

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMIA



PROPAGACION in vitro DE OREGANO
(Poliomintha longiflora [GRAY])

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

PRESENTA

RODRIGO CARRILES ODRIOSOLA

MARIN, N. L.

MARZO 1994

T.

SB307

.07

C3

c.1

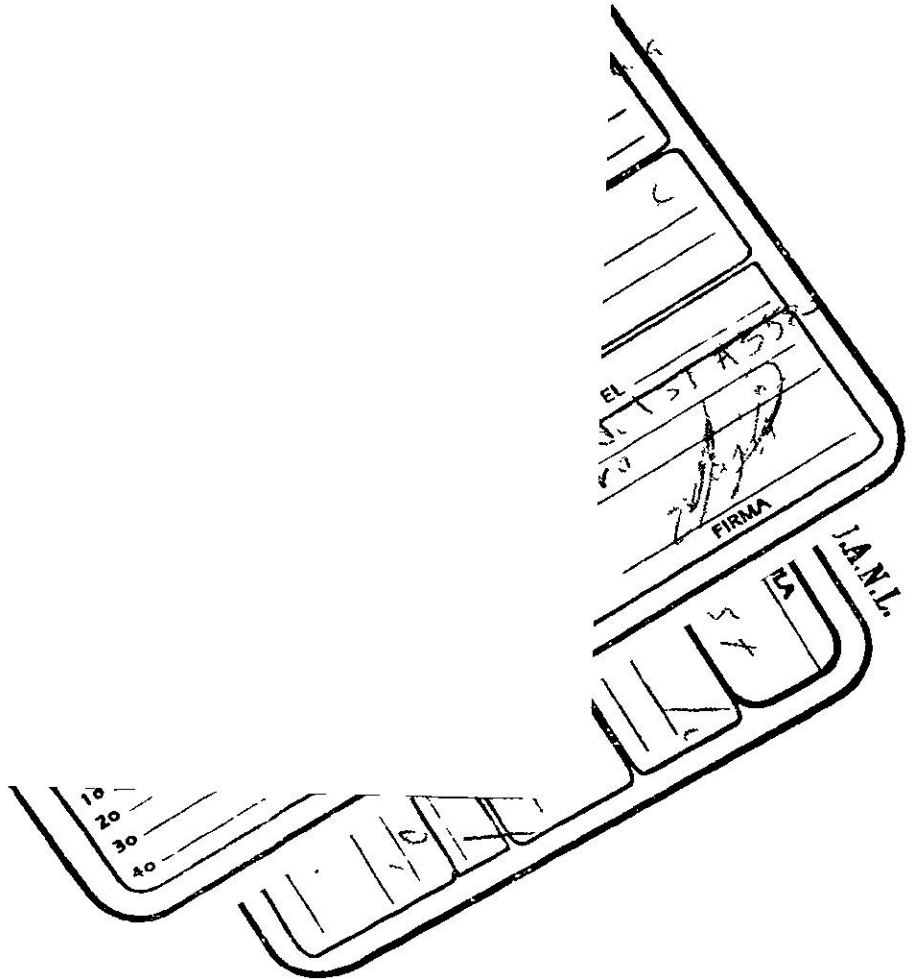


1080061683

Este libro debe ser devuelto, a más tardar, en la última fecha sellada, su retención más allá de la fecha de vencimiento, lo hace acreedor a las multas que fija el reglamento.

23 MAR. 1995

08 DIC. 1995



T
40582
20304
fo.
23

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



PROPAGACION in vitro DE OREGANO
(Poliantha longiflora [GRAY])

Tesis que presenta Rodrigo Carriles Odriozola como
requisito parcial para obtener el título de:

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

PRESENTA

RODRIGO CARRILES ODRIOZOLA

MARIN, N. L.

MARZO 1994

BIBLIOTECA Agronomía U.A.N.L.

11889 &

Marzo 1994

T
SB307
.07
C3



Biblioteca Central
Maena Solidaridad
F.Tesis



BU Raúl Rangel Fierro
UANL
FONDO
TESIS LICENCIATURA

040-633
FA4
1994
C.5

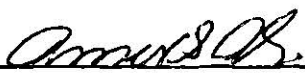
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA




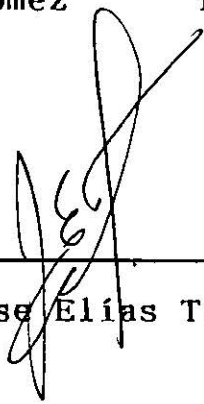
Propagación *In vitro* de orégano
(*Poliomintha longiflora* [Gray])

Tesis que presenta Rodrigo Carriles Odrizola como
requisito parcial para obtener el título de:
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

COMITE SUPERVISOR


M.C. Omar G. Alvarado Gómez


Ing. Jose L. Tapia Rivera


Ing M.Sc. Jose Elías Treviño Ramírez

DEDICATORIAS

Esta tesis representa un cúmulo de esfuerzos y el fin de un paso más en el largo camino por la vida y que quiero dedicar con todo cariño y respeto a :

MIS PADRES:

Jaime Carriles Ontañón

María Teresa Odriozola Salinas

Por sus esfuerzos realizados para mi formación académica y no sentirse defraudados por haber depositado en mí una confianza por realizar y haber concluido una de las etapas de mi vida profesional que tanto anhelé.

Por todo su apoyo, sacrificios, comprensión y cariño que me han brindado durante toda mi vida.

Que sin importarles los golpes de la vida, han sabido mantener unidos y en armonía la esencia de su familia.

Que a pesar de los contratiempos y vicisitudes de la vida diaria, siempre tienen para nosotros una sonrisa y una cara orgullosa, con la cual nos alientan e impulsan para continuar luchando y alcanzar nuestras metas, la felicidad y el amor.

Para ellos con amor y eterna gratitud.

A MIS HERMANOS:

**Jaime
María Teresa
Melissa**

Por su apoyo, cariño y amistad brindados durante mi formación profesional

A MIS ABUELITOS:

**Ana María S de Odriozola
Carmen Ontañón
Angel Odriozola
Antonio Carriles**

Con mucho cariño por el apoyo y comprensión que me han brindado

A MIS AMIGOS:

Que de una u otra forma compartieron momentos agradables y difíciles de mi carrera. gracias a ellos por haberme ayudado a salir adelante siempre los recordaré con cariño

AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar en estas líneas mi gratitud a las siguientes personas por haber participado en la materialización de éste trabajo de investigación.

M.C. Omar G. Alvarado Gómez

Por sus valiosas sugerencias, apoyo y disponibilidad en la revisión del presente trabajo; por su amistad, y por sus conocimientos transmitidos como maestro, asesor y amigo.

Ing. Jose L. Tapia Rivera

Por su valiosa participación en la sugerencia del trabajo de investigación, por su colaboración en la revisión, sugerencias y corrección otorgadas en el presente escrito.

Ing M.Sc. Jose Elías Treviño Ramírez

Por su colaboración en la revisión y sugerencias otorgadas en el presente trabajo.

Irma Elena Garza Ramos

Por tu amistad, comprensión y paciencia que me brindaste en esta etapa de la vida, en este momento tan importante mil gracias.

Y por último, a todas las personas que en forma directa o indirecta hayan contribuido de buen agrado al desarrollo de esta tesis.

A todos ellos mil gracias

CONTENIDO

	Pág
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	iii
RESUMEN.....	v
SUMMARY.....	viii
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1 Importancia y descripción del orégano.....	3
2.2 Sistemas de reproducción de las plantas.....	5
2.3 Técnicas del cultivo de tejidos vegetales.....	7
2.3.1 El cultivo de ápices y sus aplicaciones...	8
2.4 Etapas de la propagación <i>in vitro</i> y factores relacionados.....	9
2.4.1 Establecimiento aséptico y brotación.....	9
2.4.2 Multiplicación.....	12
2.4.3 Enraizamiento.....	14
2.4.4 Aclimatación y transferencia al suelo.....	16
III. MATERIALES Y METODOS.....	18
3.1 Material vegetal.....	18
3.2 Preparación de medios de cultivo.....	18
3.3 Ambiente de cultivo.....	22
3.4 Descripción de experimentos.....	22
3.4.1 Establecimiento aséptico.....	22
3.4.2 Crecimiento de brotes.....	23
3.4.3 Enraizamiento	25

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	26
4.1 Establecimiento aséptico.....	26
4.2 Crecimiento de brotes.....	28
4.3 Enraizamiento.....	32
V. CONCLUSIONES.....	38
VI. BIBLIOGRAFIA.....	39

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro	Pág.
1 Composición del medio de cultivo utilizado en los experimentos de orégano.....	19
2 Composición de las soluciones concentradas utilizadas para preparar el medio de cultivo.....	20
3 Contaminación y oxidación en ápices de orégano desinfectados con diferentes concentraciones de Cloralex ^{MR}	26
4 Crecimiento de brotes de orégano al utilizar dos tipos de explantes.....	28
5 Análisis de varianza para altura de planta de orégano a los 14, 32 y 42 días después de la transferencia utilizando dos tipos de explantes.....	30
6 Respuestas de ápices de orégano a tres auxinas adicionadas al medio de cultivo..	32
7 Micropropagación potencial de orégano de acuerdo con los resultados obtenidos en éste trabajo.....	37

Figura	Pág
1 Explantes utilizados para evaluar el crecimiento y multiplicación <i>in vitro</i> de orégano.....	24
2 Apariencia de las plántulas de orégano obtenidas a las seis semanas (cuatro en crecimiento y multiplicación, y dos en enraizamiento).....	35

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, durante el período comprendido entre Enero y Agosto de 1993.

