



**Inducción a células madre en segmentos de hoja de *Origanum majorana L.* utilizando 3 concentraciones de citoquininas y auxinas**

Manjarrés Alomoto Marcela Anahí

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Jadán Guerrero, Mónica Beatriz, Ph.D.

23 de febrero de 2023

## Informe de originalidad

---

### NOMBRE DEL CURSO

Proyecto de Titulación SII OCT 22 - MAR 23

### NOMBRE DEL ALUMNO

MARCELA ANAHI MANJARRES ALOMOTO

### NOMBRE DEL ARCHIVO

MARCELA ANAHI MANJARRES ALOMOTO - Tesis

### SE HA CREADO EL INFORME

23 feb 2023

## Resumen

Fragmentos marcados	3	0,8 %
Fragmentos citados o entrecomillados	3	1 %

### Coincidencias de la Web

scielo.org.co	2	0,9 %
wikipedia.org	2	0,6 %
fao.org	1	0,3 %
scielo.org.mx	1	0,3 %

1 de 6 fragmentos

Fragmento del alumno **CITADO**

...el planeta y asegurar la prosperidad de generaciones futuras. **El desarrollo sostenible trata mejorar la calidad de vida humana sin rebasar la capacidad de carga de los ecosistemas que**

### Mejor coincidencia en la Web

Un importante insumo para la Cumbre de la Tierra fue el documento "Cuidar la Tierra" elaborado por la UICN, WWF Y PNUD, que define al **desarrollo sostenible** como "mejorar la calidad de vida humana sin...

EL DESARROLLO SOSTENIBLE <https://www.fao.org/3/X5600S/x5600s05.htm>

2 de 6 fragmentos

Fragmento del alumno **MARCADO**

**El cultivo de tejidos se puede definir como un conjunto de técnicas que permiten que un explante vegetal se cultive asépticamente en un medio artificial que tiene una composición química definida**

### Mejor coincidencia en la Web

En su acepción amplia, **el cultivo de tejidos vegetales se define como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explanto —o sea, una parte separada del vegetal,—**

Cultivo de tejidos vegetales - Wikipedia, la enciclopedia libre [https://es.wikipedia.org/wiki/Cultivo\\_de\\_tejidos\\_vegetales](https://es.wikipedia.org/wiki/Cultivo_de_tejidos_vegetales)

---

3 de 6 fragmentos

Fragmento del alumno MARCADO

**El 6-BAP es una citoquinina sintética de primera generación, se caracteriza por inducir el crecimiento y desarrollo de las plantas al estimular la división celular**

[Mejor coincidencia en la Web](#)

**La 6-Bencilaminopurina, bencil adenina, BAP o BA es una citoquinina sintética de primera generación que provoca respuestas de crecimiento y desarrollo de las plantas, estableciendo flores y...**

6-Bencilaminopurina - Wikipedia, la enciclopedia libre <https://es.wikipedia.org/wiki/6-Bencilaminopurina>

---

4 de 6 fragmentos

Fragmento del alumno MARCADO

**Son hormonas que tienen un punto de acción a nivel celular, donde intervienen en los procesos de división, elongación y diferenciación celular. Dentro de las auxinas más conocidas a nivel vegetal...**

[Mejor coincidencia en la Web](#)

Los principales puntos de acción se encuentran a nivel celular, donde tienen la capacidad de dirigir e intervenir en los procesos de división, elongación y diferenciación celular.

Principales reguladores hormonales y sus ... - SciELO Colombia [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702019000200109](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200109)

---

5 de 6 fragmentos

Fragmento del alumno CITADO

**Dentro de las auxinas más conocidas a nivel vegetal se encuentra el ácido 3-indol-acético (AIA) que es la principal auxina producida de manera natural, aunque también se conocen otro tipo de auxinas...**

[Mejor coincidencia en la Web](#)

**Dentro de las auxinas más conocidas a nivel vegetal se encuentra el ácido 3-indol-acético (AIA) que es la principal auxina producida de manera natural, aunque también se conocen otro tipo de auxinas...**

Principales reguladores hormonales y sus ... - SciELO Colombia [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702019000200109](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200109)

---

6 de 6 fragmentos

Fragmento del alumno CITADO

...por bacterias y hongos. Según Ramírez-Rojas et al. (2016), **las bacterias pueden habitar como saprofitos, epifitos, endófitos, simbiotes y patógenos de animales, humanos y plantas**

Mejor coincidencia en la Web

**Las bacterias** son organismos microscópicos cosmopolitas que pueden habitar como saprofitos, epifitos, endófitos, simbioses, parásitos y patógenos de animales, plantas y seres humanos.

