



Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

|  |  |                                     |                                     |                                     |  |
|--|--|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| Unidad:                                  | Saltillo                                     | División:                           | Agronomía                           | Departamento:                       | Fitomejoramiento   |
| Tema estratégico (ANA/PEP):              | Biotecnología                                |                                     |                                     |                                     |  |
| Línea de investigación:                  | Biotecnología de Plantas                     |                                     |                                     |                                     |  |
| Título del proyecto:                     | Micropropagación de <i>Lippia graveolens</i> |                                     |                                     |                                     |  |
| Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000) | 50,000.00                                    | El proyecto es:                     | Nuevo                               | <input checked="" type="checkbox"/> | Continuación   |
| Tipo de investigación:                   | Básica                                       | Aplicada                            | <input checked="" type="checkbox"/> | Tecnológica                         | e-mail del responsable: <a href="mailto:hgosuna@hotmail.com">hgosuna@hotmail.com</a> |
| Vinculación:                             | Si   | <input checked="" type="checkbox"/> | No                                  | Fondos concurrentes:                | \$40,000.00  |
| Cooperante(s):                           | Calli Productores del Desierto SPR de RL     |                                     |                                     |                                     |  |
| Entidad (es):                            | Coahuila                                     | Municipio (s):                      | Saltillo                            |                                     |  |
| Localidades:                             | Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro   |                                     |                                     |                                     |  |
| A realizar durante el(los) año(s):       | 1 año  |                                     |                                     |                                     |  |

| Participantes     |                                    | Adscripción (Clave Depto.) | Expediente No.  | Firma |
|-------------------|------------------------------------|----------------------------|---|-------|
| Responsable       | Dra. Hermila Trinidad García Osuna | 0203                       | 4220  |       |
| Colaborador:      | Dra. Francisca Godina Ramírez      | 0203                       | 1145  |       |
| Colaborador:      | Dr. Valentín Robledo Torres        | 3612                       | 3031  |       |
| Colaborador:      | Dr. M. Humberto Reyes Valdés       | 0203                       | 2174  |       |
| Colaborador:      | Dra. Erika Nohemi Rivas Martínez   | 3614                       | 3923  |       |
| Colaborador:      |                                    |                            |   |       |
|                   |                                    | Grado por obtener          | Matrícula   | Firma |
| Tesista:          | Keyla Pérez Velázquez              | Licenciatura               | 41140674  |       |
| Programa Docente: |                                    |                            |   |       |
| Tesista:          |                                    |                            |   |       |
| Programa Docente: |                                    |                            |   |       |
| Tesista:          |                                    |                            |   |       |
| Programa Docente: |                                    |                            |   |       |
| Vo. Bo.           |                                    | Autoriza                   |   |       |
| Firma y sello     |                                    |                            |   |       |
| Nombre            | Jefe de Departamento               |                            | Dr. Armando Robledo Olivo<br>Subdirector de Programación y Evaluación |       |

Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

## Protocolo para Proyecto de Investigación 2018

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1.-Título del proyecto                               | Presupuesto solicitado: |
| Micropropagación de <i>Lippia graveolens</i> (Kunth) | 50,000.00               |

### 2.- Introducción

La vegetación de las zonas áridas de México está representado por una gran diversidad biológica escasamente estudiado. Dentro de esta gran riqueza de Coahuila, se encuentra *Lippia graveolens* (Kunth) es una planta herbácea de la familia Verbenaceae; es una especie aromática distribuida en México en los estados de Zacatecas, Durango, Chihuahua, Coahuila y Tamaulipas, Nuevo León. Hidalgo. Tiene gran importancia económica y comercial en el estado de Coahuila, su producción representa una cuarta parte de la exportación a nivel nacional.

Es una planta con diversas aplicaciones, dentro de éstas, destaca el uso medicinal ya que posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, virucidas antimicrobianas, fungicidas, actúa en enfermedades gastrointestinales, respiratorias, reumáticas, además el aceite esencial tiene aplicaciones culinarias, así como también sus compuestos activos son efectivos contra los ácaros.

Una de las principales problemáticas que enfrenta esta especie es el hecho de ser cosechada de poblaciones silvestres y durante la época de floración y fructificación, lo cuál afecta el desarrollo de la semilla y como consecuencia el reclutamiento de nuevos individuos en la población, disminuyendo el tamaño poblacional y su densidad.