Se logró establecer una metodología para el establecimiento aséptico, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de explantes de orégano (*Poliomintha longiflora Gray*), utilizando como explantes brotes apicales y segmentos nodales de 10 mm de longitud obtenidos a partir de una planta adulta proveniente de la Sierra de Picachos en el municipio de Higuera, N.L.; El medio de cultivo mas adecuado fué el de Murashige y Skoog modificado por la adición de 1 mg l^{-1} de 6-Bencil aminopurina (BAP) para multiplicación, y el mismo medio pero sin reguladores de crecimiento para enraizamiento.

Los explantes se desinfectaron lavándose con agua y detergente durante cinco minutos y se enjuagaron con agua corriente, posteriormente, se sumergieron en alcohol al 80 % durante 30 segundos y finalmente se colocaron en una solución de Cloralex^{MR} al 5, 10 ó 15 % adicionado de una gota de tween-20 por 100 ml de solución durante 15 minutos. Se removieron los residuos de Cloralex^{MR} enjuagando los explantes tres veces con agua bidestilada estéril.

Los explantes establecidos en las tres concentraciones de Cloralex^{MR} evaluadas tuvieron una asepsia del 100 %, es decir no hubo contaminación alguna, sin embargo, se tuvo casi un 100 % de brotes oxidados desde el momento de la siembra en el primer intento el cual fué superado en una segunda siembra realizada

13 días después mediante una reducción en el tiempo transcurrido entre el corte de los explantes (provenientes de la planta madre) y la siembra de los mismos.

Para evaluar la multiplicación y crecimiento de brotes, se compararon los ápices contra los segmentos nodales ambos de 10 mm de longitud en un mismo medio de cultivo adicionado de 1mg l^{-1} de BAP. Para altura de planta, el análisis estadístico sólo detectó diferencias altamente significativas al nivel de significancia del 1 % a los 14 días después de la transferencia, en donde el ápice superó en tamaño al segmento nodal en un 80 %. Lo mismo ocurrió a los siete, 28, 32, y 42 días después de la transferencia, en donde el ápice superó al segmento nodal en tamaño pero no se detectó diferencia estadística. Con relación al número de brotes por explante se observó un comportamiento opuesto al de la altura de planta, es decir se tuvo una superioridad del segmento nodal sobre el ápice desde los 14 días después de la transferencia hasta los 42 días, obteniéndose en ésta última fecha 3.6 brotes promedio al usar segmentos nodales como explante, contra 2.4 brotes, al usar ápices.

Al comparar la adición de 1mg l^{-1} de Acido indolacético (AIA), Acido indolbutírico (AIB) y Acido naftalenacético (ANA) contra un tratamiento control sin auxinas, se encontró que sólo el Acido indolacético (AIA) y el tratamiento control fueron capaces de inducir la formación de raíces *de novo*. Los tratamientos en los que se utilizó Acido indolbutírico (AIB), y Acido naftalenacético (ANA) presentaron un 100 % de formación de callo, por lo que se puede inferir que el uso de reguladores del crecimiento para el enraizamiento de orégano no es necesario, y de hecho es inútil.

Se concluye en ésta investigación que la metodología desarrollada proporciona un esquema sencillo para el establecimiento aséptico, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de orégano, a partir de brotes apicales y segmentos nodales, sin embargo, es necesario seguir investigando para eficientizar la técnica y superar las oxidaciones que se presentan sobre todo después de períodos prolongados en cultivo, así como el control adecuado de las condiciones de incubación para lograr una aclimatación exitosa y completar el sistema de multiplicación propuesto.

SUMMARY

The present work was realized at the Plant Biotechnology Laboratory of the Agronomy School at Nuevo León University between January and August, 1993.

A methodology for aseptic establishment, multiplication and rooting *in vitro* of oregano explants (*Poliomintha longiflora Gray*) was successfully established. The explants used were shoot apices and nodal segments of 10 mm long obtained by an adult plant coming from Sierra Picachos in the area of Higuera N.L., México. The most adequate media culture was Murashige and Skoog modified by the addition of 1 mg l⁻¹ of 6-benzylaminopurine (BAP) for multiplication, and the same media culture without growing regulators for rooting.

The explants were disinfected by washing with plain water and detergent during 5 minutes and then rinsed with water. Later on they were sinked in 80% alcohol for about 30 seconds and finally they were placed in a 5, 10, and 15 % of Cloralex^{MR} solution, adding one tween-20 drop per 100 ml of solution for about 15 minutes, and then removing the Cloralex^{MR} remainders rinsing the explants three times with sterile bi-distilled water.

The explants established in the three evaluated concentrations of Cloralex^{MR} were 100 % aseptic, that means there was no contamination at all. However, we had a 100 % in oxidation shoots since the sowing time at the first tried. This oxidation problem was superated in a second sowing 13 days later by a reduction in time against the cut of the explants (from the initial mother plant) and the sowing of the same ones.

To evaluate bud's multiplication and growing, there was a comparison in shoot apexes against nodal segments both of 10 mm of long in the same culture media modify by adding 1 mg l⁻¹ of BAP. For plant height, the shoot apexes were bigger in size than the nodal segments in 80 % average. The same happened at the 7, 28, 32 and 42 days after the transfer, where the shoot apexes were bigger in size than the nodal segments, but there were not any estatistict difference.

In relation to the shoots number per explant we observed the opposite behavior at the height plant, wich means, we had a superiority in the nodal segments against the shoot apexes from 14 to 42 days after the transfer, obtained 3.6 shoots average using nodal segment explants, against 2.4 shoots using shoot apexes at the 42 days.

Comparing the addition of 1 mg l⁻¹ indole acetic acid (IAA), indole butiric acid (IBA) and naphtalenacetic acid (NAA) against a control treatment without auxins, it was found that just the indole acetic acid (IAA) and the control treatment were able to induce *de novo* roots formation; in the treatments using indole butiric (IBA) and naphtaleneacetic acid (NAA) had a 100 % of callus formation. Then, we can infere that the use of growth regulators for rooting in oregano is not necessary.

We can conclude that the methodology used in this proyect showed a simple scheme for oregano aseptic stablishment, multiplication and rooting oregano *in vitro*, comming from shoot apexes and nodal segments. However, it is necessary to keep searching for a more efficient technic and avoid the oxidation problems, in the future work.

I. INTRODUCCION

Aproximadamente el 40 % de la superficie en México lo constituye la vegetación desértica. La perspectiva para la explotación agrícola y ganadera en estas zonas es muy desalentadora por lo que sus habitantes la mayoría de origen campesino, se ven en la necesidad de aprovechar los recursos forestales naturales, que en muchos casos constituyen su fuente principal de ingresos.

En Nuevo León, principalmente en la Sierra de Picachos ubicada en el municipio de Higueras, se encuentra la especie *Poliomintha longiflora Gray*, conocida comunmente con el nombre de orégano. Desde hace muchos años, los habitantes de la región acuden al lugar en donde se encuentran las plantas para coleccionar brotes los cuales posteriormente son comercializados, esta actividad representa una fuente de ingresos adicional, pero la explotación permanente de este recurso natural sin una reforestación planeada puede causar una reducción de la población vegetal, y por consecuencia la desaparición de esta actividad tradicional.

La reproducción natural del orégano es por semillas, las cuales maduran en otoño y quedan listas para germinar en la primavera del año siguiente, pero en muchos de los casos ésta etapa es muy sensible a los cambios climáticos, por lo que las semillas pierden su viabilidad y por lo tanto no germinan. Aunado esto a la recolección de las plantas o brotes sin una reforestación adecuada, se busca en este trabajo la implementación de la técnica del cultivo de tejidos vegetales como alternativa de reproducción, que desde 1970 se ha estado aplicando en la agricultura en México (Robert y Loyola, 1985).

El cultivo de tejidos vegetales permite la propagación de especies vegetales de interés a un nivel masivo en laboratorios con espacios muy pequeños y con excelente sanidad, además de una independencia de los cambios climáticos, entre otras ventajas.

Por todo lo anterior, se planteó éste trabajo con el objetivo de establecer la técnica de propagación *in vitro* de orégano mediante:

El estudio del efecto en el uso de diferentes concentraciones de Cloralex^{MR} sobre la contaminación.