Identificación molecular de bacterias asociadas a plantas ... [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092016000200173](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092016000200173)



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Biotecnología**

**Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular: “**Inducción de células madre en segmentos de hoja de *Origanum majorana* L. utilizando 3 concentraciones de citoquininas y auxinas**” fue realizado por la señorita **Manjarrés Alomoto, Marcela Anahí**; el misma que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente

**Sangolquí, 27 de febrero del 2023**



MONICA BEATRIZ  
JADAN GUERRERO

**Jadán Guerrero, Mónica Beatriz Ph.D.**

**C.I.: 1802278562**

## Responsabilidad de Autoría



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, Manjarrés Alomoto, Marcela Anahi con cédula de ciudadanía n° 1722765698, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Inducción a células madre en segmentos de hoja de *Origanum majorana* L., utilizando 3 concentraciones de citoquininas y auxinas** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 27 de febrero de 2023

Manjarrés Alomoto, Marcela Anahi

C.I.: 1722765698

## Autorización de Publicación



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

### Autorización de Publicación

Yo **Manjarrés Alomoto, Marcela Anahí** con cédula de ciudadanía n° 1722765698, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Inducción a células madre en segmentos de hoja de *Origanum majorana* L., utilizando 3 concentraciones de citoquininas y auxinas** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 27 de febrero de 2023

**Manjarrés Alomoto, Marcela Anahí**

C.I: 1722765698

## Dedicatoria

A mi madre, por todo su amor y cariño que no permitieron que me rinda en ningún momento

A mi padre, quien supo ser mi apoyo siempre y por todas las palabras de aliento que me brinda  
cada día

A mi hermano, porque sé que, a pesar de todo, puedo contar con él

A mi familia, que siempre estuvo presente en cada etapa, dándome su apoyo y amor

A mis amigos, quienes supieron hacerme reír aún en los momentos malos

A Emilio, por todo su apoyo, amor y paciencia

A Nala

*Marcela Anahí Manjarrés Alomoto*

## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradezco a Dios por darme la fuerza para continuar cada día, y por todas las oportunidades que me fueron brindadas.

Agradezco a mis padres quienes marcaron mi camino con luz para poder ser la persona que soy el día de hoy, por todo el amor que me han brindado día a día, por alentarme siempre a seguir adelante y alcanzar mis metas, sin ellos, esto no hubiera sido posible.

Agradezco a mi familia por siempre estar presentes por su apoyo y por siempre alentarme a seguir mis sueños.

A Emilio, quien supo acompañarme y apoyarme durante este proceso, por todo el amor que me brinda día a día, que me alienta a superarme y ser mejor. Gracias por siempre impulsarme a cumplir mis sueños y metas, por ser mi persona.

A mis amigos, Dani, Mika, Nash y Mario, por ser incondicionales, por hacer más bonita toda esta experiencia, por estar en las risas y en los llantos. Gracias por ser siempre un lugar seguro y por cada momento que pudimos compartir.

A la Mgtr. Andrea Ortega, por su ayuda y guía en la ejecución de mi proyecto de titulación. Y, sobre todo, por su amistad, gracias por el apoyo, incluso en los momentos difíciles, por las risas, por ser una gran persona y acogerme con mucho cariño. Gracias a Ponko, Mela y los tesisistas del Laboratorio de Cultivo de Tejidos por su amistad y todos los momentos compartidos

A mi tutora Mónica Jadán Ph.D., por abrirme las puertas del laboratorio y compartir sus conocimientos conmigo, por formarme como profesional y como persona. Gracias por las oportunidades brindadas.

