

Cultivo *In Vitro* del orégano de monte (*Lippia organoides H.B.K*)

Julian Sebastian Ramirez Moreno

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de Biólogo

Directora:

Luz Nayibe Garzón Gutiérrez

Ph. D. en Ciencias Agrarias Con Énfasis En Fitopatología

Co-director:

Jorge Luis Fuentes Lorenzo

Ph. D. en Ciencias Agrícolas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2018

Agradecimientos

Este trabajo de grado es la recompensa al esfuerzo de muchas personas que me acompañaron durante su desarrollo y por ello quiero agradecer con el alma y de forma muy especial.

A mis padres Ernesto y Yakelyne, quienes con sus enseñanzas y cariños me motivan siempre a seguir adelante, a mi abuelita Concha, que con sus manitos prepara las mejores comidas y me hace muy feliz, a mi hermano Juancho, que sin darse cuenta me instruye con sus experiencias y a mi familia en general que todos los días me cuida y me consiente.

A mis amigos Salo, Carlos, Ley, Lina, Neth, Natha, Kathe, Criss, Juli y a todas esas personas que escucharon mis anécdotas en el laboratorio, mis quejas y lloriqueos cuando no obtenía los resultados que quería, un gracias inmenso con todo el corazón, escuchar a alguien así no es fácil.

A mis profesores, especialmente a Luz Nayibe Garzón quien con su carisma me guio en esta aventura y con su paciencia me aguantó mis frustraciones, al profe Jorge Fuentes quien respondía todas mis dudas, a todos los profesores de mi carrera que se esmeraron por educarme en esta maravillosa profesión, al CENIVAM y especialmente a la profesora Elena Stashenko por brindarme el material vegetal y a la Universidad Industrial de Santander, en donde obtuve mis mejores recuerdos.

Un agradecimiento muy especial a aquellas personas que contribuyeron directamente en el desarrollo de mi trabajo de grado: a Sergio Vega quien me acompañó durante un año para cumplir esta meta y a mis fotógrafos personales John Sepúlveda, Ariadna Rodríguez, Daniela Reyes, Daniela Mojica y Vanessa Ríos.

A mis antecesores en el tema de cultivo *in vitro*, Murashige, Skoog, Peixoto, Castellanos y a todos los grandes científicos que con sus investigaciones permitieron el desarrollo de este proyecto.

Finalmente, a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) por el apoyo económico para el desarrollo del presente proyecto.

Contenido

	Pág.
Introducción	14
1. Objetivos	16
1.1 General	16
1.2 Específicos:	16
2. Marco Teórico	17
2.1 Generalidades del género <i>Lippia</i>	17
2.2 Características de <i>Lippia organoides</i>	19
2.2.1 Taxonomía	19
2.2.2 Descripción botánica	19
2.2.3 Distribución geográfica	20
2.3 Cultivo <i>in vitro</i>	21
2.4 Medio de cultivo	22
2.5 Etapas del cultivo <i>in vitro</i>	23
2.5.1 Fase 0: Selección de la planta madre y preparación	23
2.5.2 Fase 1: Establecimiento del cultivo aséptico	24
2.5.3 Fase 2: Multiplicación	24
2.5.4 Fase 3: Enraizamiento	25
2.5.5 Fase 4: Adaptación	25

2.6 Propagación <i>in vitro</i> en especies del género <i>Lippia</i>	27
2.7 Propagación de <i>L. organoides</i>	27
3. Materiales y métodos	28
3.1 Condiciones de establecimiento <i>in vitro</i>	28
3.1.1 Material vegetal	28
3.1.2 Medio de cultivo y condiciones de crecimiento	29
3.1.3 Tratamiento de desinfección en yemas	29
3.1.4 Tratamiento de desinfección en semillas	32
3.2 Tratamiento para la multiplicación y enraizamiento de segmentos nodales.....	33
3.3 Tratamiento para la adaptación de las plantas de <i>L. organoides</i>	33
3.4 Análisis estadístico.....	33
4. Resultados	34
4.1 Condiciones de establecimiento <i>in vitro</i>	34
4.1.1 Desinfección en yemas	34
4.1.2 Desinfección en semillas.....	35
4.2 Multiplicación y enraizamiento de segmentos nodales	36
4.3 Adaptación de las plantas de <i>L. organoides</i>	41
5. discusión	43
5.1 Condiciones de establecimiento <i>in vitro</i>	43
5.1.1 Desinfección en yemas	43
5.1.2 Desinfección en semillas.....	45
5.2 Multiplicación y enraizamiento de segmentos nodales	45
5.3 Adaptación de las plantas de <i>L. organoides</i>	48

6. Conclusiones 49

7. Recomendaciones 50

Rferencias Bibliográficas..... 51

Apéndices..... 57

Lista Figuras

	Pág.
Figura 1. <i>L. origanoides</i> . a. Planta completa. Barra de escala 10 cm; b. Hojas e inflorescencias. Barra de escala: 5 cm; c. Inflorescencias. Barra de escala: 1 cm.	20
Figura 2. Cultivo <i>in vitro</i> de yemas de <i>L. origanoides</i> (y). a. Medio contaminado por hongos (h); b. Medio contaminado por bacterias (b); c. Yemas oxidadas. Barras de escala: 1 cm.	35
Figura 3. Cultivo <i>in vitro</i> de yemas de <i>L. origanoides</i> con crecimiento foliar a los 13 días después de la siembra. Barra de escala: 1 cm.	35
Figura 4. <i>L. origanoides</i> . a. Inflorescencias recolectadas. Barra de escala: 1 cm; b. Semillas. Barra de escala: 1 mm.	36
Figura 5. Diagrama de cajas de promedio de longitud de tallo por tratamiento. Ácido giberelico (AG), 6-bencilaminopurina (B) ácido 1-naftalanacético (ANA).	37
Figura 6. Diagrama de cajas de promedio de longitud de raíz por tratamiento.	39
Figura 7. Diagrama de cajas de promedio de número de brotes por tratamiento. Ácido giberelico (AG), 6-bencilaminopurina (B) ácido 1-naftalanacético (ANA).	40
Figura 8. Segmentos nodales de <i>L. origanoides</i> en diferentes tratamientos.	41
Figura 9. <i>L. origanoides</i> en la fase de adaptación. a. Plantas recién trasplantadas en cámaras húmedas. Barra de escala 5 cm; b. Plantas adaptadas a las 4 semanas. Barra de escala 5 cm; c. Plantas trasplantadas a bolsas a las 6 semanas. Barra de escala 10 cm	42

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Taxonomía	19
Tabla 2. Métodos de propagación en el género <i>Lippia</i>	28
Tabla 3. Tratamientos de desinfección (tiempos de inmersión)	30
Tabla 4. Tratamientos de desinfección establecidos para otras especies del género <i>Lippia</i>	31
Tabla 5. Tratamientos para evitar la oxidación.....	32
Tabla 6. Tratamientos para la multiplicación y enraizamiento de segmentos nodales (longitud de tallo)	37
Tabla 7. Tratamientos para la multiplicación y enraizamiento de segmentos nodales (longitud de la raíz)	38
Tabla 8. Tratamientos para la multiplicación y enraizamiento de segmentos nodales (número de brotes)	39

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Composición del medio nutritivo Murashige & Skoog (MS)	57
Apéndice B. Preparación del medio MS.....	59
Apéndice C. Protocolo para la micropropagación de segmentos nodales de <i>Lippia origanoides</i> obtenidos a partir de semillas.....	60

Resumen

TÍTULO: CULTIVO *IN VITRO* DEL ORÉGANO DE MONTE (*Lippia organoides*)*

AUTOR: JULIAN SEBASTIAN RAMIREZ MORENO^{2**}

PALABRAS CLAVES: Micropropagación, *Lippia organoides*, Murashige Skoog (MS), Biotecnología

Las plantas aromáticas se caracterizan por la biosíntesis de metabolitos secundarios, entre los que se destacan aquellos que permiten la elaboración de aceites esenciales. Estos compuestos orgánicos tienen una gran variedad de aplicaciones a nivel industrial y de uso cotidiano. Una de las especies aromáticas promisorias a nivel científico e industrial en Colombia es *Lippia organoides* (orégano de monte), debido a la calidad, utilidad y viabilidad económica de sus compuestos orgánicos. Sin embargo, presenta limitación para su propagación de manera convencional. Por ello, se desarrolló un protocolo para la micropropagación de esta especie. Como explantes iniciales se utilizaron yemas y semillas (para la obtención de segmentos nodales). La recolección del material vegetal se hizo en el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM). En el proceso de desinfección de semillas se utilizó etanol al 70% por 30 segundos e hipoclorito de sodio al 1.5% por 12 minutos y fueron cultivadas en medio 1/2 MS con sacarosa (1.5%) y agar (0.7%). En el caso de la yema se evaluaron diferentes protocolos de desinfección, pero ninguno fue eficiente. Para determinar los mejores tratamientos se realizaron análisis de varianza y pruebas de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$. En consecuencia, para los segmentos nodales (obtenidos a partir de las semillas) se estableció que el tratamiento más efectivo en la fase de multiplicación y enraizamiento fue aquel que usó ácido giberélico (AG) (0.5 mg/L). Por otro lado, las plantas se adaptaron con mayor facilidad en los sustratos de arena y turba, en comparación con lombrinaza. Los resultados obtenidos sugieren que el cultivo *in vitro* puede ser una alternativa para la multiplicación de la especie, por lo que este constituye el primer reporte de micropropagación de *L. organoides*.

* Trabajo de Investigación

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Directora: Luz Nayibe Garzón Gutiérrez, Ph. D. y Co- Director: Jorge Luis Fuentes, Ph. D.

Abstract

TITLE: *IN VITRO* CULTIVATION OF MONTE ORÉGANO (*Lippia origanoides*)*

AUTHOR: JULIAN SEBASTIAN RAMIREZ MORENO**

KEYWORDS: Micropropagation, *Lippia origanoides*, Murashige Skoog (MS), Biotechnology

Aromatic plants are characterized by the biosynthesis of secondary metabolites, among which are those that allow the production of essential oils. These organic compounds have a wide variety of industrial applications and everyday use. One of the promising aromatic species at the scientific and industrial field in Colombia is *Lippia origanoides*, due to the quality, utility and economic viability of its organic compounds. Nevertheless, it presents a limitation for its propagation in a conventional manner, therefore, a protocol was developed for the micropropagation of this species. As initial explants, yolks and seeds were used (to obtain nodal segments). The collection of the vegetal material was done in the Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM). In the seed disinfection process, 70% ethanol was used for 30 seconds and 1.5% sodium hypochlorite for 12 minutes and they were cultivated in 1/2 MS medium with sucrose (1.5%) and agar (0.7%). In the case of the yolk, different disinfection protocols were evaluated, but none were efficient. To determine the best treatments, analysis of variance and Tukey tests were performed with a level of significance of $p < 0.05$. Consequently, for the nodal segments (obtained from the seeds) it was established that the most effective treatment in the multiplication and rooting phase was the one that used gibberellic acid (AG) (0.5 mg/L). On the other hand, the plants adapted more easily in the substrates of sand and peat, compared to worm. The obtained results suggest that the *in vitro* culture can be an alternative for the multiplication of the species, so this constitutes the first micropropagation report of *L. origanoides*.