Una alternativa para disminuir el impacto en poblaciones silvestres es la aplicación de herramientas biotecnológicas como el cultivo de tejidos vegetales, que favorezca la propagación, conservación y establezcan canales para su mejoramiento genético. La aplicación de estas herramientas posibilitaría la domesticación de esta especie.

Los protocolos de micropropagación del genero *Lippia* han sido establecidas por diferentes investigadores a nivel mundial. Los resultados obtenidos han sido a través de la organogénesis directa en especies como *L. alba*, mientras en otras especies *Lippia spp.* solo se encontró activación y elongación de los explantes nodales sin lograr un incremento en su propagación. Es por ello la necesidad de optimizar la técnica de micropropagación con diferentes reguladores de crecimiento, para posteriormente establecer las bases para inducir el mejoramiento genético.

### Objetivos

- Germinar semillas de *L. graveolens in vitro*
- Micropropagar *L. graveolens* a partir de plántulas y segmentos nodales

### Hipótesis

Es posible germinar y generar un protocolo para la micropropagación *in vitro* de *L. graveolens*.

### 3.-Revisión de Literatura

*Lippia graveolens* es conocida comúnmente como "orégano mexicano", "mejorana", "orégano de monte", es una planta herbácea perteneciente a la familia Verbenaceae, se caracteriza por contener compuestos aromáticos. En México se distribuye en 24 estados, entre ellos se encuentran Baja California Sur, Zacatecas, San Luis Potosí, Sonora. Desde la época de los años 80, esta especie es recolectada en los estados del norte y centro del país. En los estados de Chihuahua, Tamaulipas, Durango y Coahuila, se expide el 50% de los permisos de colecta. En Coahuila el 90% de la producción de orégano se obtiene de poblaciones silvestres, de este volumen, el 80% de la hoja seca es destinada

para la exportación. Los principales países importadores son Estados Unidos, Reino Unido, Alemania, Francia y Canadá (CONAFOR).

La producción global se estima en alrededor de 15,000 toneladas, siendo México el segundo país productor después de Turquía (García-Pérez *et al.*, 2012).

Muchos compuestos fitoquímicos están siendo estudiados en la búsqueda de su capacidad para hacer frente a problemas de salud. Estos compuestos de origen vegetal pueden trabajar como sustratos para reacciones bioquímicas que proporcionan beneficios a la salud. En algunos casos actúan en la absorción y la estabilidad de los nutrientes esenciales, ejercen efectos beneficiosos sobre la flora intestinal en humanos (factores de crecimiento, sustratos de fermentación, o inhibidores de bacterias intestinales nocivas). Algunos de estos fitoquímicos, particularmente del aceite esencial presentan actividad biocida contra virus, bacterias, hongos patógenos y fitopatógenos (Ávila-Sosa *et al.*, 2010; Cueto-Wong *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2013). Dentro de los compuestos químicos con actividades medicinales se encuentran: terpenos, fenoles, flavonoides (Lin *et al.*, 2007; González *et al.*, 2007; González-Güereca *et al.*, 2007; González-Güereca *et al.*, 2010; Pilau *et al.*, 2011; Leyva-López *et al.*, 2016). Diversas investigaciones apoyan el rol benéfico de fitoquímicos del orégano contra el cáncer, enfermedades coronarias, diabetes, presión arterial alta, inflamación, infecciones microbianas y úlceras virales y parasitarias (García-Pérez *et al.*, 2012; Rivero-Cruz *et al.*, 2011).

Las herramientas biotecnológicas relacionadas con la propagación clonal de este género han sido aplicadas con éxito en la especie *L. alba*. Gupta y colaboradores (2001), mencionan que obtuvieron la micropropagación de *L. alba* vía organogénesis directa con la aplicación de BA a una concentración de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ , con una respuesta de 6.4 brotes por explante. De igual forma, la respuesta en la micropropagación de *L. graveolens* fue de una producción de 6.1 brotes por explante a  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BA (Castellano-Hernández *et al.*, 2013). Otros investigadores mencionan una falta de respuesta organogénica en medio con reguladores en *L. dulcis*, además observaron un incremento en el crecimiento en un medio sin reguladores (Urrea *et al.*, 2009). La optimización en la producción de brotes requiere la experimentación con diferentes reguladores de crecimiento, que permitan una mejor respuesta morfogénica.

