivo MS yemas <i>in vitro</i> . a) Medio de cultivo MS b) BAP 3 mgL <sup>-1</sup> c) BAP 6 mgL <sup>-1</sup>	36
13	Enraizamiento de cortes vegetativos realizados a plantas cultivadas <i>in vitro</i> en medio de cultivo MS.	37
14	Crecimiento obtenido de las muestras en el medio de cultivo MS de yemas laterales recolectadas del Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora. a) Medio de cultivo MS b) BAP 3 mgL <sup>-1</sup> c) Medio de Cultivo MS d) cinetina 2 mgL <sup>-1</sup>	41

## RESUMEN

*Lippia palmeri* Watson es una planta arbustiva del noroeste de México; importante por sus propiedades industriales y comerciales. En el presente trabajo se utilizó la técnica de cultivo de tejidos para propagarla en laboratorio, la cual nos proporcionó un método de multiplicación clonal de plantas, con ayuda de hormonas de crecimiento vegetal donde se obtuvieron clones del *L. palmeri*. Se realizaron cinco experimentos con el propósito de evaluar el crecimiento de explantes de *Lippia palmeri* por medio del cultivo de tejidos *in vitro*. Se utilizaron semillas germinadas de Orégano para el experimento, así como la de yemas laterales provenientes de plántulas cultivadas en campo. Se utilizó dos medios de cultivo el primero Murashige y Skoog (MS) y el segundo Woody Plant Medium (WPM), sin concentraciones hormonales, esto para la obtención de explantes provenientes de semillas de orégano anteriormente recolectadas. En el primer experimento se utilizaron los dos medios de cultivo con diferentes concentraciones de Ácido Indol-3-butírico (AIB) y de 6-bencilaminopurina (BAP) sobre brotes de semillas germinadas en laboratorio. Se observó que para los medios de cultivo que contenían AIB, los brotes sembrados formaron callo, mientras que los medios en el que se usó BAP, produjo la formación de pequeñas hojas, por lo cual se propuso realizar otros cuatro experimentos pero esta vez conteniendo los reguladores de crecimiento 6-bencilaminopurina (BAP) y Cinetina con ambos medios de cultivo (MS y WPM). Se incubaron yemas laterales (de plantas de campo) donde el medio de cultivo MS con concentración  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de cinetina fue el que más favoreció en el crecimiento de la planta. En el mismo medio de cultivo se observó que las yemas *in vitro* obtuvieron mayor crecimiento en la concentración  $4 \text{ mgL}^{-1}$  de Cinetina. Mientras que en el medio de cultivo WPM con ambos explantes de yemas laterales y yemas *in vitro* no hubo un crecimiento considerable.

## I. INTRODUCCIÓN

Desde la colonización del territorio Mexicano, el hombre ha realizado actividades productivas como la agricultura, la ganadería, la minería y la explotación forestal; esta última causa severos daños a la vegetación natural provocando modificaciones o destrucción en el suelo. Entre los factores que han afectado o perturbado la vegetación están: el desmonte, el sobrepastoreo, la tala desmedida, los incendios y la explotación selectiva de algunas especies de uso común (Rzedowski, 2006).

Las plantas se encuentran en el primer nivel de la cadena alimenticia ya que proporcionan alimento para los seres vivos a través de la captura de energía del sol durante el día. Desde años Los vegetales han sido poco a poco mejoradas con la selección de individuos productivos, induciendo la realización de híbridos los cuales han formado la revolución verde (Martínez et al., 2004).

Uno de los métodos más eficaces para la obtención de plantas es la Micropropagación, la cual, por medio de la propagación asexual de cualquier tejido de la planta permite obtener un clon (individuos genéticamente idénticos descendientes de un mismo individuo por mecanismos de reproducción asexual) de la planta madre en condiciones de temperatura, luz y humedad controladas (George et al., 2008). La aplicación del cultivo de tejidos es muy amplio; entre las técnicas utilizadas está la clonación de plantas, producción de metabolitos secundarios, conservación de germoplasma y aunado a la ingeniería genética se han transferido de manera directa genes a los vegetales, lo cual se aprovecha para mejorar el cultivo de plantas y desarrollar metodologías para la obtención de productos nuevos (Pérez et al., 1999).

El cultivo de tejidos es el conjunto de técnicas que permite obtener una planta completa a partir de cualquier parte de sus tejidos en condiciones asépticas, controlando luz, temperatura y humedad (Dagla, 2012).

Las plantas in vitro pueden almacenarse por mucho tiempo utilizando alguna técnica de conservación como la refrigeración o criopreservación, de esta manera se reduce el espacio

físico, la mano de obra y la contaminación de los cultivos, además de la variabilidad genética (Calva y Pérez, 2005).

Los reguladores de crecimiento vegetal inician el desarrollo de brotes y raíces en explantes (tejido vivo, separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento) o embriones en medios de cultivo líquidos o semilíquidos. También estimulan la división y la expansión celular. En algunas ocasiones los tejidos o un explante son autótrofos y pueden producir sus propios suplementos de hormonas vegetales (Beyl, 2000).

Las hormonas vegetales tradicionales son las auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y ácido abscísico (Segura, 2000a). Las Auxinas se sintetizan en tejidos meristemáticos, como yemas en brotación, hojas jóvenes, extremidades de raíz. La función principal que realizan es la elongación celular. Las citocininas son las promotoras de la división celular y también participan en la elongación y la diferenciación de las células cuando interactúan con una auxina. El efecto de la citocinina depende de la concentración, la cual puede inhibir o promover el desarrollo radicular. Se ha demostrado que una citocinina puede estimular el aumento de la masa seca y crecimiento de las raíces (Lima et al., 2010).

El orégano (*Lippia palmeri* Watson) tiene un gran valor comercial en el noroeste de México; es aprovechado como sazónador en la cocina nacional e internacional y genera beneficios en la medicina, pues es un tónico amargo que estimula el crecimiento de la flora intestinal y combate algunas afecciones digestivas espasmos intestinales u otros dolores abdominales; se aconseja la infusión de las hojas para aliviar los dolores de estómago. Es un antiséptico, que contribuye en tratamientos contra afecciones de las vías respiratorias como bronquitis, amigdalitis; es útil para prevenir el asma. Se extrae aceite para la producción de fármacos industriales para exportación (Blanco et al., 2005). Diferentes extractos provenientes de la hojas y del aceite esencial de orégano ha sido reportado por sus propiedades antibacterianas, insecticidas, acaricidas y anticancerígeno (Zhang et al., 2010; Pascual et al., 2001 y Ortega-Nieblas, 2011).

Es importante establecer y aplicar una metodología adecuada para la obtención de plantas de orégano *Lippia palmeri* a través del cultivo de tejidos vegetales; La producción masiva de *L. palmeri* sería de gran ventaja en la obtención de plantas para su uso alimentario,

medicinal e industrial, además, con la técnica de propagación clonal se podrían reducir costos disminuyendo así el impacto para la planta en su estado natural debido a que se obtendrían explantes en laboratorio, que se trasplantarían al invernadero y después al campo de cultivo.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Descripción

El género *Lippia* es considerado el de mayor producción comercial, entre las especies que destacan son *Lippia berlandieri* Shauer y *Lippia graveolens*. Las entidades de Durango, Guanajuato, Jalisco, Querétaro, San Luis Potosí y Zacatecas son los estados que producen más orégano comercial (Hernández et al., 2012).

*Lippia palmeri* Watson pertenece a la familia Verbenacea, es importante por sus propiedades aromáticas y medicinales; se distribuye en los Estados de Sinaloa, Baja California Sur y Sonora (Corella et al., 2007), a esta familia pertenecen los géneros *Lippia* con tres especies y *Lantana* con dos especies (Wills, 1973). La distribución del género *Lippia* va desde la república mexicana hasta Argentina. Existiendo una mayor proporción de especies en los países de Brasil, Argentina, México y Paraguay, donde las especies *Origanum vulgare* y *Oreganum onitis* son aprovechadas para la medicina y la cosmetología (Bassols y Gurni, 1996).

### II.2. Clasificación Taxonómica

Reino	Plantae
Subreino	Viridiaeplantae
Superdivisión	Tracheophyta
División	Euphyllophytina
Clase	Spermatopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Verbenaceae
Subfamilia	Rhododendroideae
Género	<i>Lippia</i>
Especie	<i>palmeri</i> (Watson, 1889).

### II.3. Orégano *Lippia palmeri* Watson

*Lippia palmeri* Watson se distribuye en los climas áridos y semiáridos del estado de Sonora. Es una planta arbustiva con ramificaciones, puede alcanzar una altura entre 0.70 y 1.20 m y una cobertura foliar de 0.30 a 0.80 m. Su altura y diámetro foliar varía dependiendo de las condiciones ambientales (temperatura, lluvia y suelo) (Ortega et al., 2008).

Es un arbusto aromático y con un gran sabor; en zonas cálidas su olor es de mayor intensidad, con un sabor picante y con un perfume muy persistente. En el Noroeste de México el *Lippia palmeri* tiene una amplia distribución y abundancia, por lo cual es comercializado por la industria farmacéutica, de licores, cosméticos, alimento y semillero. Las hojas se utilizan por sus propiedades tónicas digestivas y antiasmáticas, se puede encontrar en cerros y laderas de los estados de Sonora (Fig. 1) y Sinaloa; así como también en la península de Baja California (CONAFOR, 2008).



Figura 1. Planta de *Lippia palmeri* silvestre del Puerto Orégano, Álamos, Sonora, México.

#### II.4. Usos y Aplicaciones de las Hojas y Aceite Esencial del Orégano

El orégano tiene una gran demanda debido a que su hoja posee gran contenido de aceite esencial, el cual es aprovechado por recolectores mexicanos para venderlo e incrementar sus ingresos; El litro de aceite tiene un costo de US\$180 en el mercado internacional. El orégano no es aprovechado completamente por lo cual es importante utilizar los residuos de la planta (tallos) y los producidos por la extracción de aceite (bagazo de hoja) para producir nuevos productos (Corral et al., 2011). El aceite de orégano se utiliza como ingrediente activo; para elaborar pomadas antiartríticas y dermatológicas e incluso se utiliza en la industria de los cosméticos, para fijar el aroma perfumes y jabones. Además es un sazonador de muchos platillos de la cocina Mexicana y de muchos otros países en el mundo (CONAFOR, 2008).

La recolecta de orégano en el territorio Mexicano es de aproximadamente 4000 toneladas por año y la materia prima es recolectada de la vegetación forestal y de algunos cultivos (Huerta, 1997). Las especies de orégano Mexicano tienen aproximadamente más de 20 años de ser utilizadas industrialmente y se colecta cada año de manera silvestre. El género *Lippia* posee una gran diversidad de usos, es un recurso de valor incalculable, el cual se debe de aprovechar de manera sostenible implementando programas de manejo y propagación (López et al., 2011).



Figura 2. Hojas y frutos colectados de *Lippia palmeri* Watson.



## II.5. Propagación en Tejido Vegetal

La propagación *in vitro* es el cultivo aséptico de tejidos celulares y órganos en frascos de vidrio o recipientes de plástico. La técnica del cultivo de tejidos consiste en sembrar un embrión u otro tipo de muestra que tenga potencialidad de regenerarse en condiciones asépticas utilizando nutrientes y hormonas. Las plantas tienen una capacidad especial para generar una planta completa de un tejido obtenido de una planta madre, lo que se conoce como clon (Couselo et al., 2010). Una propiedad que tienen los tejidos vegetales, es que pueden aislarse y ser cultivados en un medio nutritivo adecuado (Peña, 2000).