* Research Work

** Science faculty, Department of Biology. Director: Luz Nayibe Garzón Gutiérrez, Ph.D. and Co- Director: Jorge Luis Fuentes, Ph. D.

Introducción

Las plantas aromáticas son de gran importancia, debido a su rol ecológico y sus usos culturales, esto último principalmente por los aceites esenciales que se pueden extraer de dichas plantas (Rhind, 2012); estos aceites se definen como una mezcla de compuestos volátiles de amplio uso en distintos sectores de la industria, la medicina y en productos de la vida cotidiana (Başer and Buchbauer, 2010). La presencia, el rendimiento y la calidad de estos aceites están bajo la influencia de distintos factores, que incluyen variaciones fisiológicas, geográficas, genéticas y ambientales (Figueiredo *et al.*, 2008).

Entre las especies promisorias de plantas aromáticas para Colombia, con base en la calidad y la bioactividad de los aceites esenciales que contiene, se encuentra *Lippia origanoides* (orégano de monte) (Herrera, Carranza & Sánchez, 2013); esta planta tiene un valor agregado porque presenta quimiotipos (A Felandreno; B Carvacrol y C Timol) con características resaltables, pues el primero de ellos, presenta una flavanona que puede ser usada como agente anticancerígeno, mientras que los otros tienen un alto valor como agentes antioxidantes (Stashenko *et al.*, 2010). Lo anterior explica el alto interés en los compuestos orgánicos por parte de la comunidad científica y académica, particularmente del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), cuya investigación se enfoca en la síntesis, caracterización y transformación catalítica de productos naturales. A pesar de ser una especie promisoriosa, los avances en el estudio de la actividad biológica de los aceites esenciales de *L. origanoides* está limitado por la dificultad en la propagación de esta especie,

especialmente en el Quimiotipo A, donde el éxito de su multiplicación es bajo, lo que es una gran limitante, pues sin el suficiente material vegetal no es posible realizar todas las técnicas cuantitativas y cualitativas para su correspondiente análisis y para su posterior cultivo y producción.

Hasta el momento solo se ha reportado la propagación exitosa de esta planta por métodos convencionales empleando la propagación asexual por estacas (Herrera *et al.*, 2013). En este trabajo los autores concluyeron que este tipo de propagación es ineficiente y sugieren valorar la eficacia de métodos alternativos, como el cultivo *in vitro*, que ha demostrado tener mejores resultados en la micropropagación de plantas congéneres a esta especie (Juliani *et al.*, 1999; Peixoto *et al.*, 2006; Castellanos-Hernández *et al.*, 2013). Además, esta técnica permite ejercer control sobre los factores que influyen en el material vegetal, tales como la temperatura, la humedad y el fotoperiodo (Pedroza, 2008). En consecuencia, el presente trabajo tuvo como objetivo establecer las condiciones óptimas para la micropropagación *in vitro* de *L. origanoides*, así como su adaptación en condiciones de invernadero. Los resultados permitieron establecer un protocolo para la producción de esta planta garantizando la sanidad del material.

1. Objetivos

1.1 General

Estandarizar el protocolo de propagación *in vitro* y adaptación *ex vitro* de *Lippia origanoides* a partir de yemas y segmentos nodales.

1.2 Específicos:

- Determinar las condiciones más favorables para el establecimiento y multiplicación de yemas y segmentos nodales bajo condiciones *in vitro*.
- Establecer el mejor tratamiento para la fase de enraizamiento de explantes bajo condiciones *in vitro*.
- Identificar las condiciones más favorables para el proceso de adaptación de las plantas de *L. origanoides* obtenidas *in vitro*.

2. Marco Teórico

2.1 Generalidades del género *Lippia*

El género *Lippia* comprende aproximadamente 200 especies de hierbas, arbustos y pequeños árboles, que pertenecen a la familia Verbenacea. Se encuentra ampliamente distribuido en el trópico y subtrópico de América y algunas especies en partes del trópico del viejo mundo (Munir, 1993). Uno de los rasgos más importantes de este género son sus propiedades medicinales. Tradicionalmente, estas plantas tienen utilidad como remedios gastrointestinales y respiratorios (Pascual *et al.*, 2001). Por ejemplo, *Lippia alba* actúa como un antiespasmódico y sedante en el tratamiento del dolor de estómago, bronquitis y trastornos menstruales; *Lippia sidoides* y *Lippia nodiflora* tienen actividad antiinflamatoria y *Lippia multiflora* genera importantes beneficios en la salud de las personas con malaria e hipertensión arterial (Pascual *et al.*, 2001). Es por ello, que actualmente se resalta la importancia de determinar la composición química de las especies de este género y la necesidad de nuevos estudios con enfoques en la actividad farmacológica que se pueden obtener de estas plantas (Ombito *et al.*, 2014).

Debido a que la mayoría de las especies de este género son aromáticas, los estudios de química están enfocados en la compleja composición de aceites esenciales que presentan (Kintzios, 2002). Una de las características que destacan al género en este ámbito, es que los aceites permanecen químicamente constantes durante muchos años (Souto-bachiller *et al.*, 1996). Otro rasgo distintivo, es que plantas de la misma especie pero de distinto origen geográfico, pueden presentar diferencias

en su composición química, como es el caso de *L. alba*, características que demuestran la abundante diversidad genética que el género posee (Kintzios, 2002). Como consecuencia, la aplicación de los aceites esenciales de este género son fuente de múltiples investigaciones, que no solo incluye su actividad terapéutica, sino que comprende desde su beneficio en los alimentos para prevenir el crecimiento de bacterias, hasta su uso como agente antioxidante para retardar el proceso de oxidación (Sarrazin *et al.*, 2015); también se ha demostrado su importante actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* (Tangarife-Castaño *et al.*, 2012) e insecticida contra las larvas de *Aedes aegypti* (Vera *et al.*, 2014).

Las perspectivas actuales en el campo de la biotecnología del orégano (*Origanum* sp y *Lippia* sp) incluyen el uso de cultivo de células para la producción a mayor escala de productos farmacéuticos útiles y el fitomejoramiento, por ejemplo la selección *in vitro* para la resistencia a las enfermedades y la explotación de la variación somaclonal (Kintzios, 2002). También en la investigación del género, se reportan estudios sobre la micropropagación de especies como, *L. junelliana* (Juliani *et al.*, 1999), *L. alba* (Gupta *et al.*, 2001), *L. integrifolia* (Passera and Ambrosetti, 1997), *L. filifolia* (Peixoto *et al.*, 2006), *L. graveolens* (Castellanos-Hernández *et al.*, 2013), *L. rotundifolia* (Resende *et al.*, 2015) y *L. dulcis* (Urrea *et al.*, 2010).

2.2 Características de *Lippia organoides*

2.2.1 Taxonomía

Tabla 1.

Taxonomía

Dominio	<i>Eukaryota</i> Whittaker & Margulis, 1978-eukaryotes
Reino	<i>Plantae</i> Haeckel, 1866 – plantas
Subreino	<i>Viridaeplantae</i> Cavalier-Smith, 1981 –plantas verdes
Phylum	<i>Tracheophyta</i> Sinnott, 1935 ex CavalierSmith, 1998 – plantas vasculares
Subphylum	<i>Spermatophytina</i> (auct.) Cavalier-Smith, 1998 – plantas de semilla
Infraphylum	<i>Angiospermae</i> auct
Clase	<i>Magnoliopsida</i> – Brongniart, 1843- Dicotiledóneas
Subclase	<i>Lamiidae</i> Takhtajan ex Reveal, 1992
Superorden	<i>Lamianae</i> Takhtajan, 1967
Orden	<i>Lamiales</i> Bromhead, 1838
Familia	<i>Verbenaceae</i> (ver-be-NAY-see-ay) Jaume Saint- Hilaire, 1805, nom. Cons
Tribu	<i>Lantaneae</i>
Género	<i>Lippia</i> (LIP-pee-uh) Linnaeus, 1753- <i>Lippia</i>
Epíteto específico	<i>organoides</i> Kunth
Nombre botánico	<i>Lippia organoides</i> H.B. & K

2.2.2 Descripción botánica Comúnmente se denomina orégano de monte, es un arbusto compacto de 3 a 6 pies de altura con 3 tallos en ángulo. Sus hojas son opuestas con textura de tipo pergamino y áspera, su forma es elíptica-ovada, el margen es finamente denticulado, su ápice es puntiagudo y el haz es de color verde grisáceo, en contraste con el envés que es más pálido (Figura 1). Las inflorescencias son axilares, a menudo emparejado, y comprenden una cabeza elipsoidal compacta con brácteas superpuestas. Las flores tienen una dulce fragancia, las corolas se

identifican porque son blancas con amarillo o púrpura y las semillas son diminutas (Staples and Kristiansen, 1999).



Figura 1. *L. origanoides*. a. Planta completa. Barra de escala 10 cm; b. Hojas e inflorescencias. Barra de escala: 5 cm; c. Inflorescencias. Barra de escala: 1 cm.

2.2.3 Distribución geográfica Se encuentra ampliamente distribuido en América central y Sur América, así como en el trópico de África (Terblanché and Kornelius, 1996). En Colombia, *Lippia origanoides* se ha reportado en zonas semiáridas en los departamentos de Santander, especialmente en el Cañón del río Chicamocha; en Boyacá, Cauca, Nariño y en Magdalena (Stashenko *et al.*, 2010; Arango B *et al.*, 2012).

2.3 Cultivo *in vitro*

Comprende un conjunto de técnicas para el cultivo aséptico de células, tejidos u órganos vegetales en un medio de composición química y físicamente definido y ambientalmente controlado (Roca and Mroginski, 1991). Su desarrollo y establecimiento fue una necesidad experimental para resolver interrogantes fundamentales en los estudios afines a la biología de las plantas (Loyola-Vargas and Vázquez-Flota, 2005). Asimismo, es una herramienta biotecnológica con una serie de aplicaciones como la micropropagación comercial de plantas, la bioconservación, la producción de compuestos útiles, el incremento de la variabilidad genética, la obtención de plantas libres de patógenos y la conservación e intercambio de germoplasma (Roca and Mroginski, 1991).

La base teórica para el cultivo de tejido vegetal fue propuesta por Gottlieb Haberlandt en 1902 (Smith, 2013). Él estableció el concepto de totipotencia, demostrando la capacidad de las células vegetales diferenciadas de conservar toda la información genética requerida para el desarrollo de una planta completa (Taiz and Zeiger, 2002). La mayoría de las técnicas *in vitro* usadas se desarrollaron en gran medida durante la época de 1940 a 1960, permitiendo progresar en el alcance de su utilidad. Por ejemplo, la aplicación de agua de coco, posibilitó el cultivo de embriones jóvenes y otras plantas recalcitrantes, como las monocotiledóneas (Van Overbeek *et al.* 1941), también la disponibilidad de Kinetina (KIN) aumentó el número de especies cultivables en condiciones *in vitro* (Smith, 2013). Además, esta herramienta ha demostrado tener múltiples ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación, por ejemplo, hay un incremento en el número de plantas derivadas por genotipo, se reduce el tiempo de multiplicación (Roca and Mroginski, 1991), solo se requieren pequeñas partes del tejido vegetal para iniciar cultivos asépticos, la tasa de proliferación es con frecuencia mucho más alta y la planta está libre

de contaminación por microorganismos (Bhojwani and Dantu, 2013). En esta técnica es fundamental la selección de un medio de cultivo para el éxito del crecimiento y desarrollo del tejido vegetal.