#### 4.- Procedimiento Experimental

**El experimento se llevará a cabo en diferentes etapas:**

##### **Protocolo para la germinación *in vitro***

Se colocan las semillas en inmersión en etanol al 70% por 1 minuto, se enjuagará con agua destilada estéril y posteriormente se colocarán en hipoclorito de sodio al 20% por 15 minutos, se continuará con enjuague por tres ocasiones en agua destilada estéril por un minuto en la campana de flujo laminar. Posteriormente se imbibirán en agua destilada estéril por 48h para después volver a realizar el protocolo de asepsia y se sembrarán en medio MS a mitad de la concentración, adicionado con  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de myo-inositol  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de tiamina-HCL,  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de piridoxina,  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de adenina,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa,  $8 \text{ g L}^{-1}$  de agar, se ajustará a un pH de 5.8 y se esterilizará a  $121^\circ \text{ C}$  durante 15 minutos. Se evaluará el porcentaje de germinación y el índice de velocidad de germinación (IVG).

##### **Protocolo de asepsia**

Para esta etapa se partirá de plántulas procedentes de campo. La semana previa a la etapa de establecimiento se tratará la plántula con fungicida (tectol 1 mg/l) en una sola aplicación.

Las plantas se lavarán con agua corriente y se colocarán en un recipiente conteniendo hipoclorito de sodio al 5% con 5 ml de jabón líquido durante una hora. Se procederá a enjuagar con agua corriente y se continuará con el protocolo de asepsia bajo la campana de flujo laminar, éste consistirá en enjuague con agua destilada estéril por tres ocasiones, se continuará con inmersión en alcohol al 70% por 1 minuto, se volverá a enjuagar en agua destilada estéril por 1 minuto y nuevamente se colocarán en hipoclorito de sodio al 15% por 15 min, se enjuagarán por tres ocasiones más con agua destilada estéril. Posteriormente se sembrarán en medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962)

Se utilizará como explante segmentos nodales, se sembrará un explante por frasco en medio MS a mitad de su concentración.

### Etapa de establecimiento

Una vez superada la etapa de asepsia se procederá a colocar el explante en medio MS suplementado con 0.1 g l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0.001 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0.001 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0.001 mg l<sup>-1</sup> de tiamina-HCl, 20 mg l<sup>-1</sup> de glicina más 80 mg l<sup>-1</sup> de adenina, 0-1 mg/l de BAP, 30 g/l de sacarosa, 4 g/l de phytigel a un pH de 5.8. Se colocarán en 20 ml de medio de cultivo en frascos tipo gerber.

Una vez solidificado el medio se trasvasarán cuatro explantes por frasco bajo la campana de flujo laminar. Se llevarán al cuarto de incubación a una temperatura de 25°C ± 2°C, con un fotoperíodo de 18 h luz durante cuatro semanas.

### Etapa de micropropagación

Para la micropropagación se utilizará el medio MS adicionada con 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina-HCL, 1 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCL, 40 mg l<sup>-1</sup> de adenina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, 8 g l<sup>-1</sup> de phytigel, se ajustó a un pH de 5.7 y se esterilizó a 121° C durante 15 minutos. La siembra se transferirá al cuarto de incubación a una temperatura de 25 ± 1° C, con 16 horas luz y 8 de oscuridad a 2500 lux. El medio se renovará cada cuatro semanas. Se utilizarán la combinación de los fitoreguladores: BAP, Kinetina y Thidiazurón a diferentes concentraciones (0.0, 1.0 y 2.0 mg l<sup>-1</sup>) y combinaciones con Prohexadiona de calcio (0.0-0.5 mg l<sup>-1</sup>). Para la generación de brotes se emplearán explantes provenientes de la etapa de establecimiento.

Los ANVA se realizarán con el paquete estadístico Infostat, 2008.