La propagación asexual por cultivo de tejidos se puede resumir en los siguientes pasos:

1. Se selecciona un explante (semillas o alguna parte de la planta) previamente desinfectada.

2. El explante se transfiere a un tubo de ensayo o frasco conteniendo medio de cultivo con reguladores de crecimiento vegetal. El procedimiento se debe de hacer con cuidado para no causar contaminación en el explante.

3. Se espera el crecimiento durante semanas o meses en el cual el explante sembrado en el medio nutritivo producirá nuevos crecimientos, los cuales pueden ser cortados (divididos) y multiplicado durante muchas ocasiones.

4. La división se hace bajo condiciones estériles, los cortes adquiridos son sembrados en tubos con medio de cultivo conteniendo reguladores de crecimiento vegetal.

5. Se espera el desarrollo de los cortes realizados inducidos por reguladores de crecimiento en el medio nutritivo en incubación en condiciones controladas.

6. Después se realiza la transferencia de las pequeñas plántulas desde los frascos a recipientes conteniendo suelos especiales bajo condiciones de invernadero.

7. Las plantas obtenidas son transferidas al aire libre para su aclimatación. (Williams y Rice, 1997; Suárez et al., 2006).

### **II.5.1. Callo**

Al crecimiento desorganizado de células a partir de tejidos de plantas se le conoce como callo. El callo se inicia a partir de una pequeña parte de un órgano o tejido vegetal llamado explante en un medio nutritivo solidificado en condiciones estériles (Baranjha y Ghosh, 2005).

Los tejidos del callo pueden servir como un sistema experimental para investigar y resolver problemas de investigación básica en la citología, fisiología, morfología, anatomía, bioquímica, patología y genética. Los tejidos de órganos de las plantas pueden ser estimulados para formar callo. Algunos factores químicos como la nutrición mineral y los reguladores de crecimiento pueden ocasionar el callo, también los factores ambientales como la luz, temperatura, humedad y la constitución genética o genotipo de la planta (Caponetti, 2000).

### **II.5.2. Composición del Medio de cultivo**

El complemento básico de los medios de cultivo son las sales minerales, una fuente de carbono, vitaminas y hormonas vegetales. Pueden ser líquidos y se les añade agar, son semisólidos o sólidos, se controlan las condiciones ambientales como la luz, el fotoperiodo, la temperatura y humedad (Peña, 2000).

#### **II.5.2.1. Propiedades de las sales inorgánicas o macronutrientes utilizando un medio de cultivo**

Los macronutrientes se caracterizan por tener punto de fusión alto y muchos son solubles en agua (Kyte y Kleyn, 2000), de los cuales se utilizan los siguientes:

**Calcio:** Forma la pectina, una sustancia que mantiene unidas las paredes celulares. Controla la permeabilidad y facilita el transporte de aminoácidos y carbohidratos por todo la planta. Provoca el desarrollo de raíces. La falta de calcio se puede ver reflejada en las puntas muertas de un brote o raíz (Kyte y Kleyn, 2000).

**Hierro:** Participa en la síntesis de clorofila. Además actúa en la conversión de energía en la fotosíntesis (proceso por el cual bióxido de carbono y agua, con la ayuda de clorofila y luz, se convierte en carbohidratos y el oxígeno es liberado). La planta que carece de Hierro presenta un color amarillento en hojas jóvenes (Kyte y Kleyn, 2000).

Magnesio: Es el elemento central en todas las moléculas de clorofila y es un importante activador enzimático. Una cantidad inferior de magnesio provoca que las hojas se vuelvan pálidas (Kyte y Kleyn, 2000).

Nitrógeno: Influye principalmente en el crecimiento de la planta. Es un elemento esencial en la composición molecular de ácidos nucleicos, proteínas, clorofila, aminoácidos, alcaloides y algunas hormonas vegetales. El Nitrógeno en exceso provoca que la fruta no se desarrolle (Kyte y Kleyn, 2000).

Fósforo: Es muy abundante en tejido meristemático. Como parte de las moléculas de DNA y ATP (adenina trifosfato), es un elemento esencial en la fotosíntesis y respiración y afecta la maduración y desarrollo de la planta. La falta de fósforo provoca un crecimiento lento y color rojo púrpura (Kyte y Kleyn, 2000).

Potasio: es necesario para que se lleve a cabo la división celular y promueve el crecimiento meristemático. Ayuda en la síntesis de carbohidratos y proteínas, en la fabricación de clorofila y en la reducción de nitratos. Un bajo contenido de potasio hace que las plantas sean débiles y anormales (deformes u hojas muertas) (Kyte y Kleyn, 2000).

Azufre: Promueve el desarrollo de las raíces y el follaje verde oscuro (Kyte y Kleyn, 2000).

#### **II.5.2.2. Funciones de las sales orgánicas o micronutrientes**

Boro: Desempeña un papel importante en el transporte de azúcares, agua y hormonas. También se relaciona con el metabolismo del nitrógeno, frutos y la división celular, balancea el azúcar y el almidón. Un exceso de boro provoca debilidad o muerte (Kyte y Kleyn, 2000).

Cloro: Estimula la fotosíntesis y el crecimiento en la planta. La falta de cloro se relaciona con hojas marchitas y amarillas e incluso la muerte de la planta (Kyte y Kleyn, 2000).

Cobalto: Es un elemento de la molécula vitamina B<sub>12</sub> y es esencial para la fijación del nitrógeno (Kyte y Kleyn, 2000).

Cobre: Se cree que es necesario para la conversión de energía como una alternativa. La deficiencia o falta de cobre provoca disminución del crecimiento, deformidades, hojas manchadas (Kyte y Kleyn, 2000).

Yodo: No se le considera un elemento esencial, pero es un componente de algunos aminoácidos (Kyte y Kleyn, 2000).

Manganeso: Es un elemento esencial en la membrana del cloroplasto. La carencia de manganeso se caracteriza por hojas amarillas (Kyte y Kleyn, 2000).

Molibdeno: Ayuda en la conversión de nitrógeno a amonio y en su fijación (Kyte y Kleyn, 2000).

Zinc: Activa varias enzimas, ayuda en la formación de la clorofila y en la producción de la auxina ácido indolacético (AIA). La falta de zinc en la planta provoca deformidad en la raíz y las hojas cambian de color bronce a amarillo hasta deformarse. Un exceso de zinc es tóxico en la planta (Kyte y Kleyn, 2000).

### **II.5.2.3. Compuestos orgánicos**

En los carbohidratos se encuentran sustancias químicas orgánicas importantes como los azúcares, almidones y celulosas. El carbono, hidrógeno y oxígeno son elementos primarios los cuales componen las moléculas de carbohidratos. Las plantas que se desarrollan en cultivos *in vitro* no pueden fabricar el azúcar que se requiere, así que debe de agregarse el medio de cultivo una fuente de carbono necesaria para el crecimiento de la planta (Kyte y Kleyn, 2000).

Sacarosa: Es la fuente de carbono y es la más utilizada en los medios de cultivo, la concentración varía de 2 a 3 %, en algunas especies se utilizan concentraciones muy altas (5 a 12 %). En ocasiones se utiliza la glucosa, fructosa y almidón para algunas especies. La respuesta de los genes de una planta a los carbohidratos puede variar, algunos genes son inducidos y otros son reprimidos. El azúcar es importante para la regulación celular en las plantas (Hurtado y Merino, 2001; George et al., 2008).

Vitaminas: El complejo vitamina B es parte esencial del metabolismo en la planta y para su posterior crecimiento. Las sustancias más comúnmente utilizadas en los medios de

cultivo son: tiamina (es la vitamina más importante, se involucra en el metabolismo de carbohidratos y biosíntesis de algunos aminoácidos), ácido nicotínico y piridoxina, los cuales son miembros del complejo de vitamina B (Kyte y Kleyn, 2000).

Adenina: Es importante para las células como parte de las sustancias nucleares (ADN y RNA). Tiene un efecto débil de citocinina. La adenina es utilizada como sulfato de adenina la cual provoca la formación de tallos (Kyte y Kleyn, 2000).

Inositol: Es un alcohol de azúcar en el complejo B que se requiere en los medios de cultivo. Se encuentra en forma de fosfato y se encuentra en las membranas, sobre todo en los organelos de los cloroplastos (Kyte y Kleyn, 2000).

Ácido nicotínico: Es una coenzima activa en reacciones de baja energía. Por lo general para la elaboración de medio nutritivo se requiere en bajas concentraciones (Kyte y Kleyn, 2000).

Piridoxina: Sirve como coenzima en algunas de las reacciones químicas del metabolismo. En medios de cultivo se incluye en forma de clorhidrato (Kyte y Kleyn, 2000).

Tiamina: Es esencial en los medios de cultivo porque trabaja como una coenzima en el ciclo de la respiración (Kyte y Kleyn, 2000).

#### **II.5.2.4. Sustancias gelificantes**

Se debe utilizar Agar puro para el cultivo de tejidos vegetales; debido a que el agar de mala calidad interviene o inhibe el crecimiento de cultivos (Trigiano y Gray, 2000).

Agua: Es el componente más importante de la planta debido a que se encuentra entre un 80%-90% del peso fresco en hierbas y más del 50% de las partes leñosas, coordina directa o indirectamente, en los procesos fisiológicos (Beyl, 2000).

En los medios de cultivo, se requiere agua de muy buena calidad, sin metales, es decir, agua desionizada. El agua ordinaria contiene cationes, aniones, varias partículas, microorganismos y gases que la hacen inapropiada para el uso en medios de cultivo. El agua destilada, así como el agua desionizada son las mejores para ser utilizadas en la elaboración del medio de cultivo (Trigiano y Gray, 2000).

### **II.5.2.5. Reguladores de crecimiento vegetal**

Las hormonas vegetales, también denominadas fitohormonas o reguladores de crecimiento vegetal, son algunos componentes químicos sintetizados en algún lugar de la planta, los cuales se transportan a otra parte del vegetal donde actúan en bajas concentraciones, regulando el crecimiento y desarrollo de la plántula entre otras funciones. Entre los reguladores existentes están las auxinas, citocininas y giberelinas que elongan la célula vegetal; y por otro lado el Ácido abscísico y el etileno que inhiben la división celular (Rojas et al., 2003). Generalmente el crecimiento, diferenciación y organogénesis de tejido viene siendo fiable agregándole una o más hormonas vegetales a el medio de cultivo (Sathyanarayana y Varghese, 2007). Ninguna hormona vegetal ejerce un control único de alguna fase fisiológica, por lo que trabajan en conjunto con otras fitohormonas (Segura, 2000 b).

### **II.5.2.6. Auxinas**

Son hormonas de crecimiento vegetal, son importantes debido a que estimulan el crecimiento de las células de los brotes (Coletto, 1995; Gómez y García, 2006) (Fig. 3).

Propiedades de las Auxinas:

Actividad en el crecimiento celular. El incremento de la plasticidad de la pared esquelética permite la entrada de agua a la célula; provocando que la resistencia de la pared disminuya y que la célula se alarga.

Modifica la permeabilidad de la membrana. Las auxinas provocan una acidificación la cual debilita la resistencia de la pared celular.

Participa en el metabolismo, principalmente en síntesis de RNA ribosomal.

Induce la división celular en células de origen.