Comparación en el crecimiento y multiplicación de ápices y segmentos nodales.

Evaluación del efecto de la adición al medio de cultivo de tres reguladores del crecimiento de naturaleza auxínica sobre el enraizamiento.

Se probaron las hipótesis siguientes:

La contaminación de explantes de orégano procedentes del campo al ser establecidos *in vitro*, es dependiente de la concentración de Cloralex^{MR} aplicada.

El número y tamaño de brotes obtenidos por micropropagación es diferente dependiendo del explante utilizado.

La adición de fitoreguladores de naturaleza auxínica en el medio de cultivo, promueve el enraizamiento de brotes.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Importancia y descripción del orégano.

La vegetación desértica cubre aproximadamente el 40 % de la superficie de México. En muchos casos las perspectivas de éstas zonas para el desarrollo de la agricultura o ganadería no son buenas, por lo que sus habitantes, la mayoría de origen campesino, se ven en la necesidad de aprovechar los recursos forestales naturales como el nopal, candelilla, orégano, etc, que en muchos casos constituyen su fuente principal de ingresos.

El orégano (*Poliomintha longiflora Gray*), es una planta perenne que pertenece a la familia de las labiáceas (SARH, 1988). Es un arbusto aromático de 0.5 a 2.0 m de altura, con tallos prismáticos o cuadrangulares de consistencia semileñosos, erectos y ramificados, con un sistema radicular fibroso, localizándose la mayor parte de las raíces en los primeros 30 y 60 cms. de profundidad; sus hojas son opuestas, simples, enteras, con base redonda y ápice puntiagudo, presenta numerosas glándulas aromáticas características de la especie; sus flores son pequeñas de aproximadamente 2 a 3 cm de tamaño, de color púrpura, rosa o blanco y se agrupan en inflorescencias llamadas verticilastros (Castillo, 1985).

El aprovechamiento del orégano se lleva a cabo a escalas domésticas y comerciales, y no obstante de venirse aprovechando desde hace tiempo, no se ha desarrollado y mucho menos aplicado técnicas que permitan la conservación de éste recurso (Flores, 1987).

Castillo en 1985, señaló que a nivel comercial el orégano forma parte de una gran variedad de plantas condimentales las cuáles

guardan una gran importancia en el comercio internacional, tanto por sus aceites esenciales como por la industria extractiva.

La demanda del orégano depende entre otros factores, de la utilidad que se le dé. En México solo se consume el 10 % de la producción nacional, el resto se exporta a varios países siendo Estados Unidos de Norte América el principal importador con casi la mitad de las exportaciones (48 %).

En cuanto a la oferta, aunque existen varios países productores de orégano, la mayor parte de la oferta mundial (93.7 %) la cubren Grecia con un 22.5 %, Turquía 33.2 y México 38 %. En México los estados que cuentan con áreas oreganeras importantes son Nuevo León, Jalisco, Durango, Zacatecas, Hidalgo, San Luis Potosí, Guanajuato, Chihuahua, Querétaro, Oaxaca y Baja California Sur, en donde la especie representa cierto nivel de comercialización (Ramayo, 1976 Conasupo, 1985; citados por Flores, 1987).

Castillo en 1985, mencionó que en la región de Higuera N.L., el orégano tiene un lugar muy distinguido, puesto que en mercados locales visitados la mayoría del orégano colectado se vende para consumo doméstico, y en tales establecimientos se referían al orégano como un artículo de uso complementario y de mayor demanda que el clavo y la pimienta. La mayor demanda es en invierno cuando el grado de producción es óptimo, la mercancía debe ser promocionada ya que se reportan casos en que se ha tenido que quemar, pues el aroma se volatiliza y por lo tanto pierde su valor comercial.

2.2 Sistemas de reproducción de las plantas.

La propagación de las plantas implica el control de dos tipos de ciclos biológicos de reproducción: el sexual y el asexual.

El ciclo sexual utiliza la propagación por semilla mediante la cual se logran nuevas plantas individuales con características que reflejan la contribución genética de ambos progenitores.

El ciclo asexual consiste en la reproducción de individuos a partir de porciones vegetativas de las plantas, y es posible porque en muchas de éstas los órganos vegetativos tienen capacidad de regeneración. Las porciones del tallo tienen la capacidad de formar nuevas raíces y las partes de raíz pueden regenerar un nuevo tallo. Las hojas pueden regenerar nuevos tallos y raíces. Esto es posible ya que éste tipo de reproducción implica la división mitótica de las células en la cual hay una duplicación íntegra del sistema cromosómico y del citoplasma asociado de la célula progenitora, para formar dos células hijas. Las plantas propagadas vegetativamente, reproducen por medio de la réplica del ADN, toda la información genética de la planta progenitora (Hartmann y Kester, 1989).

Existen diferentes tipos de reproducción asexual, tales como la propagación por estacas, injerto, acodo, separación, división y micropropagación.

En la propagación por estacas, una parte del tallo, de la raíz o de la hoja se separa de la planta madre, se coloca bajo condiciones ambientales favorables y se le induce a formar raíces y tallos, produciendo así una nueva planta independiente, que en la mayoría de los casos es idéntica a la planta de la cual procede.

Injerto es el arte de unir partes de plantas de tal manera que se ligen y continuen su crecimiento como una sola planta. La parte de la combinación que va a constituirse en la copa o parte superior de la nueva planta se le llama púa, aguja, espiga o injerto, y aquella que va a formar la porción baja o la raíz, se le llama patrón o portainjerto.

El acodado es un método de propagación en el cuál se provoca la formación de raíces adventicias a un tallo que está todavía adherido a la planta madre. La rama acodada sigue recibiendo agua y minerales debido a que no se corta el tallo, y el xilema permanece intacto. Luego, el tallo acodado enraizado, se separa para convertirlo en una nueva planta que crece sobre sus propias raíces.

El procedimiento de propagación en que se utiliza la producción de estructuras naturalmente separables, tales como el bulbo y el cormo, por lo general se la llama separación.

En los casos en que la planta se corta en secciones, como ocurre en los rizomas, tallos y raíces tuberosas, el proceso se denomina división.

Micropropagación es la técnica para lograr el desarrollo de nuevas plantas en un medio de cultivo artificial, en condiciones asépticas, a partir de porciones muy pequeñas de plantas, tales como embriones, semillas, tallos, puntas de ramas, puntas de raíces, callo, células individuales y granos de polen (Hartmann y Kester, 1989).

2.3 Técnicas del cultivo de tejidos vegetales.

La amplitud de la definición de "cultivo de tejidos" y los numerosos objetivos que éstos persiguen constituyen serios escollos en cualquier intento de generalización sobre los factores que afectan el establecimiento de tales cultivos *in vitro*, y obligan a consideraciones previas para delimitar los alcances de los mismos (Mroginski y Roca, 1991).

El cultivo de tejidos comprende en su acepción amplia, un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuáles un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Street, 1977; Steward, 1983 citado por Mroginski y Roca, 1991).

Los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son numerosos y diferentes. Las posibilidades de aplicación de tales cultivos se pueden resumir como sigue:

- a) Estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica, y ciencias afines.
 - b) Bioconversión y producción de compuestos útiles.
 - c) Incremento de la variabilidad genética.
 - d) Obtención de plantas libres de patógenos.
 - e) Propagación de plantas.
 - f) Conservación e intercambio de germoplasma.
- (Mroginski y Roca, 1991).

2.3.1 El cultivo de ápices y sus aplicaciones.

El cultivo de yemas axilares se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas, los cuáles son divididos y subcultivados repetidamente (Perez, 1991)

En los años 60, el desarrollo de procedimientos para multiplicar y mantener plantas en cultivos asépticos recibió un impulso dramático; ello se debió al descubrimiento de la capacidad que tienen las puntas de los brotes y los meristemas cortados apropiadamente y sembrados en cultivo aséptico, para producir protuberancias capaces de crecer y desarrollarse en plántulas (American Orchid Society Bulletin, 1960, 1968; Moul, 1974; Arditti, 1977, citados por Krikorian, 1991).

Desde entonces, se han usado los cultivos de puntas de brotes y de meristemas de muchas otras plantas para obtener, mantener y multiplicar los meristemas genéticos; de una punta de brote cultivado, se regenera una planta y en otros casos se puede estimular la formación de brotes múltiples (Styer *et al.*, 1983 citado por Krikorian, 1991).

En realidad, en cada uno de éstos casos se espera a menudo lograr la formación de ramas axilares que puedan separarse y enraizarse; teóricamente los brotes axilares y laterales pueden a su vez producir ramas axilares adicionales a perpetuidad, a medida que se subcultiva cada brote recién formado o cada explante de nudo. Por lo tanto, el método es bueno para obtener una rápida multiplicación clonal, y se ha aplicado a una gran variedad de especies, desde las herbáceas hasta las leñosas (Krikorian, 1991).