*Marcela Anahí Manjarrés Alomoto*

## Índice

Resultado del Análisis de Google Assignments.....	2
Responsabilidad de Autoría.....	6
Autorización de Publicación.....	7
Dedicatoria .....	8
Resumen.....	16
Abstract.....	17
Capítulo I: Introducción.....	18
Planteamiento del problema .....	18
Justificación del problema.....	18
Objetivos.....	21
Objetivo General .....	21
Objetivos específicos.....	21
Hipótesis .....	21
Capítulo II: Marco Teórico .....	22
Descripción de la especie .....	22
Descripción botánica .....	22
Taxonomía .....	22
Distribución Geográfica .....	23
Uso y Propiedades .....	23
Establecimiento <i>in vitro</i> .....	24

Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales .....	24
Generalidades.....	24
Medios de Cultivo .....	25
Callogénesis .....	25
Reguladores de Crecimiento.....	26
<i>Citoquininas</i> .....	26
6-Bencilaminopurina .....	26
<i>Auxinas</i> .....	27
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.....	27
Capítulo III: Metodología.....	28
Fase de Campo.....	28
Fase de Laboratorio .....	28
Selección del explante.....	28
Establecimiento <i>in vitro</i> de hojas de <i>Origanum majorana</i> L. ....	29
Etapa de desinfección de hojas de <i>O. majorana</i> L. ....	29
Etapa de evaluación del medio de cultivo .....	31
Etapa de inducción a células madre en hojas de <i>O. majorana</i> L. ....	32
Análisis de Datos.....	32
Capítulo IV: Resultados .....	34
Desinfección de hojas de <i>O. majorana</i> L.....	34
Evaluación de medio de cultivo .....	38

Inducción a células madre en hojas de <i>O. majorana</i> L. ....	41
Capítulo V: Discusión.....	47
Desinfección de las hojas de <i>Origanum majorana</i> L.....	47
Evaluación del medio de cultivo .....	48
Inducción a células madre .....	49
Capítulo VI: Conclusiones .....	51
Capítulo VII: Recomendaciones .....	52
Bibliografía .....	53

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Taxonomía de <i>Origanum majorana</i> L</i> .....	23
<b>Tabla 2</b> <i>Protocolo de desinfección para hojas de <i>Origanum majorana</i> L</i> .....	29
<b>Tabla 3</b> <i>Protocolo de optimización de medio de cultivo para hojas de <i>O. majorana</i> L</i> .....	31
<b>Tabla 4</b> <i>Concentraciones de las fitohormonas utilizadas en hojas de <i>Origanum majorana</i> L. para la inducción de células madre</i> .....	32
<b>Tabla 5</b> <i>Porcentajes de contaminación obtenidos en los distintos tratamientos de desinfección de hojas de <i>O. majorana</i> L. a los 21 días</i>	34
<b>Tabla 6</b> <i>Test: Duncan Alfa=0,05 de la etapa de desinfección de hojas de <i>Origanum majorana</i> L</i> .....	37
<b>Tabla 7</b> <i>Valores de viabilidad y necrosamiento obtenidos en hojas de <i>Origanum majorana</i> L. después de los 21 días de cultivo</i> .....	38
<b>Tabla 8</b> <i>Test: Duncan Alfa=0,05 de la etapa de evaluación de medio de cultivo para la inducción de células madre en hojas de <i>Origanum majorana</i> L</i> .....	41
<b>Tabla 9</b> <i>Datos de porcentaje de inducción a células madre en hojas de <i>Origanum majorana</i> L. obtenidos en los distintos tratamientos con 2,4-D y 6-BAP</i> .....	43
<b>Tabla 10</b> <i>Test: Duncan Alfa=0,05 de la etapa de inducción de células madre a partir de hojas de <i>Origanum majorana</i> L</i> .....	46