Actúa en la síntesis del etileno, el cual dependiendo de una cierta concentración vuelve a actuar para regular la concentración de auxina en el nivel de transporte.

Retarda la caída de hojas y frutos (Bourne, 1996; Pérez et al., 1999).

La formación de raíces adventicias, la dominancia apical y el desarrollo de frutos (Echeverría et al., 2000).

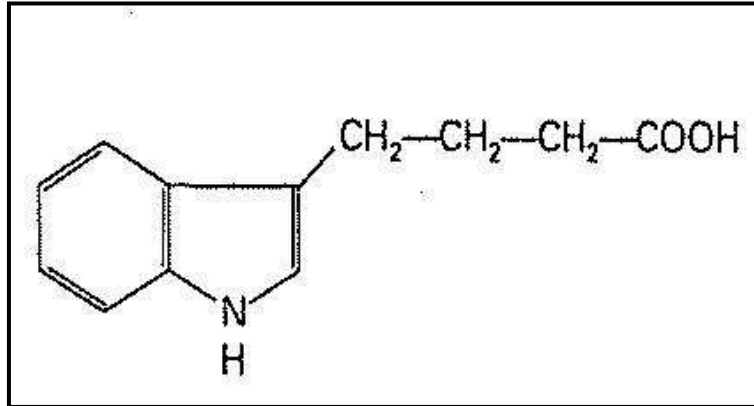


Figura 3. Estructura química de una auxina. Ácido Indol-3-butírico (AIB) (Echeverría et al., 2000).

### II.5.2.7. Citocininas

Son fitohormonas provenientes de la purina, realizan la división celular de los tejidos de la plantas con ayuda de las auxinas (Coletto, 1995; Gómez y García, 2006).

Las propiedades más importantes de las Citocininas:

Estimula el crecimiento de tallos y ramas.

Elimina la dormancia de las yemas y semillas de muchas especies.

Produce efecto en el fenómeno de dominancia apical (Bourne, 1996; Pérez et al., 1999).

Fomenta la división y la expansión celular.

Retarda la senescencia en las hojas.

Estimula la síntesis de pigmentos.

En conjunto con las giberelinas, las citocininas (Fig. 4) modifican la estructura de las hojas en las plantas. La cantidad de citocininas en las plantas depende de su biosíntesis, interconversiones metabólicas y degradación (Segura, 2000 b).

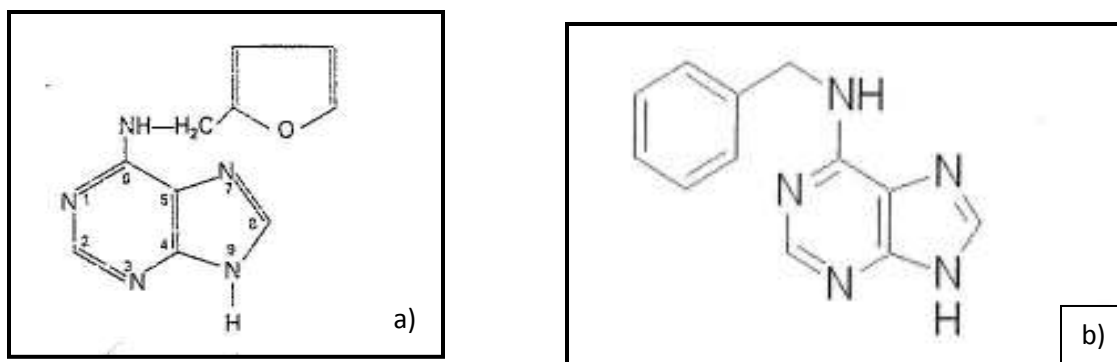


Figura 4. Estructura química de dos citocininas. a) 6-Benciloaminopurina (BAP). b) 6-Furfurilaminopurina (cinetina) (Segura, 2000 b).

## II.6. Propiedades en los Parámetros del pH, Temperatura, Fotoperiodo, y Desinfección

El pH es de suma importancia para el desarrollo de la planta. Un pH no óptimo limita la absorción de los nutrientes, mientras que un medio de cultivo con pH ácido ocasiona problemas en el crecimiento y dificulta la asimilación de calcio, magnesio y potasio (<http://www.botanical-online.com/ph.htm>). El rango adecuado para el crecimiento en una planta está entre 5.5 a 7.0. Un pH 7.0 es neutro, debajo de este nivel es ácido y por encima es alcalino (Hudson y Dale, 1986).

La temperatura es otro de los factores importantes que se debe de tomar en cuenta en el cultivo de tejidos, interviene directamente en los procesos de regulación del metabolismo primario o secundario, además interviene en el desarrollo de los procesos fisiológicos (Plucknett y Williams, 1992).

La cantidad de luz es de gran importancia para la planta, influye en su crecimiento y desarrollo (García et al., 2006), por lo tanto se debe tener un control de la luz en los cultivos que se desarrollan in vitro para lograr obtener plantas sanas para el posterior uso de ellas.

El área de trabajo deberá presentar siempre condiciones de asepsia, para que no haya contaminación de los explantes por patógenos externos y asegurar así la probabilidad de tener un cultivo exitoso. Las manos deben de estar limpias lavándolas con agua y jabón. También se debe de utilizar cubre bocas cuando se esté llevando a cabo la siembra dentro de la cámara de



flujo laminar, es la que proporciona las condiciones asépticas y es importante limpiarla con alcohol y utilizar los rayos UV durante cierta cantidad de tiempo para eliminar patógenos indeseados. Durante la desinfección del material vegetal, se encuentran algunos dilemas entre los cuales persisten la capacidad que tienen los agentes desinfectantes para dañar los tejidos vegetales y la existencia de organismos contaminantes y perjudiciales dentro del tejido vegetal. Se ha recomendado reducir la concentración y tiempo de lavado de los agentes que son utilizados para la desinfección de los explantes (Robles y Ballesteros, 2006).

### III. JUSTIFICACIÓN

El orégano constituye un recurso natural que crece en las zonas áridas y semiáridas del país, es de gran valor para la conservación de suelos debido a que las raíces de las plantas evitan la erosión y así se preservan mejor los ecosistemas; además tiene un gran impacto comercial y social; a partir de este recurso, se obtienen productos de uso casero e industrial. El problema que presenta esta planta, es que se tiene un mal manejo a nivel silvestre debido a que los colectores cortan la planta completa y en la sombra separan las hojas; es muy importante contar con un plan de aprovechamiento y conservación del orégano o de producción del mismo para no dañar sus poblaciones.

El cultivo *in vitro*, sería una buena alternativa para implementar la germinación de manera rápida a partir de cualquier parte de los tejidos (hojas, tallo, raíz y semilla) de la planta del orégano, sin provocar un deterioro en las poblaciones silvestres.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Los reguladores de crecimiento AIB (ácido indol-3-butírico), BAP (6-bencilaminopurina) y Cinetina (6-Furfurilaminopurina) estimulan el desarrollo de plántulas de orégano *Lippia palmeri* W. por cultivo de tejidos.

## **V. OBJETIVO GENERAL**

Establecer una metodología para la propagación de orégano *Lippia palmeri* W. a través de cultivo de tejidos.

### **V.1. Objetivos Especificos**

- 1) Obtener plantas de *Lippia palmeri* Watson *in vitro*, a partir de semillas y yemas laterales de plantas creciendo en campo por medio de cultivo de tejidos.
- 2) Determinar la capacidad de regeneración de yemas de las plantas germinadas *in vitro* y de yemas laterales de plantas creciendo en el campo utilizando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.
- 4) Determinar la concentración de reguladores de crecimiento adecuada para la inducción de brotes en el medio de cultivo.

## VI. METODOLOGÍA

### VI.1. Material Vegetal.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos, en el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (D.I.C.T.U.S).

Obtención de yemas:

Yemas laterales: De las plantas colectadas en la parcela del Departamento de Agricultura y Ganadería (longitud y latitud), se recolectaron estacas con 4 a 5 entrenudos, las cuales fueron llevadas al laboratorio de cultivo de tejidos, se lavaron con agua de la llave y se extrajeron yemas laterales para posteriormente ser colocadas en el medio de cultivo.

Yemas in vitro: Por otra parte, se obtuvieron las yemas provenientes de las plantas germinadas por semillas *in vitro*. Para lo cual las semillas obtenidas a partir de los frutos de la planta de orégano (Fig.5), se sometieron a remojo durante 24 horas en agua desionizada y posteriormente se sembraron en el medio nutritivo.



Figura 5. Semillas maduras e inmaduras de *Lippia palmeri* Watson

## VI.2. Desinfección y Siembra

Las semillas del orégano, fueron obtenidas al separarlas del fruto capsular. Se seleccionaron semillas de *Lippia palmeri* con un color más oscuro, se sumergieron en agua desionizada durante 24 horas previa a la desinfección. Para la desinfección de las semillas se utilizó alcohol al 96% por un minuto y después en una solución de hipoclorito de sodio al 20% al cual se le agregó una gota de detergente tween 20 por 12 minutos, se hicieron 3 enjuagues con agua desionizada, las semillas fueron envueltas en hojas de papel tissue (4x6 pulgadas). Este procedimiento se realizó en condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar (Marca Edge Gard Hood).

Para las yemas laterales anteriormente cortadas directamente de la planta, se realizó el mismo procedimiento de desinfección.

La siembra de semillas en medio nutritivo, se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar (Fig. 6) previamente desinfectada con alcohol etílico, se mantuvieron las condiciones asépticas con mecheros de alcohol. Las semillas sembradas en medio de cultivo se colocaron en el cuarto de incubación, al germinar y alcanzar una altura de 4-5 cm, se le efectuaron cortes para extraer muestras (yemas) y sembrarlas en nuevos medios de cultivos con reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones para obtener plantas y realizar otros tratamientos.



Figura 6. Cámara de flujo laminar.

### V1.3. Medio de Cultivo

Se utilizaron los medios de cultivos WPM (tabla I) y MS (tabla II), se agregó 20 mL a tubos de ensaye y frascos de cultivo, después se esterilizó en una autoclave modelo Sterilmatic, durante 15 minutos a 121 °C y una presión de 15 lb. Se utilizó el mismo medio de cultivo en los tratamientos adicionando los reguladores de crecimiento AIB con concentraciones (0, 1 y 1.5 M) y BAP con (0, 3 y 6 M).

Las yemas cortadas de las plantas recolectadas se sembraron en medio WPM (Tabla I) y MS (Tabla II) conteniendo dos citocininas BAP y cinetina.

Tabla I. Composición de nutrientes del medio cultivo basal Woody Plant Medium (WPM).

Compuesto	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )	Compuesto	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	<b>400</b>	<b>CuSO<sub>4</sub>*5H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.025</b>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	<b>556</b>	<b>FeSO<sub>4</sub>*7H<sub>2</sub>O</b>	<b>27.8</b>
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>990</b>	<b>Na<sub>2</sub>EDTA*2H<sub>2</sub>O</b>	<b>3.4</b>
CaCl <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O	<b>96</b>	<b>m-Inositol</b>	<b>100</b>
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	<b>370</b>	<b>Ácido nicotínico</b>	<b>0.5</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>170</b>	<b>Piridoxina*HCl</b>	<b>0.5</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	<b>6.2</b>	<b>Tiamina*HCl</b>	<b>0.1</b>
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	<b>22.3</b>	<b>Glicina</b>	<b>2.0</b>
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	<b>8.6</b>	<b>Sacarosa</b>	<b>0.03</b>
NaMoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	<b>0.25</b>	<b>Agar</b>	<b>0.008</b>

(Trigiano y Gray, 2000).