2.4 Medio de cultivo

Los tejidos y órganos vegetales se cultivan *in vitro* en medios artificiales, que suministran los nutrientes necesarios para el crecimiento, el éxito del cultivo está muy influenciado por la naturaleza del medio utilizado (George *et al.*, 2008). Generalmente éste debe contener todos o algunos de los siguientes componentes: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos o suplementos de nitrógeno, fuente (s) de carbono, suplementos orgánicos, agentes solidificantes y reguladores de crecimiento. Además, es necesario tener en cuenta que la concentración de estos componentes para obtener la mejor productividad es específica para cada especie (Saad and Elshahed, 2012).

El medio basal más ampliamente utilizado para el inicio del cultivo y la multiplicación de brotes es Murashige y Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962). Fue desarrollado para el crecimiento óptimo de callos de tabaco e implicó un gran número de pruebas de ensayo y error para los distintos minerales esenciales (George *et al.*, 2008). Este medio ha sido modificado de diversas maneras, ya que resulta tóxico en algunas especies (Bhojwani and Dantu, 2013).

Por esta razón es necesario elegir un medio apropiado de cultivo, en el cual hay que considerar no solo sus componentes sino su preparación (Roca and Mroginski, 1991), debido a que los errores que se producen con mayor frecuencia se originan a partir de la preparación de medios inexactos. De esta manera, la cristalería limpia, el agua de alta calidad, los productos químicos puros y la

medición cuidadosa de componentes de medios comprometen todas las etapas de la investigación (Saad and Elshahed, 2012).

Estas fases en el cultivo *in vitro* se encuentran bien definidas; la primera es la etapa preparatoria para proporcionar explantes de calidad, seguido de esta, se realizan los tratamientos de desinfección, lo que proporciona cultivos asépticos, a continuación, la etapa de multiplicación y enraizamiento, con la posterior transferencia de las plantas a invernadero (Bhojwani and Dantu, 2013).

2.5 Etapas del cultivo *in vitro*

2.5.1 Fase 0: Selección de la planta madre y preparación Esta fase abarca tanto la selección de la planta madre como un pretratamiento de la misma, para garantizar el éxito del proceso de micropropagación, es decir, que las características y la estabilidad genética de la variedad o clon no se vean afectadas (Pedroza, 2008). En primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo de la investigación y la especie vegetal utilizada. La planta elegida debe ser típica de la variedad o especie, y libre de cualquier síntoma de enfermedad. Es por esto que procedimientos para detectar y eliminar bacterias, hongos y virus pueden ser requeridos (George *et al.*, 2008). Para el caso de plantas herbáceas (como *L. origanoides*) que tienen gran facilidad para regenerar en condiciones naturales a través de órganos vegetativos, se esperaría que se adapten sin ninguna dificultad a las condiciones de los procesos de micropropagación (McCown, 2000).

Existen distintos factores a considerar para alcanzar una mejor adaptación fisiológica e higiénica en la fase 0 y de esta manera obtener explantes de calidad, cuyas células sobrevivan y respondan eficientemente a las condiciones *in vitro*. Entre los factores a considerar, resaltan la

edad fisiológica del órgano que se usará como fuente de explante, la temporada en la cual se obtiene, el tamaño y la ubicación del explante, así como la calidad y genotipo de la planta de origen (Smith, 2013).

2.5.2 Fase 1: Establecimiento del cultivo aséptico El segundo paso en el proceso de micropropagación es obtener un cultivo aséptico del material vegetal seleccionado, para ello se realiza la correspondiente desinfección superficial, porque en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explante (George *et al.*, 2008). Para esta desinfección se han utilizado diferentes compuestos, siendo los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrogeno, el nitrato de plata, el cloro comercial, el alcohol a diferentes porcentajes, entre otros (Pedroza, 2008). La selección y concentración de los desinfectantes, así como el tiempo de desinfección, se determinan en gran medida por las características del explante; por lo general, en la práctica se establece experimentalmente por ensayo y error, debido a que no es factible elaborar un procedimiento común para esta fase, en el que se tienen en cuenta la especie vegetal y el tipo de explante (Roca and Mroginski, 1991).

2.5.3 Fase 2: Multiplicación El objetivo de esta fase es la producción del mayor número posible de propágulos (plantas, microtubérculos, microbulbillos), a partir de explantes (meristemas apicales o axilares, yemas axilares o adventicias) ya establecidos *in vitro*. En esta fase se puede hacer uso de reguladores de crecimiento como componentes de un medio de cultivo previamente establecido. Los explantes seleccionados producen nuevos brotes hasta lograr la cantidad de propágulos deseados para pasar a la fase 3, es decir el enraizamiento (Pedroza, 2008).

Es importante destacar, que la proliferación de yemas axilares ha tenido éxito con especies herbáceas, avance que no se logra observar en plantas perennes, a causa de la escasa información genética en estas especies y su poca capacidad para la regeneración y multiplicación, especialmente en plantas leñosas (Sangwan-Norreel *et al.*, 1991).

2.5.4 Fase 3: Enraizamiento Esta fase no solo involucra el desarrollo de varias raíces, también puede implicar el acondicionamiento de las plantas, para aumentar el potencial de supervivencia durante el trasplante a un ambiente controlado *ex vitro* y más adelante a su ubicación definitiva (Davey and Anthony, 2010). Con el objetivo de obtener los mejores resultados biológicos, económicos y productivos en esta fase, varios elementos se manipulan en conjunto, en los que se incluyen el adecuado manejo de los reguladores de crecimiento, las concentraciones de sales minerales y de sacarosa y el estado físico del medio (Pedroza, 2008).

Según Thorpe (1990), el enraizamiento de los brotes propagados *in vitro* necesita el trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales, por eso recomienda la dilución al 50% del medio Murashige y Skoog (1962), que ha demostrado tener resultados positivos en diferentes especies. Igualmente, la disminución o total eliminación de las citoquininas exógenas presentan un efecto estimulante en la diferenciación del sistema radical (Ben-Jaacov *et al.*, 1991).

2.5.5 Fase 4: Adaptación El procedimiento por el cual las plántulas se transfieren desde un ambiente *in vitro* a un entorno *ex vitro* es extremadamente importante. Si no se lleva a cabo con el suficiente cuidado, la transferencia puede resultar en una pérdida significativa del material propagado (George *et al.*, 2008). Para lograr una respuesta eficiente se considera las siguientes subfases:

Manejo de las vitroplantas en el invernadero: Una vez realizado el trasplante al invernadero, es vital simular en este periodo las condiciones del ambiente *in vitro*, hasta que las plantas se adapten a las nuevas condiciones. En cuyo caso el exceso de transpiración de las plantas jóvenes sea un problema, es recomendable mantener una alta humedad relativa (HR), hasta que ellas alcancen un adecuado desarrollo de los estomas y la cutícula (Ziv, 1995). También es necesario controlar el factor luz para evitar la inhibición del aparato fotosintético, ya que provienen de un ambiente con intensidad baja y son expuestas a uno con alta intensidad (Van Huylenbroeck *et al.*, 1995), para ello, es útil emplear mallas plásticas de diferentes porcentajes de sombra (Pedroza, 2008).

Aclimatación: En esta subfase las vitroplantas se colocan en un ambiente con la temperatura y el fotoperiodo regulado, según las necesidades de cada especie vegetal. También se puede reducir la HR durante una semana previo al trasplante en suelo, para que la planta gane mayor resistencia a la baja HR del medio ambiente y de esta manera se adapte a condiciones autótrofas, donde tendrá que regular adecuadamente sus procesos de absorción, translocación y transpiración de agua (Hurtado and Merino, 1997).

Manejo de las vitroplantas en campo: La metodología del trasplante al campo está en función del tipo de cultivo con el cual se esté trabajando, no obstante, una vez efectuado, es recomendable aplicar algún fertilizante comercial. También se sugiere realizar el traslado en días nublados y que el suelo tenga una humedad a capacidad de campo (Hurtado & Merino, 1997). Uno de los requisitos fundamentales en esta fase, es que el sustrato debe cumplir todas las normas de sanidad, de lo contrario puede contaminar y provocar serios daños a las plantas. Entre los sustratos a evaluar, existe una preferencia a los elaborados con materiales inertes y orgánicos como fibra de coco, arena de río, escoria y gravilla fina, humus de lombriz de tierra y compost (Restrepo, 2001).

2.6 Propagación *in vitro* en especies del género *Lippia*

Las especies del género *Lippia* han sido de gran interés para la comunidad científica y académica, debido a sus aplicaciones en diferentes actividades socioeconómica; por esta razón se han desarrollado protocolos para la micropropagación de algunas especies pertenecientes a este género. En la Tabla 2 se describen las características del proceso de desinfección y del medio utilizado en cada una de las etapas del cultivo *in vitro*, en donde se evidencia que la mayoría de los tratamientos difieren entre sí, en cuanto al explante, desinfectantes y tipo y concentración de los reguladores de crecimiento.

2.7 Propagación de *L. origanoides*

En el caso de *L. origanoides* aún no se ha descrito un protocolo para su micropropagación. El único estudio realizado para su propagación es el de Herrera *et al.* (2013), quienes evaluaron la multiplicación de esta planta por reproducción asexual, específicamente por estacas e intentaron determinar el tipo de sustrato y la concentración de la hormona ácido indolbutírico (0, 2.000 y 4.000 mg L⁻¹) con la cual se favorecía el rápido crecimiento de esta especie. En la investigación se comprobó que con esta estrategia metodológica no se consigue un alto rendimiento de propagación para *L. origanoides*, a pesar de que en otras especies evaluadas (*L. alba* y *Tagetes zypaquirensis*) en el mismo trabajo se obtuvieron resultados satisfactorios.

Tabla 2.