2.4 Etapas de la propagación *in vitro* y factores relacionados.

Murashige en 1974, ha propuesto tres pasos o etapas fundamentales para micropropagar eficientemente una especie:

- 1) El establecimiento aséptico y brotación
- 2) Multiplicación
- 3) Enraizamiento y la preparación del inóculo para su trasplante al suelo.

2.4.1 Establecimiento aséptico y brotación.

La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos, conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias y hongos), los cuáles pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio o modificarlo. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tomar en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su ulterior incubación y manipulación (Mroginski y Roca, 1991).

Es difícil lograr cultivos completamente estériles en el estricto sentido de la palabra; por ejemplo, es probable que los virus presentes en el explante persistan en los cultivos. Hecha ésta salvedad, para establecer cultivos asépticos es conveniente o necesario: a) Trabajar en ambientes adecuados, b) esterilizar los medios de cultivo, c) desinfectar superficialmente los explantes y d) realizar los cultivos siguiendo ciertas normas de asepsia (Mroginski y Roca, 1991).

Hay una vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad, es casi generalizado el empleo de etanol al 70 % (v/v) e hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1 % al 3 % usando

productos domésticos. Con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, del 6 % al 12 %, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el cloruro de mercurio (HgCl_2 , 0.1 % a 1.5 %), aunque hay que recalcar que éste compuesto es altamente tóxico y que no es fácilmente removible del explante (Mroginski y Roca, 1991; Pérez, 1991 y Villalobos y Thorpe, 1991).

En algunos casos resulta útil agregar algún agente tensoactivo por ejemplo, tween-20, del 0.01 % al 0.1 %, pero puede ser innecesario en los procedimientos de desinfección que incluyan un primer paso con etanol al 70 %. Asimismo, es conveniente agitar (80-150 rpm) el explante conjuntamente con la solución desinfectante (Mroginski y Roca, 1991).

Con relación al explante, debemos asegurarnos de que el material vegetal a utilizar provenga de una correcta selección clonal y se encuentre en estado de crecimiento activo, vigoroso y sano. El estado fisiológico del explante es de gran influencia en el éxito, los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activo tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo. El tamaño del explante también influye; mientras más pequeño sea, tiene menor riesgo de contaminación pero es más difícil la regeneración; mientras que con el aumento de tamaño del explante hay más riesgos de contaminación y el crecimiento y la regeneración de plantas es más rápido (Pérez, 1991).

Después de tratar el explante con las soluciones desinfectantes es necesario remover de él los restos del producto, mediante varios lavados con agua destilada estéril y operando en la cámara de transferencia. Es aconsejable lavar los explantes con un volumen de por lo menos 10 a 20 veces mayor de agua estéril haciendo un mínimo de tres enjuagues sucesivos (Mroginski y Roca, 1991).

Los antibióticos aplicados al medio de cultivo pueden ser de utilidad para la desinfección de los explantes, sin embargo, en general su empleo solamente se justifica en casos específicos y en cultivos de corta duración, ya que la alta especificidad de los antibióticos implica que no previenen la proliferación de todos los microorganismos; además tales productos modifican la composición de los medios de cultivo y pueden ser metabolizados por los explantes (Mroginski y Roca, 1991).

El procedimiento para la desinfección superficial de los explantes debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantes. Los explantes provenientes de vegetales que crecen en invernaderos o en cuartos climatizados son relativamente más fáciles de desinfectar que los provenientes de plantas que crecen en el campo; también es más fácil la desinfección de explantes de órganos jóvenes que la de explantes provenientes de materiales adultos. Las aplicaciones de fungicidas o bactericidas aplicadas previamente a las plantas, pueden ser de utilidad (Mroginski y Roca, 1991).

Un problema en el establecimiento de meristemas y ápices, son las oxidaciones fenólicas, las cuales se manifiestan como un ennegrecimiento del medio de cultivo que comienza por la zona cercana al explante y se extiende a todo el medio al que puede producir la muerte. La práctica más utilizada para contrarrestar el efecto de la oxidación fenólica es la adición de sustancias antioxidantes al medio de cultivo como pueden ser el ácido ascórbico, polivinilpirolodona (PVP), cisteína y cianuro de potasio (Pérez, 1991).

Para lograr una buena asepsia en el establecimiento y ulterior manipulación de los cultivos, es preciso adoptar algunas precauciones durante las tareas que se llevan a cabo en la cámara de transferencia, por ejemplo:

1) Antes de comenzar a trabajar, es necesario desinfectar la mesa y las paredes de la cámara con etanol al 70 %. Igualmente es conveniente desinfectar la parte externa de los recipientes que contienen los medios de cultivo o el agua estéril, antes de introducirlos a la cámara.

2) Es necesario que las manos, y eventualmente los antebrazos de la persona que va a sembrar, sean desinfectados con etanol al 70 %. El uso de máscaras y gorros no es indispensable pero reduce la contaminación si se opera en flujos laminares de aire estéril.

3) Los instrumentos metálicos empleados se deben flamear previamente con etanol al 95 %. El material de vidrio utilizado como soporte para las disecciones (generalmente cajas Petri) debe estar esterilizado al igual que las pipetas que comunmente se usan en trabajos con suspensiones celulares y protoplastos.

4) Realizar las operaciones de transferencia y disección lo más cerca posible a la llama de un mechero. Evitar exposiciones prolongadas de los explantes o de los medios de cultivo en recipientes abiertos (Mroginski y Roca, 1991).

2.4.2 Multiplicación.

El objetivo de ésta fase es la producción de propagulos a partir del explante establecido. La proliferación de brotes axilares se logra con la adición de citoquininas en el medio de

cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas. La 6-Benzilaminopurina (BAP) es en general la citoquinina mas efectiva en la inducción de yemas axilares, seguida en orden decreciente por la Kinetina, el 2-ip y la Zeatina. El papel de las citoquininas en ésta fase es determinante. En algunos casos es necesaria la adición de auxinas para estimular el crecimiento de los brotes (Pérez, 1991).

En estado de crecimiento, el explante se multiplica con la formación de callos o sin ellos, según las condiciones de cultivo; también es importante señalar que la fase de crecimiento puede deberse a la división de las células, al aumento de su tamaño o a ambas cosas.

El balance auxinas-citoquininas es determinante en el coeficiente de multiplicación, por lo que al lograr un balance adecuado es posible alcanzar altas tasas de proliferación con lo que aumenta la efectividad del método.

Es conveniente cambiar el medio de cultivo después de cierto período de crecimiento ya que los explantes al formar brotes aumentan la actividad metabólica utilizando los nutrientes disponibles y agotándolos (Pérez, 1991).

Existen varias vías generales para realizar la multiplicación clonal:

a) La multiplicación de brotes de yemas terminales, axilares o laterales.

b) La organogénesis directa, en la cuál la formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en un órgano, o en alguna parte escindida de la planta.

c) La organogénesis indirecta. La formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en éste caso en el callo; es obvio que el callo se deriva inicialmente de un órgano, tejido u otra parte escindida de la planta.

d) La embriogénesis somática. Los embriones pueden formarse directamente en el explante primario, o indirectamente de las células cultivadas en suspensión o en un medio semisólido.

e) El microinjerto.

f) El cultivo de embriones (Krikorian, 1991).

2.4.3 Enraizamiento.

En ésta fase los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación crecen hasta formar plantas completas y desarrollan un sistema radical que les permite ser transplantadas a un sustrato (Pérez, 1991).

Normalmente, para la inducción de enraizamiento no es necesaria la adición de citiquininas al medio de cultivo debido al efecto residual de estas al ser adicionadas durante la propagación, ejerciendo un efecto inhibitorio en la formación de raíces (Pérez, 1991).

El proceso de enraizamiento requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. Si el sistema radical fué diferenciado *in vitro*, las plantas no se pueden transplantar directamente a las

condiciones de invernadero sin una paulatina adaptación a las condiciones del suelo, a este período de adaptación se la llama período de endurecimiento. Durante ésta fase de endurecimiento, las plantas se riegan preferentemente con medio de cultivo diluido al 50 % y posteriormente se sustituye ésta fórmula de riego por soluciones nutritivas menos complejas (Murashige, 1974).

El manejo de la concentración de las sales minerales es empleado ampliamente para estimular el enraizamiento, lográndose la formación abundante de raíces al disminuir las sales a la mitad, un tercio o un cuarto de la concentración de los medios, teniendo la desventaja de que el crecimiento de la planta es menor, lo cuál está dado por el agotamiento temprano de los nutrientes, siendo necesario hacer un nuevo subcultivo para contrarrestar este efecto (Pérez, 1991).

Se ha encontrado que son muchos y muy variados los efectos auxínicos sobre las plantas, siendo los principales los que afectan el alargamiento y la división celular, la formación de brotes, raíces, tejido calloso, dominancia apical, etc (Barba, 1987).

Cuando la proporción auxina-citocinina es relativamente alta, existe diferenciación de las células hacia primordios radiculares. Una alta concentración de citocininas con respecto a las auxinas causa la formación de brotes, por lo que si provocamos pequeños cambios en la proporción de auxina-citocinina puede obtenerse el inicio de meristemos, tanto radiculares como apicales (Hurtado y Merino, 1987).