Tabla II. Composición de nutrientes del medio cultivo basal Murashige & Skoog (MS).

Compuesto	Concentración ( mgL <sup>-1</sup> )	Compuesto	Concentración ( mgL <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	<b>4650</b>	<b>CuSO<sub>4</sub>*5H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.025</b>
KNO <sub>3</sub>	<b>1900</b>	<b>FeSO<sub>4</sub>*7H<sub>2</sub>O</b>	<b>27.8</b>
KI	<b>0.83</b>	<b>Na<sub>2</sub>EDTA*2H<sub>2</sub>O</b>	<b>3.4</b>
CaCl <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O	<b>440</b>	<b>m-Inositol</b>	<b>100</b>
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	<b>370</b>	<b>Ácido nicotínico</b>	<b>0.5</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>170</b>	<b>Piridoxina*HCl</b>	<b>0.5</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	<b>6.2</b>	<b>Tiamina*HCl</b>	<b>0.1</b>
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	<b>22.3</b>	<b>Glicina</b>	<b>2.0</b>
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	<b>8.6</b>	<b>Sacarosa</b>	<b>0.03</b>
NaMoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	<b>0.25</b>	<b>Agar</b>	<b>0.008</b>
CoCl <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O	<b>0.025</b>		

(Murashige & Skoog, 1962).

#### V1.4. Cortes Vegetativos

Se realizaron cortes vegetativos (yemas) en plantas de semillas germinadas *in vitro*, que estaban en incubación para ser sembrados en el medio de cultivo, (Fig. 7). Los cortes se efectuaron dentro de la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas (Fig. 6), para posteriormente sembrarlas en medio cultivo WPM y MS adicionado con reguladores de crecimiento BAP y AIB en diferentes concentraciones (M).

A las estacas colectadas de la parcela del Departamento de Agricultura y Ganadería, se le extrajeron yemas de los brazos axilares; las cuales fueron sometidas a los métodos de desinfección anteriormente mencionados. Posteriormente fueron incubados en medio de cultivo MS y WPM con diferentes concentraciones de BAP y cinetina (mgL<sup>-1</sup>) en la cámara de flujo laminar.

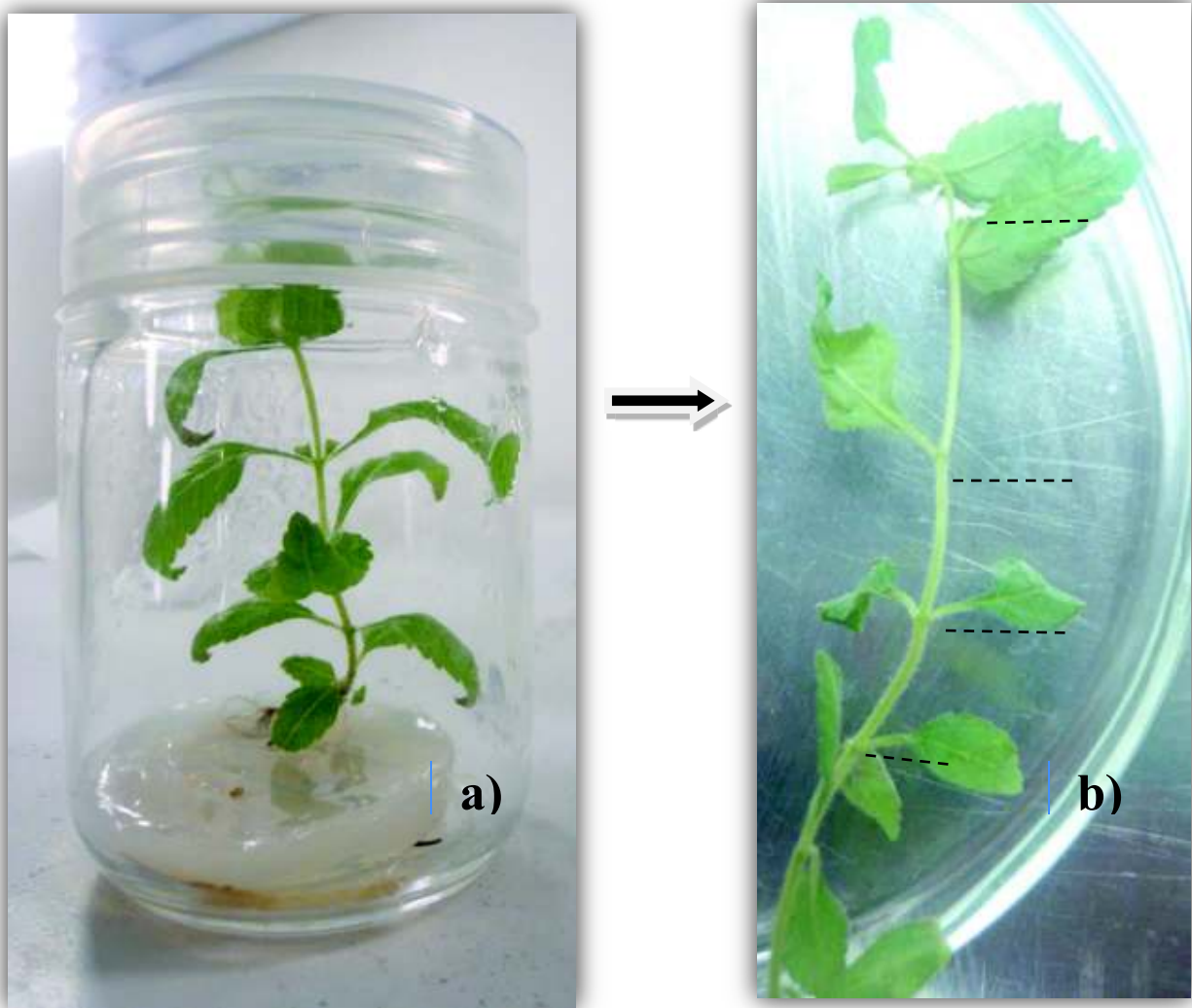


Figura 7. Cortes vegetativos: a) Selección de la plántula *in vitro*. b) Cortes de yemas.

### V1.5. Tratamientos

A los medios de cultivo se les adicionaron los siguientes reguladores de crecimiento para observar su efecto sobre las yemas *in vitro*: auxina: ácido indol-3-butírico (AIB) en tres diferentes concentraciones (0, 1 y 1.5 M) y la citocinina: 6-bencilaminapurina (BAP) en tres diferentes concentraciones (0, 3 y 6 M) (Tabla III), se llevó a cabo la combinación de ambas para obtener un total de nueve tratamientos en ambos medio de cultivo MS y WPM, cada uno con 10 repeticiones. La unidad experimental fueron tubos de ensaye y frascos tipo gerber con un explante (muestra) cada uno.

Tabla III. Concentraciones de los reguladores de crecimiento AIB y BAP (M).

<b>AIB</b>	<b>BAP</b>
<b>0</b>	<b>0</b>
<b>0</b>	<b>3</b>
<b>0</b>	<b>6</b>
<b>1</b>	<b>0</b>
<b>1</b>	<b>3</b>
<b>1</b>	<b>6</b>
<b>1.5</b>	<b>0</b>
<b>1.5</b>	<b>3</b>
<b>1.5</b>	<b>6</b>

Con las yemas laterales (yemas de las plantas del campo) se utilizaron las citocininas: BAP y Cinetina. La 6-bencilaminapurina (BAP) en tres diferentes concentraciones (0, 3 y 6 mgL<sup>-1</sup>) (Tabla IV) y cinetina (0, 2, 4 y 6m) (Tabla V). Se utilizaron 9 tratamientos con diferentes concentraciones de citocininas con 10 repeticiones cada uno en cada medio de cultivo (MS y WPM). Las unidades experimentales fueron 90 frascos con 5 explantes cada uno.

Tabla IV. Concentraciones de 6-Bencilaminapurina (BAP).

<b>BAP mgL<sup>-1</sup></b>
<b>0</b>
<b>3</b>
<b>6</b>

Tabla V. Concentraciones de cinetina.

<b>CINETINA mgL<sup>-1</sup></b>
<b>0</b>
<b>2</b>
<b>4</b>
<b>6</b>

#### **VI.6. Siembra e Incubación de Yemas Germinadas en Laboratorio en los Tratamientos AIB y BAP**

Se realizaron cortes a las muestras vegetativas provenientes de las semillas germinadas in vitro, se sembraron un total de 10 explantes en cada medio de cultivo conteniendo las diferentes combinaciones de AIB y BAP todo se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas.

Se sembró un explante en cada frasco tipo gerber conteniendo 10 mL de medio de cultivo; 5 explantes para el medio WPM y 5 explantes para el medio MS. Fueron llevados al cuarto de incubación donde se les mantuvo a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C, con una humedad relativa de 80% y fotoperiodo de 16 horas luz. El registro de los datos se hizo cada siete días durante cuatro semanas.

### **VI.7. Siembra e Incubación de los Tratamientos BAP y cinetina en Yemas Laterales**

Se realizaron cortes a las estacas traídas del Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora. Se lavaron, se desinfectaron, se enjuagaron y se sembraron en condiciones asépticas un total de 210 explantes en cada medio de cultivo (MS y WPM). 105 explantes para BAP y otros 105 explantes para cinetina en la cámara de flujo laminar.

Se sembraron 5 explantes en cada frasco tipo gerber conteniendo 10 mL de medio cultivo (WPM y MS) y se colocaron en el cuarto de incubación donde se mantuvieron a una temperatura de 25°C, con humedad relativa de 80% y con fotoperiodo de 16 horas luz, los datos se registraron durante cuatro semanas.

### **VI.8. Registro de Datos**

Las plantas germinadas en los medios de cultivo se midieron cada siete días durante 4 semanas. El registro se llevó a cabo por fuera del frasco de vidrio con una regla graduada elástica, para evitar contaminación.

### **V.I.9. Diseño Experimental**

Se empleó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones y los resultados obtenidos fueron evaluados con el análisis estadístico de varianza de una vía para establecer la dependencia entre variables a analizar, la respuesta del genotipo a la inducción de brotes y el efecto del medio de cultivo en la inducción de brotes.

Se usó la prueba de LSD con un nivel de significancia del 95% para determinar diferencias significativas entre los tratamientos utilizados. Se utilizó el programa StarGraphic versión Plus 5.1 para analizar los datos obtenidos.

## VII. RESULTADOS

### VII.1. Germinación de Semillas de *Lippia palmeri* Watson

Se observó una germinación del 12% de un total de 50 semillas sembradas en medio de cultivo MS y 10 % de germinación de semillas en el medio WPM. Durante el proceso de incubación solo germinaron 6 semillas en el medio MS basal mientras que para WPM fueron 5 semillas germinadas, en estas plántulas se hicieron los cortes vegetativos a las yemas en condiciones asépticas para obtener material y poder realizar el experimento.