Métodos de propagación en el género Lippia

	Material vegetal	Solidificación	Desinfección	Multiplificación	Enraizamiento	Referencias
<i>L. Junelliana</i>	Semillas	7g/L agar Difco Bacto	10% hipoclorito de sodio (10min) 3 lavados	MS 0.04 µM IBA 4.4 µM BA 3% sacarosa	MS	(Juliani, Koroch, & Trippi, 1999)
<i>L. graveolens</i>	Semillas	0.25% Phytigel™	70% etanol (30s) 1.5% hipoclorito de sodio (12min) 3 lavados	MS 2 mg/L BA 3% sacarosa	MS 1.5 mg/L IBA	(Castellanos-Hernández et al., 2013)
<i>L. alba</i>	Brotos apicales (explantos nodales de 1 cm)	0.7% agar Qualigen, India	0.1% p/v Cloruro de mercurio (5min) 5 lavadas	MS 2mg/L BA 3% sacarosa	MS	(Gupta, Khanuja, & Kumar, 2001)
<i>L. rotundifolia</i>	Segmentos nodales	0.7% agar	70% etanol (30min) 1.72 mm benomilo (10min) 0.6% p/v hipoclorito de sodio Dos gotas de Tween-20 (15min) 5 lavados	MS 0.33 µM BA	MS 0.44 µM NAA	(Resende, Bianchetti, Oliveira, Braga, & Peixoto, 2015)
<i>L. filifolia</i>	Esqueje apical con dos a tres yemas axilares	7g/L agar Sigma	70% etanol (30s) 1.72 mm benomilo (10min) 0.4% (p/v) hipoclorito de sodio Dos gotas de Tween-20 (15min) 5 lavados	MS 4.5 µM BA 54 nM NAA 3% sacarosa	MS 0.22 µM NAA	(Peixoto et al., 2006)
<i>L. dulcis</i>	Yemas apicales y nudos	1.8 g/l gelrite	70% etanol (10s) 1.5% hipoclorito de sodio (10min) 3 lavados	MS	-	(Urrea, Castrillón, & Monsalve, 2010)
<i>L. integrifolia</i>	Segmentos nodales	0.8% agar	70% etanol (2min) 1.2% hipoclorito de sodio + 0.1% Cloruro de benzalconio (30min) 3 lavados	MS 1mg/L IBA	1/2MS 1mg/L IBA	(Passera & Ambrosetti, 1997)

3. Materiales y métodos

3.1 Condiciones de establecimiento *in vitro*

3.1.1 Material vegetal El material vegetal, a partir del cual se obtuvieron yemas y semillas de *L. origanoides*, lo proporciono el centro de investigación CENIVAM de la Universidad Industrial de Santander. Aunque no se tiene un registro de la procedencia de estas plantas de acuerdo a la información proporcionada por uno de los miembros de este centro las plantas tienen 9 años de

siembra y las yemas fueron recolectadas desde octubre del 2016 hasta agosto del 2017, mientras que las semillas se recolectaron en los meses de febrero y abril del 2017.

3.1.2 Medio de cultivo y condiciones de crecimiento En todos los experimentos se empleó el medio MS suplementado con 3% p/v de sacarosa; menos en la etapa de germinación donde se utilizó la mitad de concentración del medio MS, así como de sacarosa (1.5%). La solidificación del medio se realizó con la adición de 0.7% p/v agar y el pH se ajustó a 5.8 antes de colocarlo en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Los reguladores de crecimiento (6- bencilaminopurina (BA), ácido giberelico (AG) y ácido 1-naftalenacético (ANA)) se agregaron al medio de cultivo de acuerdo con la etapa específica (Tabla 6). Estos, fueron seleccionados con base en los resultados de investigaciones anteriores en especies del género *Lippia* (Tabla 2). Los cultivos de yemas se realizaron en recipientes de cultivo (60x70mm) y en el caso de las semillas se utilizaron recipientes de 60x110mm, y se mantuvieron en condiciones de 25±2 °C con 16 horas de fotoperiodo, proporcionado por tubos fluorescentes blancos y fríos con una intensidad de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Sylvania Toledo Glass Tube 9w TB G13).

3.1.3 Tratamiento de desinfección en yemas Se evaluaron distintos métodos para la esterilización y desinfección de los explantes, que incluyó el tratamiento de estos con agua destilada y esterilizada, etanol al 70% e hipoclorito de sodio (0.5%, 1% y 1.5%), agregando siempre tres gotas de jabón alcalino (Tabla 3), seguido de cuatro lavados con agua destilada y esterilizada. Adicionalmente, se midió la respuesta de los explantes con los tratamientos de desinfección propuestos por Gupta *et al.* (2001), Peixoto *et al.* (2006), Urrea *et al.* (2010) y Resende *et al.* (2015) (Tabla 4).

Tabla 3.

Tratamientos de desinfección (tiempos de inmersión)

Tratamiento	Tiempo de inmersión (min)		
	Agua destilada y esterilizada más jabón alcalino	Etanol al 70%	Hipoclorito de sodio al 0.5% + jabón alcalino
1	60	30	15
2	45	30	15
3	30	30	15
4	15	30	15
5	60	20	15
6	60	10	15
7	60	5	15
8	60	30	10
9	60	30	5
10	60	30	2
11	5	5	5
12	5	5	2
13	2	1	2
14	2	1	1
15	5	5	5 (1%)*
16	5	5	5 (2%)*

*En los tratamientos 15 y 16 se utilizaron concentraciones de hipoclorito de sodio al 1 y 2% respectivamente

Tabla 4.

Tratamientos de desinfección establecidos para otras especies del género Lippia

	Material vegetal	Desinfección	Referencias
<i>L. alba</i>	Brotos apicales (explantes nodales de 1 cm)	0.1% p/v Cloruro de mercurio (5min) 5 lavadas	(Gupta, Khanuja, & Kumar, 2001)
<i>L. rotundifolia</i>	Segmentos nodales	70% etanol (30min) 1.72 mm benomilo (10min) 0.6% p/v hipoclorito de sodio Dos gotas de Tween-20 (15min) 5 lavados	(Resende, Bianchetti, Oliveira, Braga, & Peixoto, 2015)
<i>L. filifolia</i>	Esqueje apical con dos a tres yemas axilares	70% etanol (30s) 1.72 mm benomilo (10min) 0.4% (p/v) hipoclorito de sodio Dos gotas de Tween-20 (15min) 5 lavados	(Peixoto et al., 2006)
<i>L. dulcis</i>	Yemas apicales y nudos	70% etanol (10s) 1.5% hipoclorito de sodio (10min) 3 lavados	(Urrea, Castrillón, & Monsalve, 2010)

En esta fase las variables evaluadas a los 5 días después de la siembra fueron: número de explantes contaminados / no contaminados; oxidados (necrosis) / no oxidados; siendo la unidad experimental un recipiente de cultivo con tres explantes (conformado por yemas), con tres replicas y tres repeticiones por experimento.

Con el fin de evitar el oscurecimiento en las yemas aisladas se utilizaron antioxidantes y adsorbentes (ácido cítrico, ácido ascórbico, carbón activado y polivinilpirrolidona-PVP) en diferentes concentraciones, tanto en el medio como durante los tratamientos de inmersión y se evaluaron solos o en varias combinaciones (Tabla 5).

Tabla 5.

Tratamientos para evitar la oxidación

	mg/L		g/L	
Ácido ascórbico(AA)	Ácido cítrico (AC)	Carbón activado (CA)	PVP Incorporados al medio de cultivo	PVP Incorporado en la desinfección
0	0	0	0	0
50	0	0	0	0
70	0	0	0	0
100	0	0	0	0
0	50	0	0	0
0	70	0	0	0
0	100	0	0	0
50	50	0	0	0
70	50	0	0	0
50	70	0	0	0
100	100	0	0	0
0	0	0.5	0	0
0	0	2	0	0
0	0	5	0	0
0	0	10	0	0
0	0	0	0	0
50	0	2	0	0
0	50	2	0	0
50	50	2	0	0
100	100	2	0	0
0	0	0	0.5	0
0	0	0	2.5	0
0	0	0	5	0
0	0	0	7.5	0
0	0	0	10	0
0	0	0	0	0.5
0	0	0	0	2.5
0	0	0	0	5
0	0	0	0	7.5
0	0	0	0	10

Todos los medios contenían las hormonas BAP (1,5mg/L) y NAA (0,1mg/L) y se realizó el tratamiento de desinfección 12

3.1.4 Tratamiento de desinfección en semillas Se utilizó la metodología propuesta por Castellanos *et al.* (2013), la cual consistió en la inmersión de las semillas en etanol al 70% durante 30 segundos, seguido por hipoclorito de sodio al 1.5% durante 12 minutos y finalmente tres lavados con agua esterilizada y destilada.

3.2 Tratamiento para la multiplicación y enraizamiento de segmentos nodales

Se utilizó la concentración completa del medio MS suplementado con 3% de p/v de sacarosa y distintas concentraciones de BAP (0.5, 1, 1.5 mg/L), combinado con ANA (0.1) y AG (0.5, 1, 1.5) (Tabla 6). La unidad experimental fue un recipiente de cultivo (60mm x 110mm) con un segmento nodal que provenían de las semillas y cada tratamiento constó de tres réplicas y cuatro repeticiones. Luego de 6 semanas después de la siembra, se evaluaron las siguientes características: longitud del tallo, número de brotes, nudos, longitud de la raíz y el peso seco y húmedo.

3.3 Tratamiento para la adaptación de las plantas de *L. origanoides*

En la última etapa, las plántulas enraizadas se lavaron con agua destilada y esterilizada. Durante 4 semanas se mantuvieron en recipientes con diferentes sustratos esterilizados según el tratamiento (arena gruesa de río desinfectada, turba y lombrinaza), donde la variable que se evaluó fue la supervivencia de la planta. Se cubrió con vasos plásticos para conservar un alto nivel de humedad alrededor de las plantas en la etapa inicial de crecimiento y se mantuvieron bajo luz natural en un invernadero. Se destaparon gradualmente los vasos con el objetivo de disminuir progresivamente la humedad. Después de 6 semanas de adaptación se pasaron a bolsas de semillero con compostaje.

3.4 Análisis estadístico

Todos los experimentos se desarrollaron bajo un diseño completamente al azar, los datos (longitud del tallo y raíz y número de brotes) fueron normalizados utilizando Log 10 y se realizó un análisis

de varianza factorial y una prueba de rangos múltiples de Tukey, para determinar si se presentaban diferencias significativas entre los factores a un nivel de significación de $p < 0,05$, utilizando el software R studio.

4. Resultados

4.1 Condiciones de establecimiento *in vitro*

4.1.1 Desinfección en yemas En el proceso de desinfección de las yemas, a pesar de que se evaluaron diferentes concentraciones y tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio, etanol, agua, antioxidantes, absorbentes, y los protocolos establecidos para otras especies del género *Lippia* (Tablas 3, 4 y 5), ningún tratamiento fue efectivo para evitar el oscurecimiento de los explantes, por lo que el 90% presentó oxidación (Figura 2c).

En relación con la contaminación, en los primeros 10 tratamientos (Tabla 3), el porcentaje de explantes afectados por microorganismos fue menor al 15%, mientras que en los tratamientos 11-16 la contaminación ascendió al 90% (Figura 2a-b). Estos datos fueron consistentes tanto para yemas apicales como axilares.

En el 10% de los explantes que se consiguió un tejido libre de oxidación y contaminación, únicamente se evidenció un crecimiento foliar sin un desarrollo caulinar (Figura 3). En vista de que no se obtuvo desarrollo de plántulas a partir de yemas, se decidió utilizar las semillas como explante inicial.

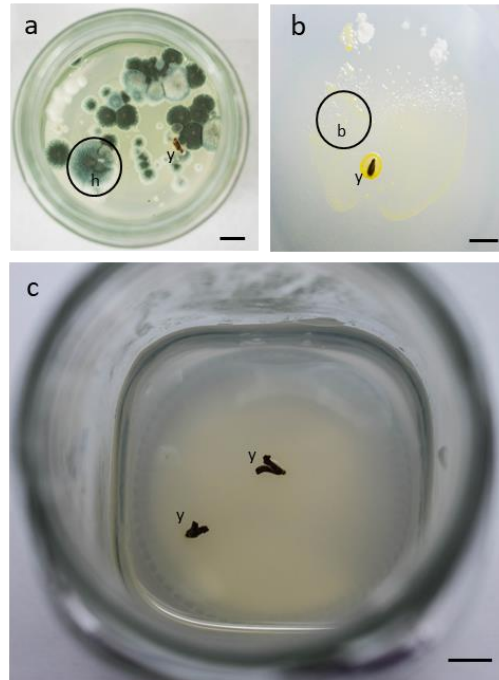


Figura 2. Cultivo *in vitro* de yemas de *L. origanoides* (y). a. Medio contaminado por hongos (h); b. Medio contaminado por bacterias (b); c. Yemas oxidadas. Barras de escala: 1 cm.