### Cronograma de Actividades para el 2018.

| Actividad por realizar                   | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Colecta de material vegetal              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Establecimiento de Cultivo aséptico      |   |   | x | x |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Micropropagación de <i>L. graveolens</i> |   |   |   |   | x | x | x | x | x |   |   |   |
| Análisis de resultados                   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | x | x |   |
| Entrega de informe                       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | x |

### Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

| Actividad por realizar       | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |
|------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Colecta de semillas en campo | x |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

|                            |  |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |  |
|----------------------------|--|---|---|---|---|---|--|--|--|--|--|--|--|
| Colecta de planta en campo |  | x | x |   |   |   |  |  |  |  |  |  |  |
| Compra de reactivos        |  | x | x | x | x | x |  |  |  |  |  |  |  |
|                            |  |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |  |

Duración total del proyecto

|               |      |                            |      |
|---------------|------|----------------------------|------|
| Año de Inicio | 2018 | Año estimado de conclusión | 2018 |
|---------------|------|----------------------------|------|

#### 5.-Productos Esperados

- Tesis de Licenciatura
- Artículo en revista indexada
- Asistencia a Congreso

#### 6.-Literatura Citada

Avila-Sosa, R., Gastélum-Franco, M.G., Camacho-Dávila, A., Torres- Muñoz, J.V., Nevárez-Moorillón, G.V . 2010. Extracts of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and anti- microbial activity. Food Bioprocess Tech 3:434-440.

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

CONAFOR. <http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/fichas-de-informacion-comercial-productos-forestales.pdf>

Cueto-Wong MC, Rivas-Morales C, Alanís-Guzmán MG, Oranday-Cárdenas, A, Amaya-Guerra, C.A., Núñez-González, A., Samaniego-Gaxiola, J.A., Cano-Ríos, P. . 2010. Antifungal properties of essential oil of Mexican orégano (*Lippia berlandieri*) against *Fusarium oxysporum* f. sp. Lycopersici. Rev. Mex. Micol. 31:29-35

García-Pérez, E., Fernando Francisco, C.Á., Gutiérrez-Urbe, J.A. and García-Lara, S. 2012. Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(2), pp.339-353.

González, M.C., Soto, M. Kite, G., Martínez, M.. 2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *Berlandieri* Schauer). *Rev. Fitotecnia Mex.* 30, 43-49

González-Güereca M. C., Soto-Hernández, M., Kite G., Martínez-Vázquez, M. .2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de Orégano Mexicano (*Lippia graveolens* HBK var *berlandieri* Schauer). *Rev Fitotec Mex.* 30:43-49.

González-Güereca M, Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M.. 2010. Isolation of (-)(2S)-5,6,7,3',5'-pentahydroxyflavanone-7-O-β- glucopyranoside, from *Lippia graveolens* H.B.K, var. *Berlandieri* Schauer, a new anti-inflammatory and cytotoxic flavones. *Nat. Prod. Res.* 24:1528-1536

Gupta ,S.K., Khanuja, S.P.S, Kumar, S. .2001. In vitro micropropagation of *Lippia alba*. *Curr Sci* 81:206-210.

Leyva-López, N., Nair, V., Bang, W.Y., Cisneros-Zevallos, L. Heredia, J.B. 2016. Protective role of terpenes and polyphenols from three species of Oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology* 187: 302-312. et al 2016

Lin, L. Z.; Mukhopadhyay, S.; Robbins, R. J., Harnly, J. M. 2007. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *J. Food Compos.* 20(5):361-369.

Murashige T, Skoog F .1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497

Rivero-Cruz, I., Duarte, G., Navarrete, A., Bye, R., Linares, E., Mata, R. 2011. Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. *J. Food Sci.* 76:C309-C317.

Pilau M.R, Hartz A.S., Weiblen R., Arenhart S., Cueto A.P., Lovato L.T. 2011. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. Braz. J. Microbiol. 42:1616-1624.

Ocampo-Velázquez RV, Malda-Barrera GX, Suárez-Ramos G. 2009. Reproductive biology of Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) in three exploitation conditions. Agrociencia 43:475-482

Rivero-Cruz, I., Duarte, G., Navarrete, A., Bye, R.; Linares, E., Mata, R. 2011. Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. J. Food Sci. 76:C309-C317.

Rodríguez, J., Ortuño, C., Benedito, J., Bon, J. 2013. Optimization of the antioxidant capacity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) extracts; management of the drying process. Ind. Crops. Prod. 46:258-263.

Urrea, A.I., Castrillon, P.A., Monsalve, Z. .2009. Propagación *in vitro* y desdiferenciación tisular en *Lippia dulcis*. Actual Biol. 31:21-29