### VII.2. Tratamiento con Ácido-indol-3-butírico y 6-bencilaminopurina

Durante la evaluación de los resultados obtenidos en las muestras inoculadas en los medios nutritivos con los reguladores de crecimiento vegetal (AIB y BAP) en diferentes concentraciones se observó que AIB en el medio MS reduce o inhibe el crecimiento de tallo de los cortes vegetativos e induce a la formación de callo. En la cuarta semana de incubación, se observó el inicio de la formación de callo de un color amarillo-verdoso en las concentraciones 1 y 1.5 M de AIB (Fig. 8). En las yemas de semillas germinadas *in vitro* que fueron sometidas en las combinaciones de AIB y BAP no se obtuvo un crecimiento considerable. En los tratamientos donde se adicionó 6-bencilaminopurina, se obtuvieron mejores resultados en las muestras que estuvieron en el medio de cultivo MS basal y las concentraciones de 3 y 6 M de 6-bencilaminopurina (Fig. 9). En las muestras incubadas en el medio de cultivo WPM, no hubo un crecimiento considerable. En el tratamiento basal (WPM) y la concentración BAP 3 M se pudo observar a la tercera semana el crecimiento de callo de un color amarillento (Fig. 10).

En los resultados obtenidos en los explantes sembrados en el medio de cultivo conteniendo las combinaciones de Acidoindol-3-butírico y 6-bencilaminopurina, se observó que los mejores crecimientos se obtuvieron en las muestras con la citocinina BAP en diferentes concentraciones por lo cual se realizó otro experimento pero esta vez comparando dos citocininas la 6-bencilaminopurina (BAP 0, 3 y 6 mgL<sup>-1</sup>) y 6-furfurilaminopurina (cinetina 0, 2, 4 y 6mgL<sup>-1</sup>).

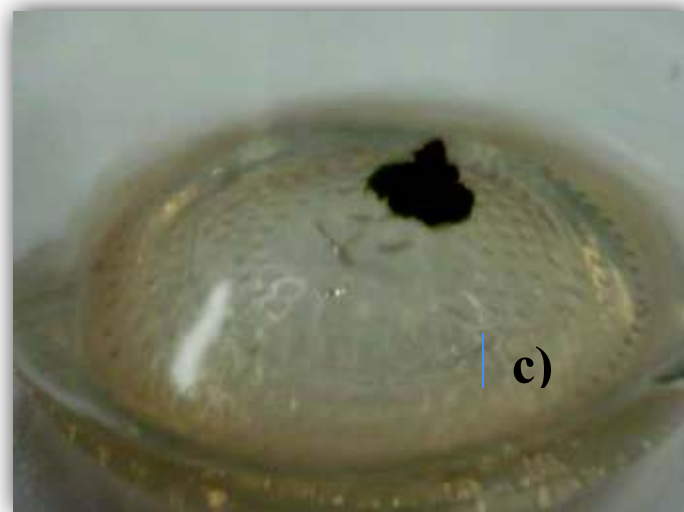
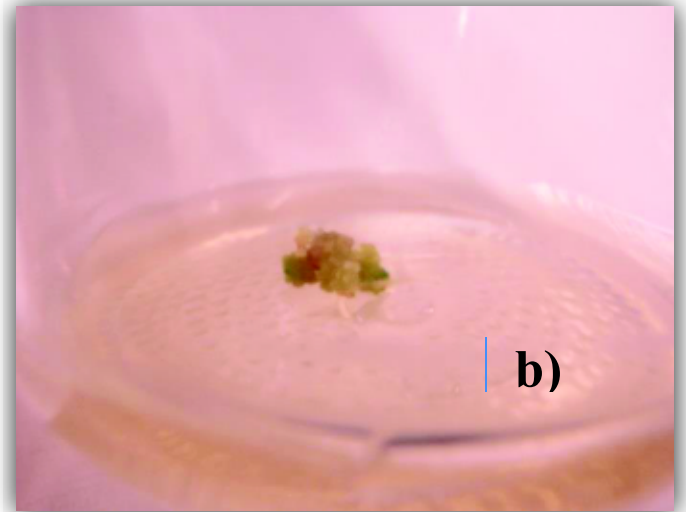
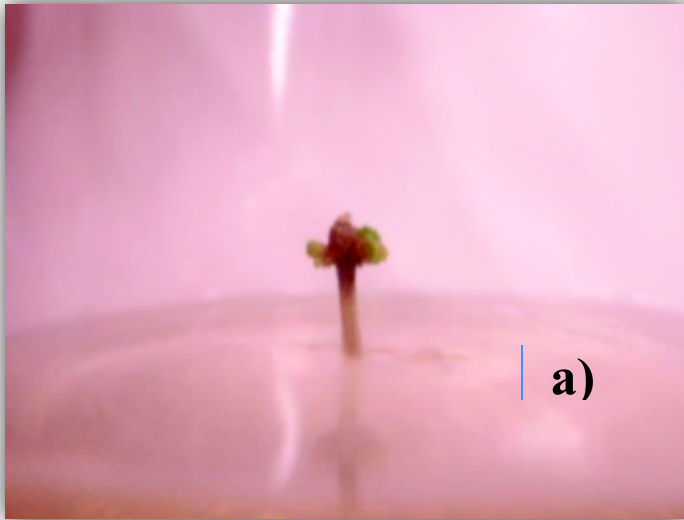


Figura 8. Crecimiento obtenido a partir de yemas de plantas germinadas *in vitro*, en medio MS  
a) Medio de cultivo MS, b) AIB 1 M. y c) AIB 1.5 M

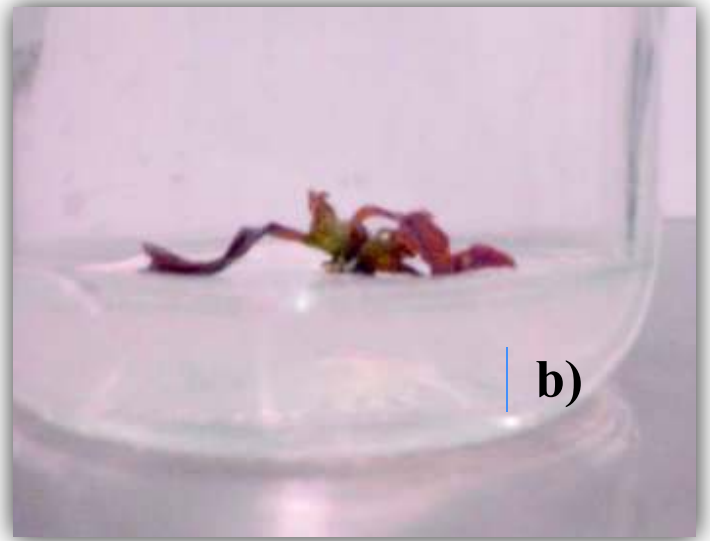


Figura 9. Crecimiento obtenido a partir de yemas de plantas germinadas *in vitro*, en medio MS a) Medio de cultivo MS, b) BAP 3 M y c) BAP 6 M en cuatro semanas de incubación.



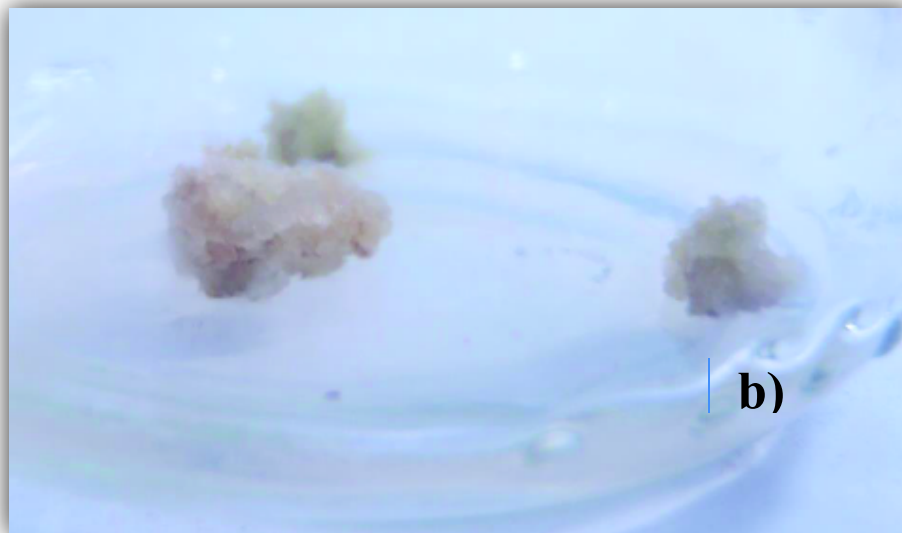


Figura 10. Crecimiento obtenido a partir de yemas de plantas germinadas *in vitro*, en medio WPM a) Medio de cultivo y WPM b) BAP 3 M.

### **VII.3. Selección de Tratamiento BAP y Cinetina en Yemas *in vitro*.**

En el experimento con diferentes combinaciones de AIB y BAP, se observó poco o nada de crecimiento en yemas provenientes de plántulas de semillas *in vitro*, al utilizar el regulador de crecimiento AIB (0, 1, 1.5 M) en el medio de cultivo MS, mientras que al utilizar AIB y BAP en el medio de cultivo WPM, no se observaron resultados favorables en las yemas de semillas obtenidas *in vitro*. Se observó en ambos medios de cultivo que la fitohormona AIB no genera mucho crecimiento en los explantes inoculados, sin embargo, al estar la BAP en el medio nutritivo, sí se observaron resultados prometedores. Por lo cual, se diseñó otro experimento preparando nuevo medio de cultivo añadiendo el regulador de crecimiento 6-bencilaminopurina BAP (0, 3, 6 mgL<sup>-1</sup>), además se hizo nuevo medio de cultivo WPM con el regulador de crecimiento cinetina con concentraciones (0, 2, 4, 6 mgL<sup>-1</sup>) para observar en qué concentración o concentraciones se tienen mejores crecimiento de plantas y comparar ambas citocininas.

Se realizaron un total de siete tratamientos con tres repeticiones cada uno, sembrando 3 explantes de yemas obtenidas de las plantas germinadas en los medios de cultivo MS y WPM basal. Se utilizó el medio MS y WPM con diferentes concentraciones de BAP (0, 3, 6 mgL<sup>-1</sup>), y cinetina (0, 2, 4, 6 mgL<sup>-1</sup>), se usaron frascos de vidrio tipo gerber para el cultivo (Fig. 11) con 10 mL de ambos medio de cultivo. Fueron 21 explantes para el tratamiento de MS y 21 explantes para WPM, los cuales se incubaron con una temperatura de 25°C, humedad relativa de 80% y un fotoperiodo de 16 horas luz.

### **VII.4. Resultados en el Tratamiento con BAP y Cinetina en Yemas *in vitro***

A los 30 días de incubación, se observó desarrollo de hojas y tallos en las muestras creciendo en el medio de cultivo MS con cinetina. El mejor crecimiento se obtuvo en el tratamiento con 4 mgL<sup>-1</sup> de cinetina donde se presentó desarrollo de tallo (Figura 11), al analizar los resultados estadísticamente se observó que no hay diferencias en las muestras que estuvieron en la concentración de 6 mgL<sup>-1</sup> de cinetina (Tabla VI). En el medio de cultivo WPM conteniendo la misma cantidad de cinetina no se obtuvo un crecimiento significativo en los explantes y fue menor el crecimiento obtenido (Tabla VIII), en esta tabla se observa que estadísticamente no presentaron diferencias significativas.

Tabla VI. Efectos de la 6-Furfurilaminopurina ( $\text{mgL}^{-1}$ ) sobre yemas in vitro de *Lippia palmeri* en cuatro semanas de incubación en MS (n=6).