Figura 3. Cultivo *in vitro* de yemas de *L. origanoides* con crecimiento foliar a los 13 días después de la siembra. Barra de escala: 1 cm.

4.1.2 Desinfección en semillas La desinfección de semillas (Figura 4) se llevó a cabo según el protocolo de Castellanos *et al.* (2013). El 65% de las semillas germinaron a los 20 días y la

contaminación fue menor al 10%. Luego de 9 semanas, cuando las plántulas alcanzaron una longitud de 3-4 cm se utilizaron como fuente de explantes.

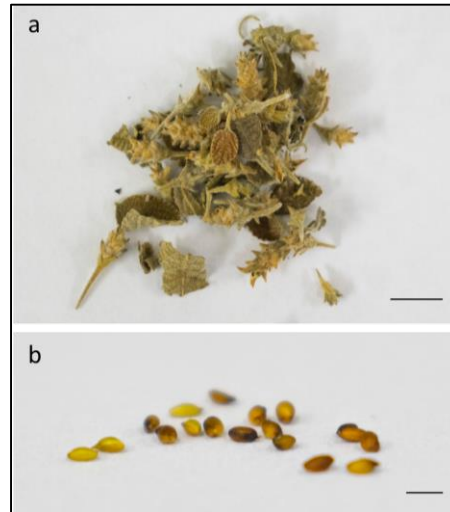


Figura 4. L. origanoides. a. Inflorescencias recolectadas. Barra de escala: 1 cm; b. Semillas. Barra de escala: 1 mm.

4.2 Multiplicación y enraizamiento de segmentos nodales

En la fase de multiplicación, los segmentos nodales presentaron una elongación que vario de 1.4 cm (1.5 de BA y 0.1 mg/L de ANA) a 5.8 cm (0.5 mg/L de AG). La longitud del tallo obtenido para los tratamientos 0.5 mg/L de AG, 1.5 mg/L de AG o sin ningún regulador de crecimiento fueron muy parecidas, por lo que no presentaron diferencias significativas entre los mismos (Tabla 6, Figura 5).

Tabla 6.

Tratamientos para la multiplicación y enraizamiento de segmentos nodales (longitud de tallo)

Concentración mg/L			Longitud del tallo
AG	BA	NAA	
0,5	0	0	5.8 ±1.31 a
1	0	0	3.2 ±0.96 bc
1.5	0	0	4.4 ±0.72 ab
0	0,5	0	2.9 ±0.06 bcd
0	1	0	2.3 ±0.37 cde
0	1.5	0	3.1 ±1.1 bc
0	0,5	0.1	1.8 ±0.4 de
0	1	0.1	1.6 ±0.18 e
0	1.5	0.1	1.4 ±0.29 e
0	0	0	4.7 ±0.69 ab

Las letras representan grupos homogéneos; dentro de cada columna, diferentes letras indican una diferencia significativa a $P < 0.05$ usando ANOVA y la prueba de HSD de Tukey.

Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar de la media.

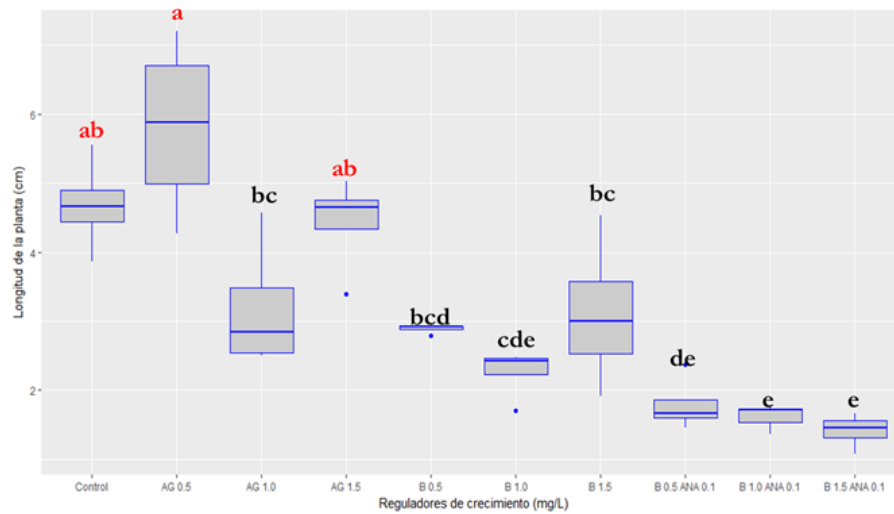


Figura 5. Diagrama de cajas de promedio de longitud de tallo por tratamiento. Ácido giberelico (AG), 6-bencilaminopurina (B) ácido 1-naftalanacético (ANA).

Asimismo, el medio suplementado con 0.5mg/L de AG mostró el mayor desarrollo de raíz (8.6 cm), comparado con el medio 1.5 de BA y 0.1 mg/L de ANA que presentó raíces de 0.4 cm en promedio. De la misma forma que la variable tallo, la longitud de la raíz obtenida para los tratamientos 0.5 mg/L de AG, 1.5 mg/L de AG o sin ningún regulador de crecimiento no presentaron diferencias significativas (Tabla 7, Figura 6).

Tabla 7.

Tratamientos para la multiplicación y enraizamiento de segmentos nodales (longitud de la raíz)

Concentración mg/L			Longitud de la Raíz
AG	BA	NAA	
0,5	0	0	8.6 ±3.13 a
1	0	0	2 ±0.28 bc
1.5	0	0	3.5 ±1.67 ab
0	0,5	0	1.9 ±0.66 bc
0	1	0	2.3 ±1.04 bc
0	1.5	0	4.1 ±1.44 ab
0	0,5	0.1	0.9 ±0.37 cd
0	1	0.1	1.8 ±0.74 bc
0	1.5	0.1	0.4 ±0.07 d
0	0	0	6.55 ±4.64 ab

Las letras representan grupos homogéneos; dentro de cada columna, diferentes letras indican una diferencia significativa a $P < 0.05$ usando ANOVA y la prueba de HSD de Tukey.

Los valores se expresan como la media ± desviación estándar de la media.

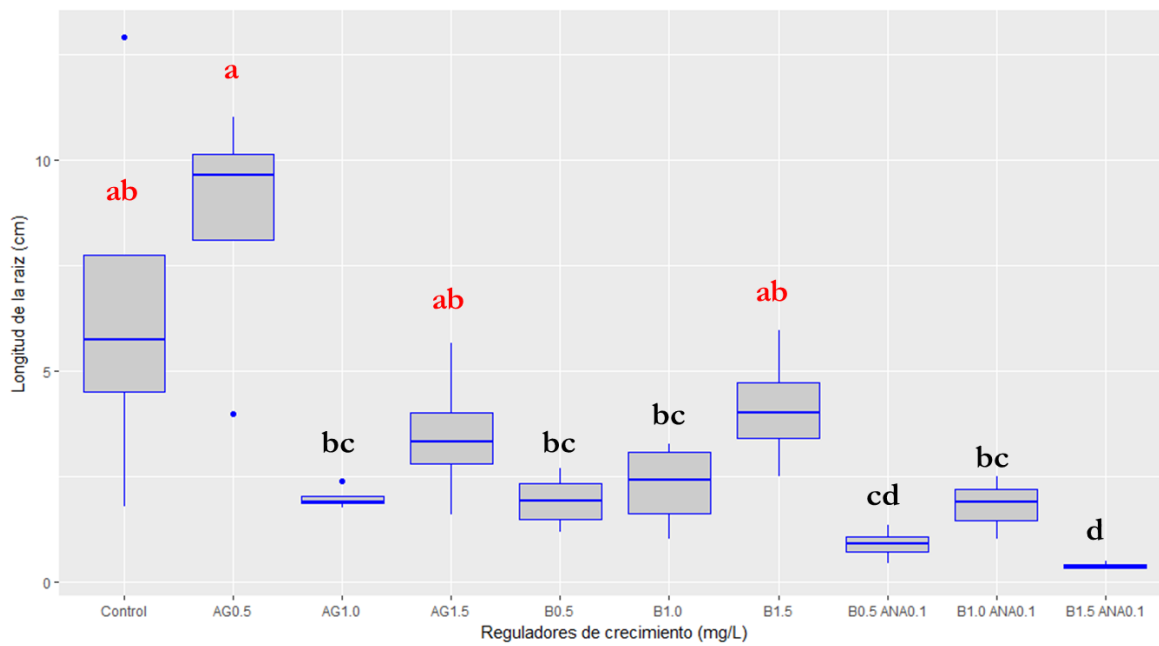


Figura 6. Diagrama de cajas de promedio de longitud de raíz por tratamiento. Ácido giberelico (AG), 6-bencilaminopurina (B) ácido 1-naftalanacético (ANA).

Respecto a los brotes, el tratamiento que mayor número obtuvo fue el medio con 1.5 mg/L de BA, sin mostrar diferencias significativas con los tratamientos que evaluaron distintas concentraciones de este mismo regulador de crecimiento o en combinación con ANA (excepto 0.5 BA-0.1 ANA).

Tabla 8.

Tratamientos para la multiplicación y enraizamiento de segmentos nodales (número de brotes)

Concentración mg/L			No. de brotes	Formación de callo
AG	BA	NAA		
0,5	0	0	1.7±0.20 bc	0
1	0	0	1.25±0.32 c	0
1.5	0	0	1.4±0.42 bc	0
0	0,5	0	2.3±1.29 abc	89%
0	1	0	3.4±1.28 ab	92%

Concentración mg/L			No. de brotes	Formación de callo
0	1.5	0	4.3±0.82 a	100%
0	0,5	0.1	1.5±0.41 bc	100%
0	1	0.1	1.9±1.01 abc	100%
0	1.5	0.1	2.2±0.88 abc	100%
0	0	0	1.75±0.5 bc	0

Las letras representan grupos homogéneos; dentro de cada columna, diferentes letras indican una diferencia significativa a $P < 0.05$ usando ANOVA y la prueba de HSD de Tukey.

Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar de la media.