2.4.4 Aclimatación y transferencia al suelo.

Las plantas enraizadas *in vitro*, ya están listas para ser transferidas a recipientes con un sustrato donde permanecerán durante cierto tiempo hasta alcanzar un tamaño que les permita ser plantadas en el campo (Pérez, 1991).

Para transferir las plantas del medio de cultivo al suelo, se requiere de un procedimiento cuidadoso. Las raíces de los explantes deben ser lavadas cuidadosamente para remover el medio-agar. El requerimiento más esencial para el éxito del trasplante es el de mantener a las plantas en una extrema humedad (90-100 %), durante los primeros 10 a 15 días manteniéndolas bajo niebla o cubriéndolas con bolsas de plástico transparentes, se pueden hacer pequeños agujeros en el plástico para la circulación de aire. Después de pasar algunos días bajo alta humedad relativa, las plantas son movidas a un invernadero pero continúan de la misma forma durante unos días más. Después de éste período adicional ya han pasado 4-6 semanas después del trasplante, las plantas ya están listas para crecer bajo condiciones normales de invernadero (Bhojwani y Razdan, 1986).

Los sustratos empleados están compuestos por mezclas de arena, suelo, materia orgánica, vermiculita o zeolita, con una estructura física que permita un fácil crecimiento de las plántulas jóvenes (Bhojwani y Razdan, 1986).

Durante las primeras semanas de ser plantadas las *in vitro* plantas en el sustrato, se debe mantener una humedad alta y se debe regular la intensidad luminosa para facilitar la adaptación de las mismas y evitar la muerte por desecación o quemaduras solares. Posteriormente, se pueden retirar los cobertores y mantener las plantas a pleno sol. Esto es en el

caso de países tropicales donde el clima lo permite, en caso contrario es necesario mantener las plantas en invernaderos en condiciones ambientales controladas (Pérez, 1991).

III. MATERIALES Y METODOS

Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L. durante el periodo comprendido entre Enero y Agosto de 1993.

3.1 Material vegetal.

El material vegetal utilizado se obtuvo de una planta colectada a finales de Enero de 1993 en la Sierra del municipio de Higueras, N.L. Dicha planta fué tomada al azar con el único criterio de buena sanidad y vigor aparente. Midió 41 cm de altura y tenía varias ramificaciones. Esta planta se mantuvo en el invernadero de la Facultad de Agronomía durante una semana, después de lo cuál se estableció *in vitro*. Este mismo material fué utilizado en todos los experimentos, pero sólo en el primero (establecimiento aséptico) se desinfectó, y posteriormente fué subcultivado para contar con suficiente material en los demás experimentos.

3.2 Preparación de medios de cultivo.

La elaboración de todos los medios de cultivo utilizados en éste trabajo se hizo a partir de soluciones concentradas, las cuáles a su vez fueron preparadas utilizando compuestos químicos en grado reactivo.

Se utilizó el medio básico de Murashige y Skoog (1962) el cuál está compuesto por los reactivos indicados en el Cuadro 1.

Se prepararon cuatro soluciones 100 veces concentradas y una 50 veces, agrupando los reactivos de acuerdo con su similitud y compatibilidad tal como se señala en el Cuadro 2. Este Cuadro también señala la concentración de las soluciones de los

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo utilizado en los experimentos de orégano.

Reactivo	mg l ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
MnSO ₄ · 4H ₂ O	17
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
KI	0.83
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6.2
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
Na ₂ · EDTA	37.3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
Tiamina-HCl	0.4
Mio-inositol	100
Sacarosa	30000
Reguladores del crecimiento	variable
Phytigel ^{MR}	1800

Cuadro 2. Composición de las soluciones concentradas utilizadas para preparar el medio de cultivo.

Solución I (Nitratos)	Concentración 50 X
Compuesto	mg l ⁻¹
NH ₄ NO ₃	82500
KNO ₃	95000
Solución II (Sulfatos)	Concentración 100 X
Compuesto	mg l ⁻¹
MgSO ₄ . 7H ₂ O	37000
MnSO ₄ . 4H ₂ O	1700
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	860
CuSO ₄ . 5H ₂ O	2.5
Solución III (Halógenos)	Concentración 100 X
Compuesto	mg l ⁻¹
CaCl ₂ . 2H ₂ O	44000
KI	83
CoCl ₂ . 6H ₂ O	2.5
Solución IV (Fosfatos y Boratos)	Concentración 100 X
Compuesto	mg l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	17000
H ₃ BO ₃	620
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	25
Solución V	Concentración 100 X
Compuesto	mg l ⁻¹
Na ₂ . EDTA	3730
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2780
Otras soluciones	
Tiamina-HCl	20 mg/100 ml
Mio-inositol	1 g/100 ml
BAP	20 mg/100 ml
AIA	20 mg/100 ml
AIB	20 mg/100 ml
ANA	20 mg/100 ml

(Carrillo, 1988).

fitoreguladores utilizados, que en todos los casos fueron marca Sigma.

Finalmente, a continuación se muestra el procedimiento que se efectuó para la elaboración de un litro de medio de cultivo como ejemplo; cabe señalar que al medio básico MS se le adicionó en todos los experimentos 0.4 mg l^{-1} de tiamina, 100 mg l^{-1} de mio-inositol, 30 g l^{-1} de sacarosa y diferentes reguladores del crecimiento.

1. A un vaso de precipitado se agregó un 50 % de agua bi-distilada del volumen total del medio a preparar (500 ml para preparar un litro). Se colocó un imán magnético en el fondo del vaso y se puso éste sobre un agitador magnético.

2. Se adicionaron las siguientes cantidades de las soluciones concentradas: 20 ml de solución I, 10 ml de las soluciones II, III, IV, V y mio-inositol y 2 ml de tiamina.

3. Se agregaron los reguladores del crecimiento y 30 g de sacarosa.

4. Se aforó a un litro.

5. Se ajustó el pH a 5.8 ± 0.05 utilizando NaOH y HCl 0.1 y 1 N.

6. Se adicionó 1.8 g de phytigel^{NR} y se disolvió en un horno de micro-ondas durante 5-7 minutos.

7. Se sirvieron los recipientes cubriéndolos con tapas de polipropileno y esterilizándolos en una autoclave a una temperatura de 121°C , a una presión de 15 PSI (1.1 Kg cm^{-2}) durante 15 minutos.

3.3 Ambiente de cultivo.

Todos los contenedores utilizados en los experimentos fueron colocados en un cuarto de crecimiento que se encuentra permanentemente a una temperatura de $26^{\pm} 1^{\circ}\text{C}$. Este control de temperatura se logra mediante el uso de un clima artificial. Se tuvieron cinco lámparas de iluminación fluorescente de luz blanca o tubos de neón de 75 watts cada uno, las cuales son reguladas para proporcionar un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 oscuridad utilizando un reloj (timer).

3.4 Descripción de experimentos.

Se realizaron un total de tres experimentos durante el período comprendido entre Enero y Agosto de 1993. De éstos, sólo el primer experimento fue repetido dos veces en fechas distintas.

3.4.1 Establecimiento aséptico.

Se evaluaron tres diferentes concentraciones de Cloralex^{MR} como agente desinfectante para el establecimiento *in vitro* de orégano (este producto comercial contiene hipoclorito de sodio al 6 % como ingrediente activo).

La desinfección se llevó a cabo colocando brotes de aproximadamente 30 mm de longitud en un recipiente con agua y detergente. Posteriormente fueron enjuagados con agua corriente y colocados en un recipiente conteniendo alcohol al 80 % durante 30 segundos e inmediatamente después fueron transferidos a las soluciones de Cloralex^{MR} al 5, 10 y 15 % (v/v) durante 15 minutos, dichas soluciones contenían una gota de tween-20 por 100 ml de solución. Posteriormente, se dieron tres enjuagues con agua bi-destilada estéril.

Los brotes fueron cortados en su parte basal de tal forma que todos midieron 10 mm de longitud, se cortaron también las hojas dejando solo un par apical. Después, se realizó la transferencia de los brotes al medio de cultivo colocando dos brotes por frasco de alimento infantil en 10 frascos por tratamiento, lo cuál dió un total de 20 repeticiones. El medio de cultivo utilizado fue el MS con los suplementos descritos en la sección de preparación de medios (3.2) adicionando además 0.2 mg l^{-1} de Ac. naftalenacético y 1 mg l^{-1} 6-Bencil aminopurina. Se tomaron datos a los 5, 10, 20, 30 y 50 días después de la siembra o transferencia.