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración (<math>\text{mgL}^{-1}</math>)</b>	<b>Crecimiento (cm)</b>	<b>Diferencia estadística</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1.85</b>	<b>b</b>
<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0.67</b>	<b>b</b>
<b>3</b>	<b>4</b>	<b>2.2</b>	<b>a</b>
<b>4</b>	<b>6</b>	<b>1.1</b>	<b>ab</b>

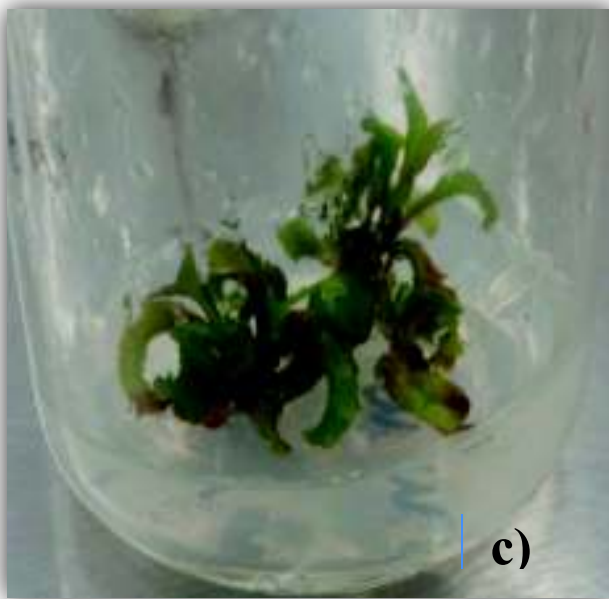
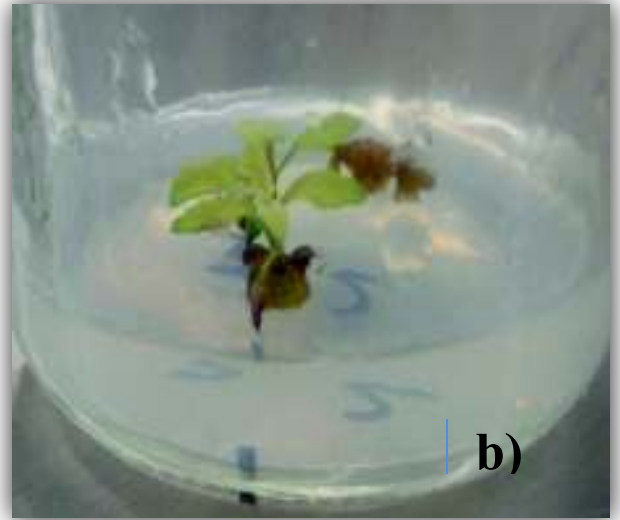


Figura 11. Crecimiento obtenido de las muestras en el medio de cultivo MS de las yemas *in vitro*. a) Medio de cultivo MS b) cinetina  $2 \text{ mgL}^{-1}$  c) cinetina  $4 \text{ mgL}^{-1}$  d) cinetina  $6 \text{ mgL}^{-1}$

### VII.5. Resultados con Distintas Concentraciones de BAP en Yemas *in vitro*.

En los resultados obtenidos en las muestras creciendo en las combinaciones de la auxina AIB y citocinina BAP se observó que los mejores crecimientos de plántulas se obtuvieron en presencia del regulador de crecimiento 6-bencilaminopurina (Fig.12) en el medio de cultivo. Por lo cual se planteó un nuevo experimento con concentraciones de BAP (0, 3 mgL<sup>-1</sup>, 6 mgL<sup>-1</sup>) y el regulador de crecimiento cinetina (0, 2, 4,6 mgL<sup>-1</sup>) en ambos medios de cultivo WPM y MS pero sin combinar los reguladores de crecimiento.

Los mejores resultados de este experimento se obtuvieron en el medio de cultivo MS, en el cual sin la adición de reguladores de crecimiento, se obtuvieron mejores resultados, la planta desarrolló hojas, tallo y raíz (Fig.13). En el medio WPM no se obtuvo crecimiento significativo.

Tabla VII. Efectos de la 6-Bencilaminopurina (mgL<sup>-1</sup>) sobre yemas *in vitro* de *Lippia palmeri* en cuatro semanas de incubación en medio de cultivo MS(n= 6).

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración (mgL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Crecimiento (cm)</b>	<b>Diferencia estadística</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1.7</b>	<b>a</b>
<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1.65</b>	<b>a</b>
<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1.8</b>	<b>a</b>

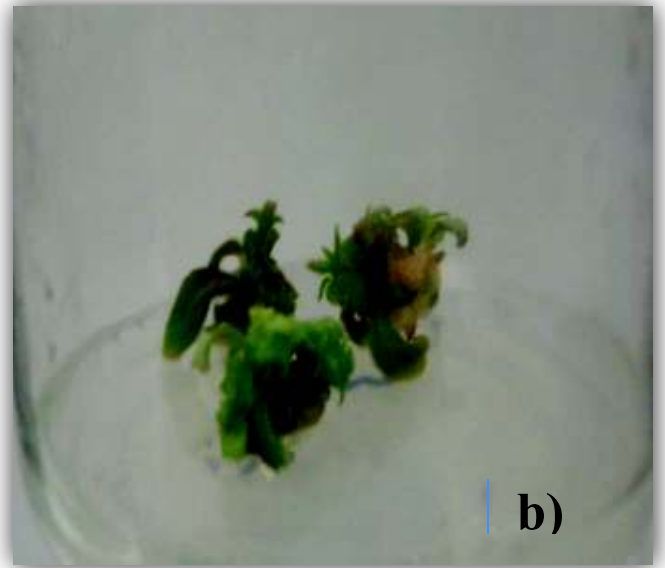
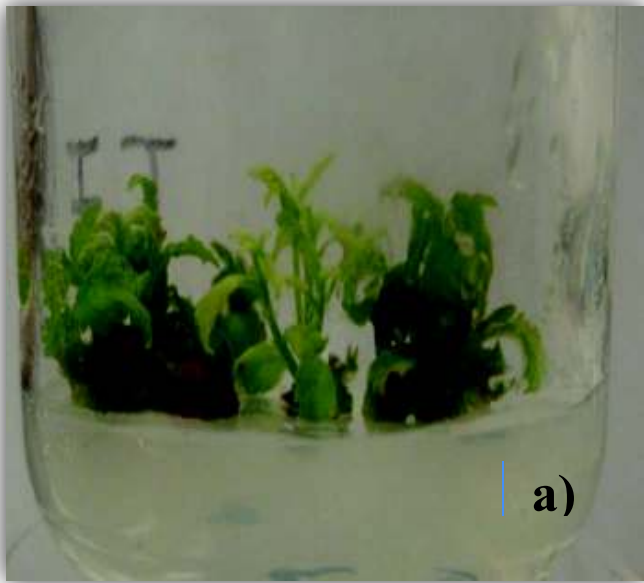


Figura 12. Crecimiento obtenido de las muestras en el medio de cultivo MS yemas *in vitro*. a) Medio de cultivo MS, b) BAP  $3 \text{ mgL}^{-1}$  y c) BAP  $6 \text{ mgL}^{-1}$



Figura 13. Enraizamiento de cortes vegetativos realizados a plantas cultivadas *in vitro* en medio de cultivo MS.

Tabla VIII. Efectos de la 6-Furfurilaminopurina ( $\text{mgL}^{-1}$ ) sobre yemas *in vitro* de *Lippia palmeri* en cuatro semanas de incubación en WPM (n=6).

<b>Tratamiento</b>	<b>Cinetina (<math>\text{mgL}^{-1}</math>)</b>	<b>Crec.(cm)</b>	<b>Diferencia estadística</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0.25</b>	<b>a</b>
<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0.25</b>	<b>a</b>
<b>3</b>	<b>4</b>	<b>0.216667</b>	<b>a</b>
<b>4</b>	<b>6</b>	<b>0.2</b>	<b>a</b>

Tabla IX. Efectos de la 6-Bencilaminopurina ( $\text{mgL}^{-1}$ ) sobre yemas *in vitro* de *Lippia palmeri* en cuatro semanas de incubación en WPM (n=6).

<b>Tratamiento</b>	<b>BAP (<math>\text{mgL}^{-1}</math>)</b>	<b>Crec. (cm)</b>	<b>Diferencia estadística</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0.25</b>	<b>a</b>
<b>2</b>	<b>3</b>	<b>0.25</b>	<b>a</b>
<b>3</b>	<b>6</b>	<b>0.216667</b>	<b>a</b>



## VII.6. Resultados con Distintas Concentraciones de 6-Bencilaminopurina y Cinetina en Yemas Laterales.

En la siembra de las yemas provenientes del Departamento de Agricultura y Ganadería, se utilizaron las mismas concentraciones de BAP (0, 3, 6 mgL<sup>-1</sup>) y cinetina (0, 2, 4, 6 mgL<sup>-1</sup>) en medios de cultivo MS y WPM. El mejor resultado se obtuvo en el medio de cultivo MS con 2 mgL<sup>-1</sup> de cinetina, al analizar los datos estadísticamente, no hubo diferencias significativas en las muestras sometidas a la concentración de 4 mgL<sup>-1</sup> de cinetina (Tabla X). En las yemas en BAP se observó una disminución en el crecimiento en la concentración de BAP 3 mgL<sup>-1</sup> (Fig.14), observándose que no hubo diferencia estadística entre concentraciones (Tabla XI).

Tabla X. Efectos de la 6-Furfurilaminopurina (mgL<sup>-1</sup>) sobre yemas laterales de *Lippia palmeri* en cuatro semanas de incubación en MS (n=11).

Tratamiento	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )	Crecimiento (cm)	Diferencia estadística
1	0	0.536364	ab
2	2	0.581818	a
3	4	0.545455	ab
4	6	0.254545	b

Tabla XI. Efectos de la 6-Bencilaminopurina (mgL<sup>-1</sup>) sobre yemas laterales de *Lippia palmeri* en cuatro semanas de incubación en MS. Todas las medias son iguales (n=5).

Tratamiento	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )	Crecimiento (cm)	Diferencia estadística
1	0	0.82	a
2	3	0.54	a
3	6	0.66	a

Tabla XII. Efectos de la 6-Furfurilaminopurina ( $\text{mgL}^{-1}$ ) sobre yemas laterales de *Lippia palmeri* en cuatro semanas de incubación en WPM (n=8).

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración (<math>\text{mgL}^{-1}</math>)</b>	<b>Crecimiento (cm)</b>	<b>Diferencia estadística</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0.2</b>	<b>b</b>
<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0.46</b>	<b>a</b>
<b>3</b>	<b>4</b>	<b>0.2</b>	<b>b</b>
<b>4</b>	<b>6</b>	<b>0.2</b>	<b>b</b>

Tabla XIII. Efectos de la 6-Bencilaminopurina ( $\text{mgL}^{-1}$ ) sobre yemas laterales de *Lippia palmeri* en cuatro semanas de incubación en WPM (n=16).