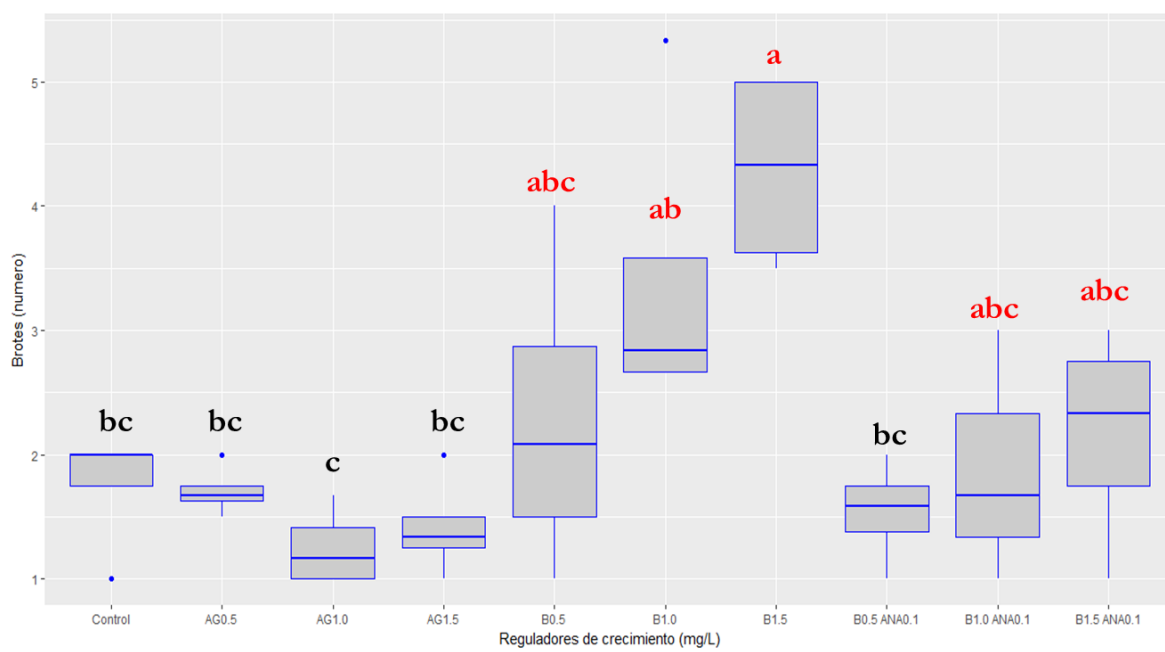


Figura 7. Diagrama de cajas de promedio de número de brotes por tratamiento. Ácido giberelico (AG), 6-bencilaminopurina (B) ácido 1-naftalanacético (ANA).

También se observó el mayor porcentaje (89-100%) de formación de callo en la base del explante, en los medios suplementados con BA solo o en combinación con ANA (Tabla 8, Figura 8).

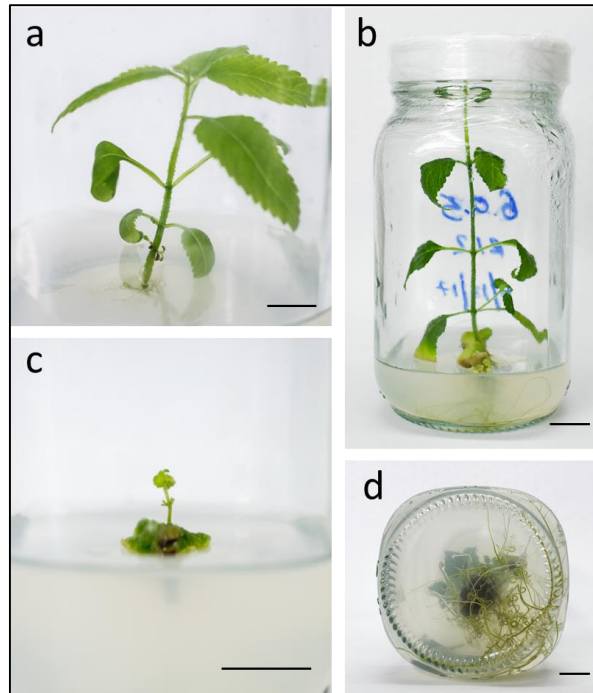


Figura 8. Segmentos nodales de *L. origanoides* en diferentes tratamientos.

a. Control; b. AG; c. BA en presencia o ausencia de ANA; d. AG. Barras de escala: 1cm.

4.3 Adaptación de las plantas de *L. origanoides*

Seis semanas después de la siembra en medio MS suplementado con AG y sin ningún regulador de crecimiento, las plántulas fueron transferidas a los diferentes sustratos. El 90% de las plantas sobrevivió al proceso de aclimatación en arena y turba y el 60% en lombrinaza. No se observaron aberraciones morfológicas en las plantas transferidas.

Tabla 9.

Tratamientos para la adaptación

Sustrato	Número de plantas que se sembraron	% de plantas que sobrevivieron
Arena	10	90
Turba	10	90
Lombrinaza	10	60



Figura 9. *L. origanoides* en la fase de adaptación. a. Plantas recién trasplantadas en cámaras húmedas. Barra de escala 5 cm; b. Plantas adaptadas a las 4 semanas. Barra de escala 5 cm; c. Plantas trasplantadas a bolsas a las 6 semanas. Barra de escala 10 cm

5. discusión

5.1 Condiciones de establecimiento *in vitro*

5.1.1 Desinfección en yemas En la micropropagación, la contaminación puede provenir principalmente de dos fuentes. La primera, un inadecuado manejo de las técnicas de laboratorio durante la siembra y la segunda por los microorganismos que se encuentran en el tejido vegetal (Debergh & Zimmerman, 1993). En el procedimiento que se ejecutó, además de esterilizar todos los materiales, se irradió la cabina con luz ultravioleta por 15 minutos antes de iniciar cada siembra, por lo tanto, es poco probable que el alto porcentaje de contaminación obtenido sea causado por una manipulación inapropiada del material vegetal. Adicionalmente, como control se dejaban medios de cultivo sin tapar en la cabina y no se observó contaminación en los mismos, lo que confirmo que probablemente la contaminación provenía del explante.

La segunda fuente de contaminación corresponde a los microorganismos en el tejido vegetal, estos pueden estar asociados a la superficie de la planta o ser endófitos y colonizarla intracelular o intercelularmente. Los microorganismos que se encuentran en la superficie del explante, pueden acceder al interior de este a partir de aberturas, heridas naturales o lesiones ocasionadas en el momento de retirarlo de la planta (Debergh & Zimmerman, 1993; Hull, 2002; Smith, 2013). Dado que en los protocolos utilizados se desinfectaban los explantes de manera superficial, pudo no haber sido suficiente para el control de hongos y bacterias y esto repercutió en los altos índices de contaminación.

Además, se tuvieron en cuenta diferentes estrategias para tener éxito en la eliminación de los microorganismos. Primero, considerando que el tamaño del explante es un factor que incide en los niveles de contaminación (Cassells, 1997; Pedroza, 2008) se trabajaron con yemas que no superaban los 0.60 cm. Segundo, dado que los brotes juveniles presentan mayor resistencia a enfermedades y responden mejor al crecimiento *in vitro* que las formas adultas de la planta (George *et al.*, 2008; López-Gómez *et al.*, 2010), se seleccionaron explantes jóvenes, determinado de manera visual por características como el tamaño (< 0.6 cm), y proximidad al ápice. Tercero, aunque el meristemo apical como explante inicial tiene menos probabilidades de albergar contaminantes internos (Hull, 2002; Trigiano & Gray, 2011) se evaluaron tanto yemas apicales como axilares, sin encontrar ninguna diferencia en cuanto a la tasa de contaminación. Por último, se consideró la cubierta de los recipientes de cultivo, por lo que se utilizó tapas de plástico, debido a que este material previene la contaminación microbiana en comparación con otros (Cassells, 2000). Sin embargo, independientemente del explante o recipiente de cultivo no fue posible la obtención de vitroplantas con tasas reducidas de contaminación.

De igual forma, se empearon múltiples enfoques para prevenir la oxidación u oscurecimiento del tejido vegetal. Por ejemplo, se usaron explantes en estado juvenil, una vez sembrados los explantes se mantuvieron en oscuridad, se realizaron subcultivos frecuentes y finalmente se utilizaron adsorbentes (carbón activado y polivinil pirrolidona) y antioxidantes (ácido cítrico y ascórbico) a diferentes concentraciones, tanto en el proceso de desinfección del explante como en el medio de cultivo; esto se hizo siguiendo las recomendaciones hechas por Azofeifa (2009). A pesar de que algunos de estos métodos fueron efectivos en la micropropagación de múltiples especies de plantas (Figueiredo *et al.*, 2001; Ogita, 2005; Abdelwahd *et al.*, 2008), ninguno fue exitoso en *L. origanoides*. A nivel del género *Lippia*, en *L. filifolia*, se observaron resultados

similares, donde la tasa de oxidación fue superior al 85%, utilizando 4.5 mM de, 0.85 mmol de ácido ascórbico y 0.52 mmol de ácido cítrico (Peixoto *et al.*, 2006). En contraste con *L. rotundifolia* donde se logró controlar la oxidación utilizando 1g/L de PVPP en el medio de cultivo.

La alta tasa de oxidación observada puede deberse a la elevada composición de compuestos fenólicos que han sido reportados para *L. origanoides* (Stashenko *et al.*, 2010), los cuales son exudados por el tejido vegetal luego de ser cortados. Según Ogita (2005) y George *et al.* (2008a), esto puede inhibir el crecimiento del explante, perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar.

Por otro lado, los explantes que no se afectaron por el crecimiento de microorganismos ni por la oxidación, no desarrollaron tejido caulinar, es decir, el potencial del tejido vegetal a partir de estas yemas axilares o apicales no fue suficiente para generar a corto plazo plántulas con raíz y evidente crecimiento longitudinal, para continuar con las siguientes fases de micropropagación.

5.1.2 Desinfección en semillas El uso de semillas como fuente de explantes ha sido efectivo en diferentes especies herbáceas y leñosas, ya que permite la obtención de múltiples brotes (George *et al.*, 2008). Esta elección también se evidenció en los protocolos de micropropagación de *L. junelliana* (Juliani *et al.*, 1999) y *L. graveolens* (Castellanos-Hernández *et al.*, 2013) razón por la cual, se optó por este tipo de explantes. El tratamiento de desinfección que se realizó fue exitoso porque permitió la obtención de vitroplantas sanas para las siguientes fases de micropropagación.

5.2 Multiplicación y enraizamiento de segmentos nodales

El medio MS fue suplementado con diferentes concentraciones de ácido giberélico, lo que incidió de manera positiva tanto en el crecimiento del vástago como el de la raíz. Con la respuesta

observada en los explantes, no sería necesario la adición de otros reguladores de crecimiento para provocar el desarrollo radicular de las plántulas. Aunque, en algunos estudios han obtenido como respuesta que AG inhibe el crecimiento radicular (Brian, 1958; Jansen, 1967); Coleman y Greyson (1977) concluyeron que puede estimularlo, debido a que incrementa la biosíntesis natural de las auxinas. Estas, tienen varios efectos en el tejido vegetal que incluye la elongación de tallos y entrenudos y el enraizamiento (Bhojwani & Dantu, 2013), respuesta que se observó en los explantes de *L. origanoides*.