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> <i>Planta de Origanum majorana L</i> .....	22
<b>Figura 2</b> <i>Hojas de Origanum majorana L. de aproximadamente 1 cm de largo</i> .....	29
<b>Figura 3</b> <i>Protocolo de desinfección de las hojas de Origanum majorana L</i> .....	30
<b>Figura 4</b> <i>Representación gráfica de los porcentajes de contaminación obtenidos en los distintos tratamientos de desinfección de hojas de O.majorana L</i> .....	34
<b>Figura 5</b> <i>Contaminación por hongos en hojas de O. majorana L. a los 14 días de cultivo</i>	35
<b>Figura 6</b> <i>Contaminación por bacteria en hojas de Origanum majorana L. a los 14 días de cultivo</i> .....	35
<b>Figura 7</b> <i>Datos obtenidos de contaminación por hongos y bacterias después de cada tratamiento de desinfección en hojas de Origanum majorana L</i> .....	36
<b>Figura 8</b> <i>Pruebas de normalidad de los datos obtenidos en la desinfección de hojas de Origanum majorana L</i> .....	37
<b>Figura 9</b> <i>Gráfica de los valores de viabilidad y necrosamiento obtenidos a los 21 días de cultivo</i> .....	38
<b>Figura 10</b> <i>Necrosamiento en hojas de Origanum majorana L. observados a los 21 días de cultivo</i> .....	39
<b>Figura 11</b> <i>Pruebas de normalidad de los datos de necrosamiento en hojas de Origanum majorana L. obtenidos en la etapa de evaluación de medio de cultivo</i> .....	40
<b>Figura 12</b> <i>Proceso de inducción a células madre in vitro a partir de hojas de O. majorana en el transcurso de 28 días</i> .....	42
<b>Figura 13</b> <i>Variaciones de callo que se presentaron en los tratamientos de inducción a células madre en hojas de Origanum majorana L</i> .....	43

**Figura 14** Gráfica de los datos obtenidos a los 28 días en el proceso de inducción a células madre en hojas de *Origanum majorna* L. aplicando distintos tratamientos con 2,4-D y 6-BAP

.....44

**Figura 15** Pruebas de normalidad de los datos obtenidos en la inducción de células madre en hojas de *Origanum majorna* L. ....45

## Resumen

*Origanum majorana* L. es una planta medicinal caracterizada por tener un sabor y olor dulce, gracias a estas cualidades es ampliamente utilizada en la gastronomía y la industria alimentaria. A la mejorana también se le han atribuido varias propiedades medicinales, es utilizada en la industria farmacéutica como antioxidante, antiespasmódico, antiviral y antibacterial. A pesar de que se han descrito varias investigaciones de cultivo *in vitro* que involucran a la mejorana, no se han reportado estudios en el Ecuador. Los objetivos de este trabajo fueron establecer un protocolo de desinfección para hojas de mejorana, determinar la mejor concentración de medio de cultivo con sales minerales Murashige & Skoog (MS) y sacarosa comercial y, determinar la mejor concentración de las fitohormonas, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6 Bencilaminopurina (6-BAP) para la inducción a células madre. El mejor protocolo de desinfección consistió en detergente al 2%, etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 3%, el cual permitió obtener un porcentaje de contaminación de 2%. En la siguiente etapa, se demostró que los explantes presentaron una viabilidad de 88,3% en el medio de cultivo a concentración completa de sales minerales MS y 30 g/L de sacarosa comercial. Así mismo, el tratamiento con 2 mg/L de 2,4-D y 0,23 mg/L de 6-BAP obtuvo un porcentaje de inducción a callo de 33% en las hojas de *Origanum majorana* L.

*Palabras clave:* *Origanum majorana* L., mejorana, células madre, Murashige & Skoog (MS)

### Abstract

*Origanum majorana* L. is a medicinal plant characterized by having a sweet taste and smell, thanks to these qualities it is widely used in gastronomy and the food industry. Marjoram has also been attributed several medicinal properties, it is used in the pharmaceutical industry as an antioxidant, antispasmodic, antiviral and antibacterial. Although several *in vitro* culture studies involving marjoram have been described, no studies have been reported in Ecuador. The objectives of this work were to establish a disinfection protocol for marjoram leaves, to determine the best concentration of culture medium with Murashige & Skoog (MS) mineral salts and commercial sucrose, and to determine the best concentration of the phytohormones, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 6-Benzylaminopurine (6-BAP) for stem cell induction. The best disinfection protocol consisted of 2% detergent, 70% ethanol and 3% sodium hypochlorite, which resulted in a contamination rate of 2%. In the next stage, it was demonstrated that the explants presented a viability of 88.3% in the culture medium at full concentration of MS mineral salts and 30 g/L of commercial sucrose. Likewise, the treatment with 2 mg/L of 2,4-D and 0.23 mg/L of 6-BAP obtained a callus induction percentage of 33% in *Origanum majorana* L. leaves.