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración (<math>\text{mgL}^{-1}</math>)</b>	<b>Crecimiento (cm)</b>	<b>Diferencia estadística</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>a</b>
<b>2</b>	<b>3</b>	<b>0.23</b>	<b>a</b>
<b>3</b>	<b>6</b>	<b>0.2</b>	<b>a</b>

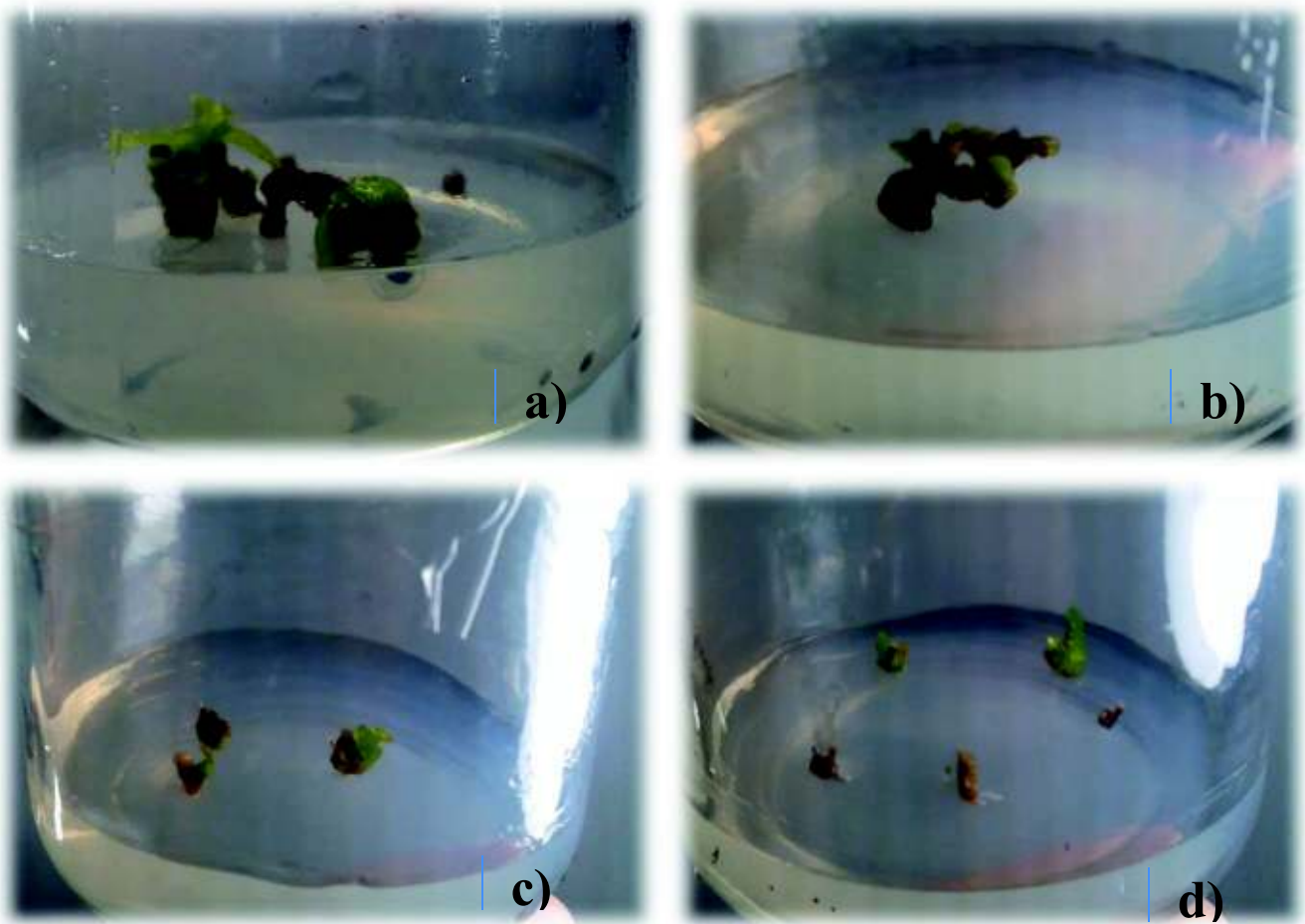


Figura 14. Crecimiento obtenido de las muestras en el medio de cultivo MS de yemas laterales recolectadas del Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora. a) Medio de cultivo, MS b) BAP  $3 \text{ mgL}^{-1}$  y c) Medio de Cultivo MS d) cinetina  $2 \text{ mgL}^{-1}$

## VIII. DISCUSIÓN

La demanda nacional e internacional de orégano, se ha mantenido a través de los años, con las poblaciones silvestres existentes de la planta. Una alternativa para no continuar explotando este recurso, que constituye un recurso natural de las zonas áridas es buscar maneras para su cultivo. Una manera de reproducción de la planta de orégano, sería la propagación *in vitro*, por medio de la cual se podrían lograr plantas seleccionadas, sanas y de muy buenas características.

El porcentaje de germinación de *Lippia palmeri* utilizando el ácido giberélico para inducir la semilla es alto (70%) (Corella et al., 2008). En el presente trabajo el porcentaje de germinación fue de 12% en el medio de cultivo MS y 10% en el medio nutritivo WPM, en el cual las semillas fueron sumergidas en agua desionizada durante 24 horas. Se puede utilizar el ácido giberélico para la inducción de las semillas y utilizarlo en medios de cultivo *in vitro* para incrementar el porcentaje de germinación, con esto se puede obtener un mayor número de plantas, para así propagarlas como se realizó en el presente trabajo.

En el experimento realizado con combinaciones de Ácido-3-Indolbutírico y 6-bencilaminopurina en medio de cultivo MS, la auxina inhibió el crecimiento en los explantes inoculados y estimuló la producción de callo. Ortiz et al. (2007) utilizaron estacas uninodales de plantas cultivadas *in vitro* en medio de cultivo MS utilizando la combinación de concentraciones de ácido naftalenacético y 6-benciladenina (0.01:0.01, 0.1:0.1 y 0.5:..5 mg/L) durante 45 días; en sus resultados se desarrollaron callos embriogénicos, los cuales fueron transferidos en diferentes concentraciones de sacarosa y Acido Indol-3-butírico para regenerar un planta.

Las yemas *in vitro* sometidas en el medio de cultivo con las concentraciones de la citocinina BAP (0, 3, 6M) en medio de cultivo MS mostraron un desarrollo óptimo de tallos y hojas, resultados que coinciden con los obtenidos en *Lippia alba*; en donde encontraron que entre mayor se la concentración de BAP en el medio nutritivo, mejor será la proliferación de la planta (Gupta et al., 2001).

Las yemas laterales recolectadas del Departamento de Agricultura y Ganadería, fue poco el crecimiento que se obtuvo en ambos medios de cultivo utilizados, algunas yemas desarrollaron hojas laterales, pero al paso de una semana mostraron necrosis. En el medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento se observó crecimiento de yemas laterales (Tabla XII), mientras que en el medio de cultivo WPM los mejores resultados se observaron en las muestras que estuvieron con la concentración de  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de cinetina (Tabla XIII). En un estudio realizado con *Vaccinium meridionale*, donde se utilizaron los medios de cultivo MS y WPM con diferentes concentraciones de ácido Indol-acético y 6-benciladenina, obteniendo un bajo porcentaje de germinación y necrosis, el cual puede estar influenciado por la concentración y composición de macroelementos usados en el medio de cultivo y la adición de citocininas (Rache y Pacheco, 2010). El desarrollo de los explantes puede ser una limitante ocasionados por el tratamiento de desinfección utilizado y por el estado fitosanitario en que se encuentre la planta madre (Uribe et al., 2008).

Al comparar los resultados obtenidos con yemas laterales (provenientes de las plantas del Departamento de Agricultura y Ganadería de la UNISON) con las yemas de orégano obtenidas *in vitro*, (Tablas VI y X), con la cinetina en medio MS, se observó que en las yemas *in vitro* se favoreció el crecimiento en la concentración de  $4 \text{ mgL}^{-1}$  de cinetina (Tabla VI), mientras que en yemas laterales, su crecimiento se vio favorecido con la concentración de  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de cinetina (tabla X). En las yemas *in vitro* sembradas en el medio de cultivo MS con diferentes concentraciones de BAP y cinetina se presentó una mejor respuesta en la concentración de  $4 \text{ mgL}^{-1}$  se observó el mejor crecimiento según los resultados estadísticos registrados en cuatro semanas (Tabla VI). En las yemas cultivadas *in vitro* en el medio de cultivo WPM con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal, no se observaron diferencias significativas entre BAP y cinetina, en las muestras incubadas en el medio de cultivo, no presentaron crecimiento considerable (Tabla X y Tabla XI). En trabajos efectuados con la especie *L. dulcis* se multiplicaron yemas apicales en medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento vegetal; para obtener un color y textura ideales se utilizó el medio de cultivo MS con  $0.1 \text{ mg/l}$  2,4-diclorofenoxiacético el cual estimuló la formación y crecimiento de callos y se pudo realizar la multiplicación, se estableció una suspensión celular en medio de cultivo MS con la combinación de los reguladores de crecimiento 2,4 D ( $0.5 \text{ mg/l}$ ) y cinetina ( $0.1 \text{ mg/l}$ ) (Urrea et al., 2009).

En las concentraciones en BAP  $0 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $4 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $6 \text{ mgL}^{-1}$  del medio de cultivo MS donde después de las cuatro semanas de incubación se empezó a desarrollar la formación de raíces siendo el medio sin adición de reguladores de crecimiento vegetal (BAP 0) se obtuvo mayor longitud de raíces, Yadav y Sing (2010) encontraron resultados similares al trabajar con segmentos nodales de *Spilanthes acmella* Murr inoculados en medio de cultivo MS con el regulador de crecimiento BAP; en las muestras que estaban en la concentración  $1.0 \text{ mg/l}$  se observó el mayor número de brotes de la planta y estos brotes fueron disminuyendo a medida a que se incrementaba la concentración de 6-bencilaminopurina (BAP) en el medio nutritivo.

## IX. CONCLUSIONES

El orégano (*Lippia palmeri*) es de gran importancia en el estado de Sonora debido a la demanda que tiene como condimento y el alto valor de su aceite esencial. Durante la realización de este trabajo se estableció un método de propagación *in vitro* para obtener una técnica de propagación vegetativa y así no dañar sus poblaciones silvestres en futuras cosechas.

En la presente tesis se demostró que las yemas provenientes de plantas cultivadas *in vitro*, es decir, yemas provenientes de las plántulas que crecieron de semillas que germinaron en condiciones controladas de temperatura, luz y humedad relativa en el cuarto de incubación en el laboratorio; sembradas en medio de cultivo MS en concentraciones (0, 3, 6 mgL<sup>-1</sup>) de 6-Bencilaminopurina (BAP), serían la mejor opción para el crecimiento de *L. palmeri* debido a que desarrollaron raíces después de 6 semanas de incubación.

En cinetina la respuesta en los explantes cultivados fue mucho menor, solamente se desarrollaron tallo con hojas y no se observó el crecimiento de raíces.

En los explantes extraídos de las plantas de campo, las diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina y cinetina no fueron de ayuda para la brotación; se observó el desarrollo de hojas en las yemas cultivadas, pero no presentó elongación del tallo y ni el crecimiento de raíces.

En este experimento se pudo observar que la auxina AIB (Ácido Indol-6-butírico) en diferentes concentraciones permite el desarrollo de callo en las yemas obtenidas a partir de semillas germinadas en laboratorio.

## X. RECOMENDACIONES

Es importante continuar probando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento en medio de cultivo MS, para desarrollar plantas que se puedan propagar y seleccionar así la opción más viable para obtener clones de *Lippia palmeri* y poder contar con una metodología de propagación asexual para no perjudicar las plantas que se encuentran de manera silvestre y constituyen un recurso natural que se debe cuidar.