Los datos evaluados fueron: contaminación, oxidación, callosidad, tamaño del brote y número de hojas. La contaminación se expresó como el porcentaje de explantes que mostraron presencia de hongos o bacterias a simple vista, lo mismo ocurrió con la oxidación, de tal forma que si se tuvieron 10 explantes oxidados de un total de 20 por ejemplo, se registró un 50 % de oxidación. La callosidad del explante también se expresó en porcentaje y en algunos casos en magnitud, normalmente cuantificada ésta con una escala visual arbitraria. Este experimento fue repetido dos veces con 13 días de diferencia.

3.4.2 Crecimiento de brotes.

En éste experimento se comparó el crecimiento obtenido al utilizar dos explantes: El ápice de 10 mm de longitud y el segmento nodal del mismo tamaño. Ambos pueden ilustrarse en la Figura 1.

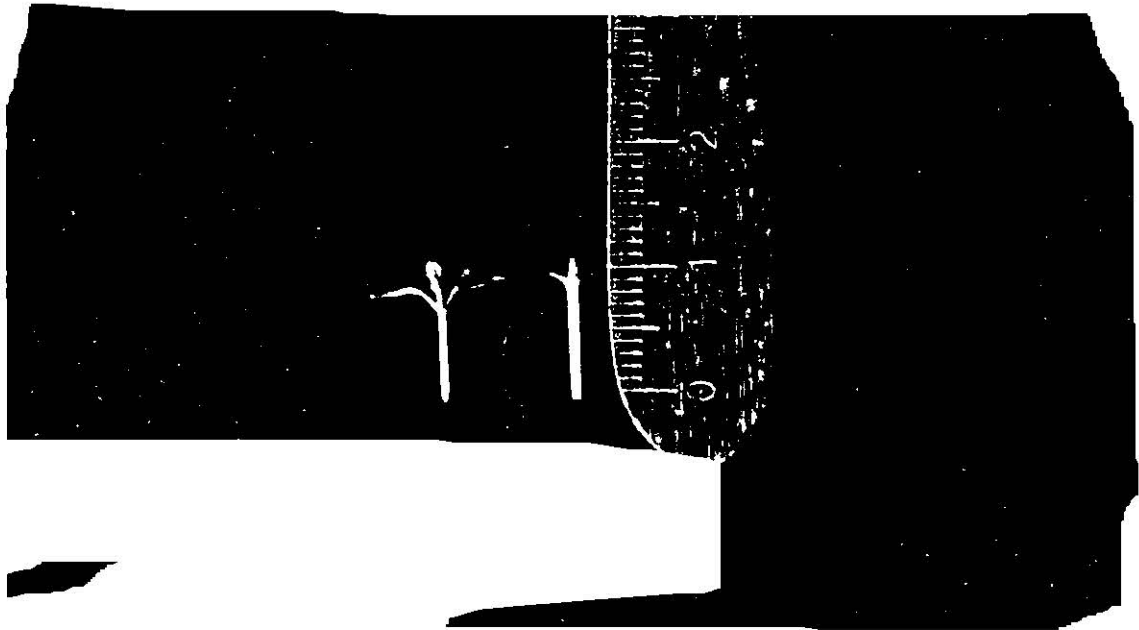


Figura 1. Explantes utilizados para evaluar el crecimiento y multiplicación *in vitro* de orégano.

En el caso del segmento nodal, se le removieron las hojas dejando libres a las yemas axilares, mientras que en el caso del ápice, se dejó el par de hojas más cercano al meristemo apical aéreo.

Cada tratamiento se estableció en tubos de cultivo de 150X25 mm con 10 repeticiones cada uno. Se utilizó un diseño completamente al azar y se tomaron mediciones a los siete, 14, 28, 32 y 42 días después de la transferencia. Los 20 explantes utilizados procedían de plántulas obtenidas en el experimento de establecimiento aséptico. Se utilizó el mismo medio que para establecimiento aséptico y las variables cuantificadas fueron:

altura de planta, número de hojas y número de brotes por explante; sin embargo, sólo se realizó análisis de varianza para altura de planta.

3.4.3 Enraizamiento.

A partir de vástagos asépticos procedentes del experimento de crecimiento de brote, se estableció éste experimento para comparar el efecto de tres reguladores del crecimiento de naturaleza auxínica en el enraizamiento de dichos vástagos.

Para lograr lo anterior, se cortaron ápices de 15mm de longitud y se colocaron en cuatro medios de cultivo los cuáles diferían entre sí únicamente en el regulador de crecimiento presente, ya que todos éstos se aplicaron a una concentración de 1 mg l^{-1} . Los tratamientos evaluados fueron: Acido indolacético (AIA), Acido indolbutírico (AIB), Acido naftalenacético (ANA), y un tratamiento control sin reguladores del crecimiento.

Se utilizó un diseño completamente al azar, en donde cada tratamiento tuvo nueve repeticiones, y cada una de ellas consistió en un tubo de cultivo de 150X25 mm con 12 ml de medio.

Se evaluó el porcentaje de enraizamiento, el número y longitud de raíces, la altura de planta, el número de hojas y la presencia de callo y oxidación; todas estas variables se midieron a los siete y 14 días después de la transferencia.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Establecimiento aséptico.

Los tres tratamientos evaluados tuvieron una asepsia del 100 %, es decir no hubo contaminación alguna, sin embargo , se tuvo casi un 100 % de brotes oxidados desde el momento de la siembra (Cuadro 3). Este tipo de oxidaciones son un problema en el establecimiento de meristemos y ápices en algunas especies manifestandose como un enegrecimiento del medio de cultivo que comienza por la zona cercana al explante y se extiende en ocasiones a todo el medio de cultivo reduciendo el crecimiento e incluso produciendo la muerte de la planta.

Cuadro 3. Contaminación y oxidación en ápices de orégano desinfectados con diferentes concentraciones de Cloralex^{MR 1}.

Cloralex (%)	Contaminación (%)	Oxidación (%)	Magnitud de la oxidación
5	0	50	severo
10	0	100	severo
15	0	100	severo

¹Estos mismos datos se obtuvieron a los 0, 5, 10, 20, 30 y 50 días después de la siembra.

La práctica mas utilizada para contrarrestar el efecto de la oxidación fenólica es la adición de sustancias antioxidantes al medio de cultivo como pueden ser el ácido ascórbico, polivinilpirolodona(PVP), cisteina y cianuro de potasio (Pérez,1991).

En éste caso, la oxidación parece deberse a una prolongada exposición de los explantes al oxígeno ambiental después de haber sido desinfectados estos, ya que se realizaron primero todos los cortes y posteriormente se sembraron. Este supuesto fue comprobado y superado en una segunda siembra realizada 13 días después, en donde después de ser desinfectados los explantes con un tamaño ligeramente mayor al definitivo (30 mm), se cortaron al tamaño final (10 mm) tres o cuatro ápices e inmediatamente se sembraron, posteriormente se cortaron otros tres o cuatro y se sembraron, y así sucesivamente.

Cabe señalar que todos los brotes oxidados no se recuperaron en los 50 días que duró el trabajo, y sólo 10 brotes (50 %) del tratamiento con 5 % de Cloralex^{MR} respondieron a la brotación y se les dió seguimiento, encontrándose que a los 20 días después de la siembra se detectó su primer cambio de tamaño, pasando de 10 mm iniciales a 17 mm. El número de hojas promedio se incrementó de 2 a 3.4 a los 20 días después de la transferencia. En esa misma fecha, los brotes tenían un vigor aceptable y había un 36 % de brotes con callo basal pequeño. Posteriormente no hubo cambios en el tamaño ni en el número de hojas de los brotes, por el contrario estos se tornaron ligeramente anormales, sin embargo, el porcentaje de brotes con callo se incrementó al 100 % a los 30 días después de la transferencia aumentando ligeramente de magnitud.

El comportamiento en el crecimiento del brote pareció ser anormal comparado con siembras posteriores. Lo que parece haber ocurrido es que los explantes estaban dañados desde el momento de la siembra y no sólo los de aparente oxidación sino todos, es por ello que tardaron 20 días en crecer 7 mm y ahí detuvieron su crecimiento organizado iniciando la formación y crecimiento de callo.

En la segunda siembra de éste experimento efectuada 13 días después de la primera, se encontró una asepsia total sin oxidación alguna en los tres tratamientos. Lo anterior denota una corrección en la metodología de establecimiento *in vitro* ya que se superó el problema operativo que fué el que indujo la oxidación en la primera siembra. En éste segundo caso se tuvo un crecimiento normal en el 100 % de los brotes.

4.2 Crecimiento de brotes.

Los promedios obtenidos de los datos para cada tipo de explante se observan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Crecimiento de brotes de orégano al utilizar dos tipos de explantes¹.

Variable/Explante	Días después de la transferencia					
	0	7	14	28	32	42
Altura de planta (mm)						
Apice	10	11	18	35	37	43
Segmento nodal	10	10	10	25	28	31
Número de brotes/explante						
Apice	1	1	1.7	1	2.3	2.4
Segmento nodal	1	1	2.3	3	3.2	3.6
Número total de hojas						
Apice	2	4	7	8	19	21
Segmento nodal	0	0	6	6	23	29
Número de hojas/brote						
Apice	2	4	4.1	8	8.3	8.8
Segmento nodal	0	0	2.6	2	7.2	8.1

¹Datos promedio de 10 plantas.