En los protocolos de micropropagación establecidos para diferentes especies del género *Lippia*, no se reportó los efectos de esta giberelina en el desarrollo de los explantes, posiblemente porque su objetivo fue la obtención de múltiples brotes a partir de yemas o callos previamente inducidos (Juliani *et al.*, 1999; *L. alba* Gupta *et al.*, 2001; *L. integrifolia* Passera & Ambrosetti, 1997; *L. filifolia* Peixoto *et al.*, 2006; *L. graveolens* Castellanos-Hernández *et al.*, 2013; *L. rotundifolia* Resende *et al.*, 2015; *L. dulcis* Urrea *et al.*, 2010), por lo que hicieron la evaluación de auxinas y citoquininas. Sin embargo, el uso de AG ha sido favorable en sistemas de propagación basados en la elongación de brotes y la división por segmentos nodales (Pedroza, 2008), como en el caso de *Acacia sinuata* (Vengadesan *et al.*, 2000) y *Ficus benjamina* (Delamomarco y Picazo, 1994) y en el presente proyecto, donde se evidenció su efecto positivo con una concentración de 0.5 mg/L.

El crecimiento para tallos y raíces fue similar cuando se utilizó el medio MS suplementado con 0.5mg/L de AG y sin ningún regulador de crecimiento, es decir, el medio MS contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de *L. origanoides*, especialmente permite la elongación del tallo y el enraizamiento de la plántula, sin formación de callo. Esta respuesta coincide con los resultados obtenidos en *L. junelliana* (Juliani *et al.*, 1999), donde hubo desarrollo radicular en medio MS sin ningún suplemento adicional.

Por otra parte, la mayoría de los sistemas de propagación establecidos para las especies de *Lippia* han reportado los efectos de las auxinas (ANA, IBA y AIA) y citoquininas (BA y KIN). Las citoquininas son los reguladores de crecimiento más conocidos para la multiplicación *in vitro*, puesto promueven la formación de múltiples brotes y fomentan la división celular e inducen la formación de brotes adventicios a partir de callos (George *et al.*, 2008; Bhojwani & Dantu, 2013).

En el presente trabajo, utilizando diferentes concentraciones de BA en combinación o en ausencia de ANA, se obtuvo la tasa más alta de formación de callo, al igual que en *L. graveolens* (Castellanos-Hernández *et al.*, 2013), encontraron un alto porcentaje de callo al utilizar BA (1.5-2.0 mg/L) solo o en combinación con IAA (0.1-0.5 mg/L) y en *L. junelliana* (Juliani *et al.*, 1999) ANA (1 mg/L) e IBA (0.8 μ M) a altas concentraciones resulto en la formación de callo en la base de los brotes.

También, en presencia de BA hubo un incremento significativo en el número de brotes. Además, se observó una correlación positiva a medida que se aumentó este regulador de crecimiento y una negativa cuando se agregó ANA en el medio junto con BA (Figura 7). Estos resultados coinciden con los obtenidos en *L. graveolens* (Castellanos-Hernández *et al.*, 2013) donde el mayor número de brotes se obtuvo con esta citoquinina. Sin embargo, contrastan con los reportados para *L. junelliana* (Juliani *et al.*, 1999) donde fue necesario la combinación de IBA con BA para conseguir esta respuesta. Estas diferencias muestran claramente la especificidad en respuesta a las especies de *Lippia*, por lo que es necesario establecer protocolos específicos para mejorar la eficacia de propagación de cada especie.

5.3 Adaptación de las plantas de *L. origanoides*

La aclimatación es una fase crítica en la micropropagación y es considerada la más difícil, debido, al alto porcentaje de pérdidas y daños ocasionados cuando las plantas son transferidas a condiciones *ex vitro* (Pospisilova *et al.*, 1999). La frecuencia con lo que esto ocurre, está relacionada con las características de los tejidos cultivados *in vitro*, porque su modo de nutrición es heterotrófico y tienen un mecanismo deficiente para controlar la pérdida de agua, por lo que son vulnerables a los impactos del trasplante (Bhojwani & Dhawan, 1989). En contraste con lo anterior, el proceso de adaptación para las plántulas de *L. origanoides* tuvo un alto porcentaje de eficiencia (90%); al igual que en *L. junelliana* (Juliani *et al.*, 1999), *L. graveolens* (Castellanos-Hernández *et al.*, 2013) y *L. filifolia* (Peixoto *et al.*, 2006). Uno de los factores que influyó en esta respuesta fue que, en todas las especies mencionadas, los recipientes fueron cubiertos y gradualmente destapados en el proceso de adaptación, lo que permitió mantener una alta humedad los primeros días y progresivamente disminuirla, esto con el fin de preparar la planta a las condiciones de invernadero (Pedroza, 2008).

El sustrato también desempeña un papel importante en el proceso de aclimatación, dado que permite el anclaje del sistema radicular, del cual toma el agua y los nutrientes que necesita para el correcto funcionamiento (Raviv *et al.*, 2002). En el caso de *L. origanoides*, la tasa de supervivencia fue del 90% tanto en arena como en turba, esto podría explicarse por la alta porosidad y aireación que caracterizan a los sustratos mencionados (Martínez & Roca, 2011), ya que una adecuada aireación en la zona de la raíz es vital para el suministro constante de oxígeno y la liberación de dióxido de carbono (Raviv *et al.*, 2002). Además *L. origanoides*, es una especie dominante en ambientes desfavorables, especialmente en zonas semiáridas caracterizadas por suelos secos,

pobres en nutrientes y de alta incidencia lumínica (Albesiano et al., 2003), es decir, similares al sustrato arena. Cabe destacar, que hoy en día se buscan materiales alternativos a la turba, debido a su creciente demanda, los altos costos y su impacto en el medio ambiente, pues es un recurso natural no renovable (Fascella, 2013); teniendo en cuenta lo anterior, el sustrato ideal para *L. origanoides* estaría conformado únicamente por arena.

Por el contrario, solo el 40% de las plantas sobrevivieron en lombrinaza; según Campos *et al.* (2009), este sustrato no es aconsejable usarlo solo, debido a su baja porosidad, lo que indica una mala aireación y drenaje restringido, en cambio recomiendan mezclarlo con turba. En particular, la mezcla de varios sustratos que difieren en sus propiedades físicas trae consigo mejoras como la capacidad de aireación, de retención de agua o de materia orgánica; la cantidad que se agregue de cada sustrato en la mezcla estará determinada por los efectos negativos que se observen en el crecimiento de la planta (Fascella, 2013). También es importante tener en cuenta que el cuidado, es decir el riego y la nutrición, se ajuste a las necesidades del cultivo, ya que, un cambio en el manejo de la siembra e incluso el cambio estacional en el medio ambiente puede dar resultados totalmente diferentes, aún, utilizando el mismo sustrato (Bunt, 1988).

6. Conclusiones

En el establecimiento *in vitro* de *L. origanoides* el explante que permitió el desarrollo de plántulas fue el segmento nodal, obtenido a partir de semillas. No es recomendable utilizar yemas como

explante inicial, debido a la dificultad de conseguir un tejido libre de contaminantes y sin oxidación en la etapa inicial de micropropagación.

La obtención de plántulas con desarrollo tanto a nivel caulinar como radicular fue posible a partir del uso del medio MS con 0.5mg/L de AG y sin ningún regulador de crecimiento adicional.

El proceso de adaptación de *L. origanoides* fue exitoso, con un 90% de supervivencia de las plántulas cuando se sembraron en los sustratos arena y turba. Sin embargo, debido a las características del sustrato, para *L. origanoides* se recomienda el uso de arena.

7. Recomendaciones

Se recomienda la evaluación de tratamientos con AG en combinación con auxinas y citoquininas, ya que estos han tenido efectos positivos en el desarrollo de número de brotes, de la raíz y en la elongación de tallos en diferentes especies.

Teniendo en cuenta que la técnica de inmersión temporal busca la obtención de grandes cantidades de biomasa se aconseja evaluar este sistema para la propagación de *L. origanoides*.

Referencias Bibliográficas

- Abdelwahd, R., N. Hakam, M. Labhilili, & S.M. Udupa. 2008. Use of an adsorbent & antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *African J. Biotechnol.* 7(8): 997–1002.
- Arango, O., D. Pantoja D, L. Santacruz Ch, & A.M. Hurtado. 2012. Actividad Antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides* H . B . K) del Alto Patia. *Biotechnol. en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial* 10(2): 79–86.
- Azofeifa, Á. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados. *Agron. Mesoam.* 20(1): 153–175.
- Başer, K.H.C., & G. Buchbauer. 2010. *Handbook of essential oils : science, technology and applications.* CRC Press.
- Ben-Jaacov, J., A. Ackerman, E. Tal, B. Dagan, & G. Jacobs. 1991. Vegetative Propagation of *Alberta magna* by Tissue Culture and Grafting. 26(1): 1991.
- Bhojwani, S.S., & P.K. Dantu. 2013. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text.* Springer, India.
- Bhojwani, S.S., & V. Dhawan. 1989. Acclimatization of tissue culture-raised plants for transplantation to the field. p. 249–256. *In Applications of Biotechnology in Forestry and Horticulture.* Springer US, Boston, MA.
- Brian, B.Y.P.W. 1958. Effects of gibberellins on plant growth and development. *Biol. Rev.:* 37–77.
- Bunt, A.C. 1988. *Media and mixes for container - grown plants : A manual on the preparation and use of growing media for pot plants.* Unwin Hyman.
- Campos, M.L., U. Van Meeteren, & C. Block. 2009. Comparison of the physical properties of vermicompost from paper mill sludge and green compost as substitutes for peat-based potting media. *Acta Hortic.* 819: 227–234.

- Cassells, A.. 1997. Pathogen & Microbial Contamination Management in Micropropagation (AC Cassells, Ed.). Springer Netherlands, Dordrecht.
- Cassells, A.C. 2000. Aseptic microhydroponics: a strategy to advance microplant development and improve microplant physiology. Int. Symp. Methods Markers Qual. Assur. Micropropag. (530): 187–194.
- Castellanos-Hernández, O.A., G.J. Acevedo-Hernández, M.I. Torres-Morán, F. Zurita, M. Gutiérrez-Lomelí, C.L. Del Toro-Sánchez, & A. Rodríguez-Sahagún. 2013. *In vitro* clonal propagation and regeneration of the commercially important plant Mexican oregano (*Lippia graveolens*). Vit. Cell. Dev. Biol. - Plant 49(5): 620–625.
- Coleman, W.K., & R.I. Greyson. 1977. Analysis of Root Formation in Leaf Discs of Lycopers / con esculentum Mill . Cultured *in vitro*. Ann. Bot. (March): 307–320.
- Davey, M.R., & P. Anthony. 2010. Plant cell culture: essential methods. John Wiley & Sons.
- Debergh, P.C., & R.H. Zimmerman. 1993. Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic Publishers.
- Delamomarco, J.B., & I. Picazo. 1994. Effect of growth regulators on *in vitro* propagation of *Ficus benjamina* cv. Exotica. Biol. Plant. 36(2): 167–173.
- Fascella, G. 2013. Growing Substrates Alternative to Peat for Ornamental Plants. p. 75–100. In Soilless culture-Use of substrates for the production of quality horticultural crops. InTech.
- Figueiredo, S., N. Albarello, & V.R.C. Viana. 2001. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (JACQ .) Baill . Vit. Cell. Dev. Biol.: 471–475.
- Figueiredo, A.C., J.G. Barroso, L.G. Pedro, & J.J.C. Scheffer. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. Flavour Fragr. J. 23(4): 213–226.
- George, E.F., M.A. Hall, & G.-J. De Klerk. 2008. Plant propagation by tissue culture. Springer.
- Gupta, S.K., S.P.S. Khanuja, & S. Kumar. 2001. *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. Curr. Sci. 81(2): 206–210.