Se deben de emplear diferentes métodos de desinfección en el material vegetativo; y así evitar menos contaminación y el menor daño posible en los tejidos de los explantes a utilizar.

Se debe establecer diferentes métodos de germinación de semillas, para obtener un mayor número de plantas a las cuales se les puedan realizar cortes vegetativos y obtener mayor material para la incubación en las diferentes concentraciones con reguladores de crecimiento vegetal.



## XI. LITERATURA CITADA

- Baranjha, y Ghosh, T B. 2005. Plant Tissue Culture: Basic and Applied. Universities Press (India) Private Limited.
- Bassols, G.B. y Gurni, A.A. 1996. Especies del género *Lippia* utilizadas en medicina popular Latinoamericana. Cátedra Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Buenos Aires, Republica de Argentina. Dominguezia. Volumen 13.
- Beyl, C.A. 2000. Getting started with tissue culture: Media preparation, sterile, technique, and laboratory. 21-27 p. En: Trigiano R.N. and D.J. Gray. CRC Press. Boca, Raton, USA.
- Blanco, N.J. J.B Luengas y B.E. Bautista. 2005. Enraizamiento estacional de semillas de orégano. Reunión Nacional de Investigación en recursos Biológicos de Zonas Áridas. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Universidad Autónoma de Chapingo. Vol. 4, Num.2.
- Bourne, M.L.R. 1996. Micropropagación de Chiltepin (*Capsicum annumvar.baccatum*) a partir de yemas in vitro. Tesis de Licenciatura en Química. Universidad de Sonora. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Calva, C.G. y Pérez, V.J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimento para el futuro. Revista Digital Universitaria. Volumen 6. Número 11. Universidad Autónoma de México.
- Caponetti, J.D. 2000. Nutrition of callus cultures. 39-44 p. En: Trigiano R.N., D.J. Gray. Plant Tissue Culture: Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press. Boca, Raton, USA.
- Coleto, J.M. 1995. Crecimiento y desarrollo de las especies frutales. 2da Edición. Ediciones Mundi-Prensa. España.
- Comisión Nacional Forestal. Paquete tecnológico para la producción de orégano (*Lippia spp.*) 2008. Consulta: 16 de Agosto del 2013. (<http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/OREGANO.pdf>).

- Corella-Bernal R., N.M. Ortega, B.M. Robles, F.J., Borboa y E.D McCaughey. 2007. El cultivo del Orégano *Lippia palmeri* Watson, en el estado de Sonora. En: 3ra Reunión Nacional sobre Orégano. Edición especial No.1-2007.22 al 24 de Agosto del 2007. Saltillo, Coahuila, México.
- Corral, T.C.L., M.C Gonzales y G. Vicencio. 2011. 153-160 p. Producción de compost a partir de residuos generados en el proceso de aprovechamiento del orégano. En: EL Orégano Mexicano: estado actual del conocimiento. 1era edición. Lugar
- Couselo, J.L., E. Corredoira, A.M. Vietez, y A. Ballester. 2010. Aplicación del Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales en Estudios de Fitorremediación. Revista Real Academia Galega de Ciencias. Volumen 29. 77-88.
- Dagla, H.R. 2012. Plan Tissue Culture: Historical Developments and Applied Aspects. Consulta: Lunes, 03 de septiembre 2013. (<http://www.ias.ac.in/resonance/August2012/p759-767.pdf>).
- Echeverría, M.A., J. Sánchez, y M. Bañón. 2000. Auxinas. 305-316 p. En: Azcón-Bieto J. y Talón M. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw-Hill. Madrid, España.
- García-Breijo F.J., J. Rosello y M.P. Santamarina M.P. 2006. 121 pp. Introducción al funcionamiento de las plantas. Primera Edición. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- George, E.F., M.A. Hall y G. De Klerk G. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition. Consulta: 1 febrero de 2014. (<http://link.springer.com/book/10.1007%2F978-1-4020-5005-3>).
- Gómez, A. y G.P. García. 2006. 279 p. Fitohormonas: Metabolismo y Modo de Acción. Primera Edición. Castello de la Plana: Publicaciones de la Universitat Jaume. Castellon, España.
- Gupta, S.K., S.P.S. Khanuja y S. Kumar. 2001. *In vitro* Micropropagation of *Lippia alba*. Consulta: 2 de Agosto 2013. (<http://www.iisc.ernet.in/currsci/jul252001/206.pdf>).
- Hernández, J.A., A. Flores, y H.G. Ortiz, 2012. La certificación orgánica alternativa para la comercialización del orégano (*Lippia spp*). SAGARPA Delegación Región Lagunera, Chihuahua, Ciudad Lerdo, Durango. México.
- Hudson, T.H. y E.K. Dale. 1986. 61 p. Propagación de las plantas: Principios y prácticas. Sexta Edición. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs. New Jersey, USA.
- Huerta, C. 1997. Orégano mexicano: oro vegetal. Consulta: 01 de Marzo 2013. (<http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv15art2.pdf>)

- Hurtado-Mendialdua D.V. y M.E Merino.2001.70 p. Cultivo de tejidos vegetales. Primera Edición. Editorial Trillas. S.A. de C.V. México.
- Kyte, L. y J. Kleyn. 2000. 20-70 p. Plants from Test Tubes: An introduction to Micropropagation. 3<sup>rd</sup> Edition. Timbres Press. Inc. Portland, Oregon, USA.
- Lima, V.E., G. Santos, G. Ranulfo y J. Dos Santos. 2010. 187-194 p. Manual de Fisiología Vegetal. São Luís,MA,Brasil.
- López, E.I.L., M.S. Gonzáles, M. Gonzáles, L. Ruacho, F.I. Retana y J.A Tena. 2011. 23-32 p. Distribución geográfica de las especies de oréganos en Durango. En: EL Orégano Mexicano: estado actual del conocimiento. **LUGAR**
- Martínez, T.M., J.L. Cabrera y E. L. Herrera. 2004. Las plantas transgénicas: una visión integral. Consulta: viernes, 05 de Marzo 2013. (<http://www.redalyc.org/redalyc/pdf/730/73000202.pdf>).
- Murashige, T. y F. A. Skoog. 1962.473-497p.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culturas. USA.
- Ortega-Nieblas, M. M., M. R. Robles,L. Vázquez, A. González y A. Morales. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of oregano *Lippia palmeri* Watson essential oil.Rev. Fitotec. México.
- Ortega-Nieblas, D. McCaughey, M.R. Robles y M. Serna, M. 2008. 234-249 p.Estimación de material vegetal del Orégano (*Lippia palmeri* Watson) y su contenido de aceite esencial por planta en dos sitios nativos del Estado de Sonora. En: Memorias del V Simposio Internacional de la Flora Silvestre de Zonas Áridas. **Fecha**
- Ortiz, L., Palacio, L., Brunetti, P., Lloret, C., Cantanero, J. y Goleniowski, M. 2007. 403-404 p. Regeneracion in vitro de plantas de poleo (*Lippia turbinata* Grisebvar. *turbinata*). En: IX Simposio Argentino y XII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica. Córdoba, Argentina.
- Pascual, M. E., K., Slowing, E. Carretero, D. Sánchez D y A. Villar, A. 2001. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology. J. of Ethnopharmacology. 76: 201-214
- Peña, L. 2000. Biotecnología Vegetal: Transformación Genética de Plantas. 465 p. En: Azcón-Bieto J. y Talón M. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw-Hill. Primera Edición.Madrid,España.

- Pérez, E.M., R. Ramírez, H. Núñez y N. Ochoa.1999. 179 p. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad. Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Aguascalientes, México.
- Plucknett,D.L. y J.T Williams. 1992. Los bancos genéticos y la alimentación mundial. Instituto Iberoamericano de Cooperación para la Agricultura Tropical San José, Costa Rica.
- Rache, C.L.Y. y Pacheco, M.J.C. 2010. 1086-1094 p. Propagación *in vitro* de Plántas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). Consulta: 03 de septiembre 2013. (<http://www.scielo.br/pdf/abb/v24n4/v24n4a24.pdf>).
- Rzedowski, J. 2006. 10 p. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Robles, B.D.G. y H.G. Ballesteros.2006. 31p. Propagación *in vitro* de Plantas Medicinales Mexicanas de Interés Comercial. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- Rojas, G.S., García, L.J. y Alarcón R.M. 2003. Propagación Asexual de Plantas: Conceptos Básicos y experiencias con especies amazónicas. 1era Edición. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria.8-9pp.
- Segura, J. 2000<sup>a</sup>.Citoquininas. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Joaquín Azcón-Bieto y Manuel Talón. Capítulo 18.Mc Graw-Hill. Primera Edición. 343-356 pp.
- Segura, J. 2000<sup>b</sup>.Introducción al desarrollo vegetal. Concepto de Hormona Vegetal. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Joaquín Azcón-Bieto y Manuel Talón. Capítulo 18.Mc Graw-Hill. Primera Edición. 299-300 pp.
- Sathyanarayana, B.N. y Varghese, D.B. 2007.Plant tissue culture Practices and new experimental protocols. I.K. International Publishing House. 1era edición. 35 p.
- Suárez, I. E., Jarma, A.J. y Ávila, M. 2006. Desarrollo de un Protocolo para Propagación *in vitro* de Roble. Universidad de Córdoba. Departamento de Ingeniería Agronómica y Desarrollo Rural. Montería-Colombia. 4p.
- Trigiano, R.N. y Gray, D.J. 2000. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. 2nd Edition. Ed. CRL Press LLC.
- Uribe, M.E., Delaveau, C.y Garcés M. Escobar R. 2008. Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales.

Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Forestales, Departamento de Silvicultura.

Concepción, Chile. 61p. <http://mingaonline.uach.cl/pdf/bosque/v29n1/art07.pdf> [Consulta: Lunes, 3 de Septiembre 2013].

Urrea, A.I., Castrillon, P.A. y Monsalve Z.2009. Propagación *in vitro* y desdiferenciación tisular en *Lippia dulcis*. *Instituto de Biología. Universidad de Antioquia.Medellin (Antioquia).Colombia. 21-28 pp.*

Watson, S.1889. Proceedings of the American Academy Arts and Sciences.[http://zipcodezoo.com/Plants/L/Lippia\\_palmeri/](http://zipcodezoo.com/Plants/L/Lippia_palmeri/) [Consulta: Lunes, 12 de Agosto 2013].

Williams, R.L. y Rice, J.R.P.1997.Practical Horticulture. TerceraEdicion. Word Crafters Editorial Services, Inc. 63-64 pp.

Wills, J. 1973.Dictionary of the flowering plants and ferns.8va edition.Revised by H.K. Airy Shaw.UniversityPriting House. Cambridge. 1245 pp.

Yadav ,K. y Singh, N.2010. Micropropagation of *Spilanthes acmella*Murr.An Important Medicine Plant.Nature and Science.Departamento of botany, kurukshetra University kurukshetra.India.[http://www.sciencepub.net/nature/ns0809/02\\_2766\\_ns0809\\_5\\_11.pdf](http://www.sciencepub.net/nature/ns0809/02_2766_ns0809_5_11.pdf)[Consulta: Lunes, 15 de Agosto 2013].

Zhang, J., Ann, M., Wu, H., Stanton, R., y Lemerle, D. 2010.Chemistry and bioactivity of essential oils. *J. Allelopathy. 25: 313–330.*