Para altura de planta, el análisis estadístico sólo detectó diferencias altamente significativas al nivel de significancia del 1% a los 14 días después de la transferencia, en donde el ápice superó en tamaño al segmento nodal en un 80% (Cuadros 4 y 5). A los siete, 28, 32 y 42 días después de la transferencia también el ápice tuvo una mayor altura de planta, aún y cuándo no se pudo detectar diferencia estadística.

La mayor altura de planta obtenida en la siembra de ápices, se debe principalmente a la presencia de dominancia apical, proceso caracterizado por un crecimiento vertical y poco ramificado, a diferencia del uso segmentos nodales en los cuáles al cortarse el ápice se rompe ésta dominancia apical y se promueve la brotación axilar.

La mayor altura de planta promedio fué de 43 mm y se obtuvo a los 42 DDT.

A pesar de que el crecimiento en altura de planta no muestra una fase estacionaria a los 42 DDT, las plántulas no fueron mantenidas por mas tiempo en ese medio considerando que después de éste período, el crecimiento tiende a detenerse, y se sabe que uno de los objetivos de utilizar las técnicas del cultivo de tejidos vegetales es la reducción de tiempos acelerando el crecimiento. Esta detención o estacionamiento del crecimiento se debe al agotamiento de nutrientes del medio de cultivo, y al tamaño del contenedor el cual está limitado a 150 mm de longitud menos el espacio ocupado por el medio lo cual nos queda sólo 100 mm disponibles para el crecimiento aéreo. Con base en lo anterior, se recomienda subcultivar los brotes de orégano cada cuatro semanas.

Cuadro 5. Análisis de varianza para altura de planta de orégano a los 14, 32 y 42 días después de la transferencia utilizando dos tipos de explantes.

14 Días después de la transferencia

FV	GL	CM	F	P>F
Tratamiento	1	352.8	21.3	0.000 **
error	18	16.6		
total	19			

C.V.=28.7%

32 Días después de la transferencia

FV	GL	CM	F	P>F
tratamiento	1	432.4	2.7	0.113 NS
error	18	158.4		
total	19			

C.V.=39.0%

42 Días después de la transferencia

FV	GL	CM	F	P>F
Tratamiento	1	696.2	3.9	0.062 NS
error	18	179.6		
total	19			

C.V.=28.7%

Con relación al número de brotes por explante, se observa una superioridad del segmento nodal con respecto al ápice entre los 14 y 42 días después de la transferencia (DDT). A los 42 DDT el segmento nodal superó el número de brotes por explante comparado con el ápice (3.6 vs 2.4). Lo anterior está estrechamente relacionado con la altura de planta ya que parece presentarse el efecto de compensación al tener los segmentos nodales un mayor número de brotes pero de menor tamaño, es decir que se dá una relación inversa en términos de la distribución energética la cuál en el caso de los segmentos nodales es mayormente utilizada para sostener el crecimiento de cuatro brotes, mientras que en los ápices, sólo de dos, propiciando en éstos últimos un mayor tamaño.

El hecho de que los segmentos nodales tengan un mayor número de brotes por explante que los ápices comprueba el rompimiento de la dominancia apical y por lo tanto la promoción de la emergencia de brotes axilares.

De lo anterior parece quedar claro que si nuestro objetivo fuése la rápida multiplicación de brotes, se utilizaría al segmento nodal como explante, mientras que si deseamos enraizar brotes pudiéramos utilizar indistintamente cualquiera de los dos tipos de explantes, con la salvedad de que en el caso del uso de segmentos nodales se pueden tener siete explantes de 10 mm contra tres en el caso de ápices, a los 28 DDT.

El número total de hojas muestra una similitud en los dos explantes entre los 0 y 28 DDT, después de lo cual, el segmento nodal supera al ápice, pero cómo éste tiene mayor número de brotes por explante, el número de hojas por brote es menor en los segmentos nodales que en los ápices.

4.3 Enraizamiento.

El Cuadro 6 muestra los porcentajes y promedios de las observaciones realizadas en el experimento a los siete y 14 días después de la transferencia (DDT). En relación con las características morfológicas relacionadas con el enraizamiento, se observa que sólo el Acido indolacético (AIA) y el tratamiento control fueron capaces de inducir la formación de raíces de *novo*.

Cuadro 6. Respuestas de ápices de orégano a tres auxinas adicionadas al medio de cultivo¹.

Auxina	Enraizamiento (%)		Número de Raíces ²	Longitud de Raíces ² (mm)	Altura de Planta ² (mm)	Número de Hojas ²	Callo (%)
	7 DDT	14 DDT					
AIA	33	89	4.6	3	19	6	0
AIB	0	0	0	0	18	8	22
ANA	0	0	0	0	21	6	78
CONTROL	33	100	3.5	5	30	10	0

¹Porcentajes y promedios de nueve repeticiones.

²Datos tomados a los 14 DDT.

En ambos casos, el porcentaje de contenedores con brotes enraizados fué el mismo a los siete DDT (33 %) y ligeramente superior en el tratamiento control a los 14 DDT con un 100 %, contra 89 % del tratamiento con AIA. Lo anterior parece indicar que la adición de Acido indolbutírico (AIB) y Acido naftalenacético (ANA) fueron inhibidores del enraizamiento de brotes de orégano considerando el hecho de que al omitir éstos

fitoreguladores se obtuvo un 100 % de brotes enraizados. En el caso de AIA pareciera que es inductor de formación de raíces sin embargo, el conocimiento existente soporta la explicación de una posible inactivación del AIA, ya que se sabe que éste fitoregulador es termolábil y fotosensible de tal forma que al momento de la esterilización pudo quedar el medio de cultivo con AIA, igual al del tratamiento control.

Los dos tratamientos que mostraron enraizamiento tuvieron un número de raíces promedio similar (4.6 con AIA y 3.5 con el control) lo cuál soporta en gran medida la asunción de la similitud de medios; Por otra parte, la longitud promedio de raíces muestra una pequeña diferencia, en donde el testigo superó con 2 mm al medio con AIA. Esta superioridad en tamaño de raíz del tratamiento testigo, parece compensar en parte la diferencia en número de raíces.

Considerando que las plantas requeridas para aclimatación requieren un tamaño y vigor adecuados, además de la raíz se hicieron mediciones del tamaño de planta y del número de hojas. La altura de planta fue muy uniforme en los medios que contenían AIA, AIB y ANA con alturas promedio de 19, 18 y 21 mm respectivamente, lo cual nos indica claramente que los ápices sembrados 14 días antes permanecieron vivos pero con poco crecimiento organizado, ya que al momento de la siembra tenían 15 mm, sin embargo, los medios con AIB y ANA presentaron un 22 y 78 % de tubos con callosidades respectivamente lo cuál indica la existencia de crecimiento indiferenciado, es decir, la energía tomada del medio de cultivo además de utilizarse para el mantenimiento del ápice, se utilizó en la formación de callo. Se sabe que éstos dos fitoreguladores son inductores de callo al igual que el 2,4-D, el cuál también es de naturaleza auxínica (Barba, 1987).

Al igual que la altura de planta, el número de hojas fue similar, excepto en el testigo el cuál tuvo 10 hojas en promedio comparado con 6, 8 y 6 de los otros tratamientos. Esto denota un mayor vigor en las plántulas obtenidas en el tratamiento control. El tratamiento sin reguladores de crecimiento, además de haber enraizado, creció considerablemente de 15 mm a 30 mm en 14 días. Este crecimiento parece no depender de la existencia de raíces ya que en experimentos anteriores se presentó una tasa de crecimiento similar en brotes sin raíz.

Respecto a la oxidación, cabe mencionar que ninguno de los tratamientos evaluados mostró oxidación durante los 14 días de estudio, pero, al igual que en el experimento de crecimiento de brotes, se observó oxidación foliar en períodos prolongados de cultivo (mayores de 40 DDT).

Basados en todo lo anterior, se puede inferir que el uso de reguladores del crecimiento para el enraizamiento *in vitro* de orégano, no es necesario, y de hecho es inútil; por otro lado, la aplicación del mismo medio de cultivo usado en las etapas I y II de la micropropagación pero sin reguladores del crecimiento, origina plántulas con buen enraizamiento además de promover el crecimiento de brotes en un corto tiempo. Debido a que éstos datos fueron obtenidos de una sola siembra, se deben de considerar con reserva, y se sugiere repetir el trabajo para tener una confianza absoluta.

La Figura 2 muestra la apariencia de las plántulas de orégano obtenidas a partir del explante inicial.