- Herrera, A.M., C.E. Carranza, & M.I.C. Sánchez. 2013. Establishment of propagation methods for growing promising aromatic plant species of the *Lippia* (Verbenaceae) and *Tagetes* (Asteraceae) genera in Colombia. *Agron. Colomb.* 31(1): 27.
- Hull, R. 2002. *Matthews' Plant Virology*. Elsevier.
- Hurtado, D., & M. Merino. 1997. *Cultivo de tejidos vegetales*. Trillas.
- Jansen, H. 1967. The effect of gibberellic acid and indoleacetic acid on the root formation of tomato cuttings. *Planta* 378: 371–378.
- Juliani, H.R., A.R. Koroch, & V.S. Trippi. 1999. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 59(3): 175–179.
- Kintzios, S.E. 2002. *Oregano: the genera Origanum & Lippia*. Taylor & Francis.
- López-Gómez, P., L. Iracheta-Donjuan, M. Castellanos-Juárez, I. Méndez-López, A. Sandoval-Esquivel, J.F. Aguirre-Medina, M.C. Ojeda-Zacarias, & A. Gutiérrez-Díez. 2010. Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Rev. Fitotec. Mex.* 33(3): 205–213.
- Loyola-Vargas, V.M., & F. Vázquez-Flota. 2005. *Plant Cell Culture Protocols*. Springer.
- Martínez, P.-F., & D. Roca. 2011. Sustratos para el cultivo sin suelo. Materiales, propiedades y manejo. *Sustratos, manejo del clima, Autom. y Control en Sist. Cultiv. sin suelo*: 37–77.
- McCown, B.H. 2000. Recalcitrance of Woody & Herbaceous Perennial Plants: Dealing with Genetic Predeterminism. *Vitr. Cell. Dev. Biol. Plant* 36(3): 149–154.
- Munir, A.A. 1993. A taxonomic revision of the genus *Lippia* [Houtt. ex Linn.] (Verbenaceae) in Australia. *J. Adelaide Bot. Gard.*: 129–145.
- Murashige, T., & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- Ogita, S. 2005. Callus & cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnol.* 22(2): 119–125.

- Ombito, J.O., E.N. Salano, P.K. Yegon, K. Ngetich, & E.M. Mwangi. 2014. A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (Verbenaceae family). *J Sci Innov Res.* 3(4): 460–466.
- Pascual, M.E., K. Slowing, E. Carretero, D. Sánchez Mata, & A. Villar. 2001. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *J. Ethnopharmacol.* 76(3): 201–214.
- Passera, C.B., & J.A. Ambrosetti. 1997. *In vitro* propagation of " Incayuyo", *Lippia integrifolia* (Gris.) Hier.(Verbenaceae), a medicinal and aromatic plant of monte phytogeographical province, Argentina. p. 319–324. *In* II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, Part 3: Agricultural Production, Post Harvest Techniques, Biotechnology 502.
- Pedroza Manrique, J.A. 2008. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en condiciones *in vitro*. (No. Doc. 20093) CO-BAC, Bogotá).
- Peixoto, P.H.P., F.R.G. Salimena, M.D.O. Santos, L.D.S. Garcia, P.M.D.O. Pierre, L.F. Viccini, & W.C. Otoni. 2006. *In vitro* propagation of endangered *Lippia filifolia* Mart. and Schauer ex Schauer. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 42(6): 558–561.
- Pospisilova, J., I. Ticha, P. Kadlecěk, D. Haisel, & S. Plzakova. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biol Plant* 42: 481–497.
- Raviv, M., R. Wallach, A. Silber, & A. Bar-Tal. 2002. Substrates and their Analysis. p. 25–101. *In* Hydroponic Production of vegetables and Ornamentals.
- Resende, C.F., R.E. Bianchetti, A.M.S. Oliveira, V.F. Braga, & P.H.P. Peixoto. 2015. *In vitro* propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian Campos Rupestres. *Rev. Cienc. Agron.* 46(3): 582–589.
- Restrepo, J. 2001. Elaboracion de abonos organicos fermentados y biofertilizantes foliares: experiencias con agricultores en Mesoamérica y Brazil. (No. IICA LME-96). IICA.
- Rhind, J.P. 2012. *Essential Oils: A Handbook for Aromatherapy Practice* Second Edition. Singing Dragon.
- Roca, W.M., & L.A. Mroginski. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT.

- Saad, A., & A. Elshahed. 2012. Plant Tissue Culture Media. *In* Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. InTech.
- Sangwan-Norreel, B., F. Dubois, F. Flandre, L. Lavieville, H. Paul, & R. Sangwan. 1991. *In vitro* culture and plant improvement. *Acta Hort.* (289): 19–34.
- Sarrazin, S.L.F., L.A. da Silva, R.B. Oliveira, J.D.A. Raposo, J.K.R. da Silva, F.R.G. Salimena, J.G.S. Maia, & R.H. V. Mourão. 2015. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Lipids Health Dis.* 14(1): 145.
- Smith, R.H. 2013. Plant tissue culture: techniques and experiments. Academic Press.
- Souto-bachiller, F.A., M. De Jesus-echevarria, & O. Cardenas-gonzalez. 1996. Hernandulcin is the Major Constituent of *Lippia Dulcis* Trev. (Verbenaceae). *Nat. Prod. Lett.* 8(2): 151–158.
- Staples, G., & M.S. Kristiansen. 1999. *Ethnic Culinary Herbs: A Guide to Identification and Cultivation in Hawai‘i*. University of Hawaii Press.
- Stashenko, E.E., J.R. Martínez, C.A. Ruíz, G. Arias, C. Durán, W. Salgar, & M. Cala. 2010. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *J. Sep. Sci.* 33(1): 93–103.
- Taiz, L., & E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. Sinauer Associates.
- Tangarife-Castaño, V., V. Roa-Linares, L.A. Betancur-Galvis, D.C. Durán García, E. Stashenko, and A.C. Mesa-Arango. 2012. Antifungal activity of Verbenaceae and Labiatae families essential oils. 1: 133–145.
- Terblanché, F.C., & G. Kornelius. 1996. Essential Oil Constituents of the Genus *Lippia* (Verbenaceae)-A Literature Review. *J. Essent. Oil Res.* 8(5): 471–485.
- Thorpe, T.A. 1990. Organogenesis: structural, physiological and biochemical aspects. p. 191–197. *In* Plant Aging. Springer.
- Trigiano, R., & D. Gray. 2011. Plant tissue culture, development, and biotechnology. CRC Press.
- Urrea, A., P. Castrillón, & Z. Monsalve. 2010. Propagación *in vitro* y desdiferenciación tisular en

- Lippia dulcis. Actual. Biológicas 31(90): 21–29.
- Van Overbeek, J., M. E. Conklin, and A. F. Blakeslee. 1941. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. *Science*, 94, 350–351.
- Van Huylenbroeck, J.M., H. Huygens, & P.C. Debergh. 1995. Photoinhibition during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* “Petite” plantlets - Springer. p. 160–164. *In In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*.
- Vengadesan, G., G. Vengadesan, A. Ganapathi, A. Ganapathi, R.P. Anand, R.P. Anand, V.R. Anbazhagan, and V.R. Anbazhagan. 2000. *In vitro* organogenesis and plant formation in *Acacia sinuata*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 61(1): 23–28.
- Vera, S.S., D.F. Zambrano, S.C. Méndez-Sánchez, F. Rodríguez-Sanabria, E.E. Stashenko, & J.E. Duque Luna. 2014. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 113(7): 2647–2654.
- Ziv, M. 1995. *In vitro* acclimatization. p. 493–516. *In Automation and environmental control in plant tissue culture*. Springer.

Apéndices

Apéndice A. Composición del medio nutritivo Murashige & Skoog (MS)

Soluciones stock	Componentes	Cantidad necesaria para la solución de trabajo		Concentración (X)	Volumen para 1 L de medio (mL)
		W (mg)	V (mL)		
MS ₁	NH ₄ NO ₃	82500	1000	50	20
	KNO ₃	95000			
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	18500			
	KH ₂ PO ₄	8500			
MS ₂	H ₃ BO ₃	620	100	100	1
	MnSO ₄ · H ₂ O	2230			
	ZnSO ₄ · H ₂ O	860			
	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	25			
	CuSO ₄ · 5H ₂ O (2.5 mg/mL)	2.5			
	CoCl ₂ · 6H ₂ O (2.5 mg/mL)	2.5			
MS ₃	KI	83	100	100	1
MS ₄	CaCl ₂ · 2H ₂ O	15000	100	33	3.03
MS ₅	Na ₂ EDTA	750	100	20	5
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	550			

Stock de Vitaminas (x 100)	mg/100 ml
-------------------------------	-----------

Compuesto	
Tiamina - HCl	1
Ácido nicotínico	5
Piridoxina - HCl	5
m - Inositol	1000
Glicina	20

Usar 10 ml de la solución stock de

vitaminas para preparar 1 L de medio

Apéndice B. Preparación del medio MS

Para la preparación del medio de cultivo MS se elaboraron las soluciones stock que se muestra en las tablas anteriores. Todas las soluciones se prepararon sobre un 50% de agua destilada del volumen final y sobre ella se fueron añadiendo una por una todos los componentes hasta su completa disolución. Luego se ajustó el volumen final con agua destilada y se almacenaron. En el stock MS₅, el Na₂EDTA y FeSO₄ · 7H₂O se disolvieron por separado, primero se calentó la solución de Na₂EDTA y poco a poco se agregó la solución de FeSO₄ · 7H₂O.

La elaboración de los medios de cultivo se realiza diluyendo las soluciones stock previamente realizadas. Además, se añade la fuente de carbono y el agente gelificante, sacarosa y agar, respectivamente, se ajusta el pH a 5.8 y se lleva la autoclave.

**Apéndice C. Protocolo para la micropropagación de segmentos nodales de *Lippia*
origanoides obtenidos a partir de semillas**

1. Como explante inicial se utilizarán semillas de *L. origanoides*. El tratamiento de desinfección consiste en la inmersión de las semillas en etanol al 70% durante 30 segundos, seguido por hipoclorito de sodio al 1.5% durante 12 minutos y finalmente tres lavados con agua esterilizada y destilada.
2. Cultivar los explantes en medio MS (pH 5.8; sacarosa 3% y 7g/L de agar), en condiciones estériles en cabina laminar.
3. Colocar los frascos de cultivo en un cuarto de incubación a 25 °C con un fotoperiodo de 16 de luz y 8 de oscuridad por 70 días.
4. Posteriormente cultivar los segmentos nodales (3-4cm de longitud) en el medio MS con 0.5mg/L de AG. Continuar con subcultivos hasta obtener la cantidad deseada.
5. Finalmente pasar las plántulas (5-6cm) con previo lavado de raíz a los sustratos arena o turba. Estos se cubren con vasos plásticos y progresivamente se destapan, hasta finalmente pasarlo a bolsas de semillero.