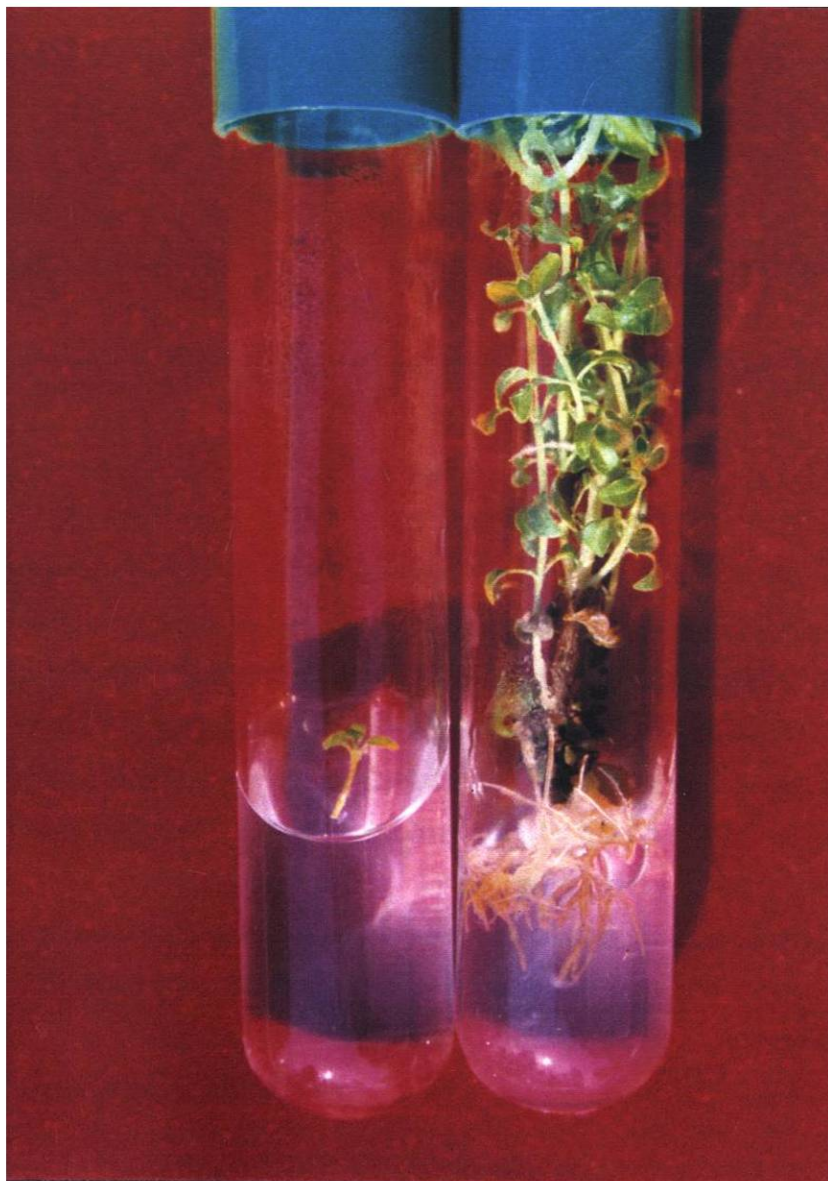


Figura 2. Apariencia de las plántulas de orégano obtenidas a las seis semanas (cuatro en crecimiento y multiplicación, y dos en enraizamiento).

Integrando los resultados obtenidos en los experimentos realizados en las tres etapas de micropropagación, se ha elaborado un esquema que muestra el potencial reproductivo de la especie en función del tiempo, utilizando ésta técnica (Cuadro 7).

Se puede observar que en un período de ocho meses pueden obtenerse 2'391,484 plantas aclimatadas y listas ya sea para vivero, o bien para reforestación directa de áreas no cultivadas, o incluso para el establecimiento de una plantación comercial. Cualquiera de éstas opciones justifica ampliamente la inversión, la cuál no es muy costosa, si el laboratorio utilizado no es exclusivo para la reproducción de orégano.

La bondad de la técnica de micropropagación ha sido descrita por Hartmann y Kester en 1989, en donde señalan que en algunos laboratorios comerciales se pueden producir de 1 a 3 millones de plantas por año; cómo ejemplos de plantas de ésta categoría se pueden citar el helecho de boston (*Nephrolepis*), fresa (*Fragaria*), lirio (*Lilium*), Gerbera, orquídeas *Cymbidium*, *Anthurium* y *Philodendron*. La rapidéz de multiplicación con el uso de la técnica tiene aplicación particular en especies que se reproducen lentamente por los métodos de propagación convencionales como división, separación o hijuelos. Otro uso importante es la rápida multiplicación de cultivares nuevos o mejorados que se introducen al comercio procedentes de programas de fitomejoramiento.

CUADRO 7. Micropropagación potencial de orégano de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo¹

1	Plántula		establecimiento y multiplicación
9	Plántulas	4 SEMANAS	
81	Plántulas	4 SEMANAS	multiplicación
729	Plántulas	4 SEMANAS	multiplicación
6,561	Plántulas	4 SEMANAS	multiplicación
59,049	Plántulas	4 SEMANAS	multiplicación
531,441	Plántulas	4 SEMANAS	multiplicación
4,782,969	Plántulas	4 SEMANAS	multiplicación
4,782,969	Plántulas	2 SEMANAS	enraizamiento
2,391,484	Plántulas	6 SEMANAS	aclimatación
TOTAL		36 SEMANAS	(8 meses)

1. Considerando un subcultivo c/4 semanas, un 100% de enraizamiento en dos semanas y seis semanas para aclimatación; además una tasa de multiplicación de 1:9 (1 explante: 3 brotes, cada uno con 3 explantes) y un 50% de mermas en aclimatación y transferencia a suelo.

V. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos y para las condiciones de temperatura, iluminación y humedad relativa prevalecientes en el laboratorio, se puede concluir que:

El uso de soluciones de Cloralex^{MR} al 5, 10 y 15 % (v/v) durante 15 minutos para la desinfección de ápices de brotes de orégano, fueron efectivas para su establecimiento aséptico.

Los dos explantes evaluados, es decir, el ápice y el segmento nodal, tuvieron un buen crecimiento en el medio de cultivo utilizado, pero el ápice superó en altura de planta al segmento nodal durante todo el ciclo de cultivo, aunque sólo a los 14 días después de la transferencia ésta diferencia fué significativa estadísticamente. El segmento nodal tuvo más brotes por explante que el ápice entre los 14 y 42 días después de la transferencia y el número total de hojas también fue mayor en el segmento nodal a los 32 y 42 días después de la transferencia, caso contrario ocurrió con el número de hojas por brote.

El orégano no requiere de fitoreguladores para el enraizamiento *in vitro* de brotes, por el contrario el Acido indolbutírico y el Acido naftalenacético a una concentración de 1 mg l⁻¹ resultaron inhibitorios.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Barba A, A. 1987. Reguladores de crecimiento vegetal. En: Hurtado M, D.V. y M.E. Merino. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, México. pp: 48-66.
- Bhojwani, S.S. and M.K. Razdan. 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Elsevier. New York. pp: 313-337.
- Carrillo C., G. 1988. Técnicas Elementales de Biotecnología Agrícola. Secretaría de Educación Pública. 91 p.
- Castillo, E.J. 1985. Aspectos entobotánicos y autoecológicos de *Poliomintha longiflora Gray* en la Ranchería "Los Picos" municipio de Higuera N.L. Tesis. Facultad de Ciencias Biológicas. 50 p.
- Flores, G.J. 1987. Ensayo de predicción del rendimiento de orégano (*Lippia Berlandieri, Shower*) en la zona Norte de Jalisco; Tesis. Colegio de Post-grado Chapingo México pp: 233-241.
- Hartmann, H.T. y D.E. Kester. 1989. Propagación de Plantas. Principios y Prácticas, Editorial Continental, S.A. de C.V. México. 760 p.
- Krikorian, A.D. 1991. Propagación Clonal *in vitro*. En: Roca, W.M. y L.A. Mroginski. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Ed. CIAT. Cali Colombia. pp: 95-123.

- Mroginski, L.A. y W.M. Roca. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En: Roca W.M. y L.A. Mroginski. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Ed. CIAT, Cali Colombia. pp: 19-40
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 135-166
- Pérez P,J. 1991. Micropropagación Vegetal. Notas del Curso. Universidad Central de las Villas. Cuba. pp: 1-9
- Robert, M.L. y V.M. Loyola. 1985. El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. En: El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. M.L. Robert y V.M. Loyola (eds.) pp: 21-26
- SARH. 1988. Proyecto para la instalación de una planta beneficiadora de orégano en el ejido de "San Juan Capistrano" municipio de Valparaiso, Zacatecas. Ed. SARH. Zacatecas. (sin publicar).
- Steet, H.E. 1977. Introduction. En: Street, H.E. (ed.) *Plant Tissue and Cell Culture*. University of California Press. Berkeley, California. pp: 1-10
- Villalobos, V.M. y T.A. Thorpe. 1991. Micropropagación: Conceptos, metodologías y resultados. En: Roca W.M. y L.A. Mroginski. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. pp: 127-141