*Keywords:* *Origanum majorana* L., marjoram, stem cell induction, Murashige & Skoog

(MS)

## Capítulo I: Introducción

### Planteamiento del problema

*Origanum majorana* Linneo., es una especie ampliamente distribuida en el Ecuador que contiene características medicinales, y es ampliamente utilizada en la gastronomía como especia y condimento. Dentro de sus componentes químicos se encuentran aceites esenciales como; terpineol, careno y, canfeno conocidos por sus efectos antibacterianos; y componentes como polifenoles, flavonoides, esteroles, triterpenos, taninos y saponinas, muchos de ellos brindan efectos antioxidantes (Wang *et al.*, 2021). Dentro del país, esta especie suele ser utilizada con fines medicinales, por lo que podría ser de gran beneficio tanto para la población, como para la economía del Ecuador (Zhiminaicela-Cabrera *et al.*, 2020).

El cultivo tradicional de mejorana requiere de un gran cuidado, recursos y tiempo. Para tener una buena producción, se necesita de un suelo previamente tratado para controlar las malezas y la sanidad de la planta, ya que esta puede ser afectada por varias plagas como: pulgones, ácaros, hongos, babosas, cochinillas, etc. Estas afectarán el crecimiento de la planta ocasionando pérdidas en la producción. (Estrada, 2021). Es por esto que se busca alternativas que permitan el estudio a gran escala de la planta y la extracción de los compuestos activos *in vitro*.

### Justificación del problema

El Ecuador es conocido como uno de los países más megadiversos del mundo, posee una gran cantidad de especies en cuanto a flora y fauna, esta diversidad se debe a la posición del país que permite tener un clima adecuado para el desarrollo de algunas especies, así como también la presencia de los Andes y las distintas corrientes marinas, las cuales ayudan a crear ambientes para la diversidad (Mena, 2010).

La ONU ha planteado un conjunto de objetivos globales, llamados Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), con el fin de erradicar la pobreza, proteger el planeta y asegurar

la prosperidad de generaciones futuras. El desarrollo sostenible trata de mejorar la calidad de vida humana sin la necesidad de sobre explotar los ecosistemas que lo sustentan (Madroñero-Palacios & Guzmán-Hernández, 2018). Es por esto que se buscan alternativas que permitan mantener la biodiversidad y evitar la sobreexplotación de los productos primarios.

El cultivo *in vitro* posibilita la producción de plantas en ambientes controlados, permitiendo un mejor rendimiento en la producción, evitando el gasto innecesario de materia prima, es decir, evita que se exploten en gran medida los recursos naturales. Además, permite el cultivo de especies no domesticadas, todo esto con el fin de obtener químicos o sustancias bioactivas de interés comercial. Este conjunto de técnicas ofrece varios beneficios para la elaboración de productos relacionados con material vegetal, por lo cual, es un campo de estudio que ha despertado gran interés (Valdés *et al.*, 2012)

*Origanum majorana* L., posee grandes propiedades farmacológicas que incluyen antioxidantes, hepatoprotectoras, cardioprotectoras, antibacterianas, antifúngicas, y antitumorales. Esto se debe a la variedad de metabolitos secundarios que se encuentran presentes en esta planta, en su mayoría son hidrocarburos monoterpénicos, monoterpenos oxigenados y compuestos fenólicos (Bina & Rahimi, 2017). Todo esto la convierte en una planta de especial interés para investigación.

El cultivo *in vitro* de *Origanum majorana* L ha sido investigado por varios autores, obteniendo resultados exitosos. Hussein *et al.*, (2014) logró la inducción de callo a partir de semillas de esta especie en medio de cultivo con sales minerales de Murashige & Skoog (MS) suplementado con distintos reguladores de crecimiento, dentro de ellos ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-Bencilaminopurina (6-BAP). Tehevathi & Padma, (2020) cultivaron de forma *in vitro* la mejorana utilizando medio de cultivo con sales minerales MS y medio de cultivo Phillips y Collins (L2), suplementados con 6-BAP, Kinetina, 2,4D, ácido indol-3-acético (AIA), y ácido indol-3-butírico (IBA), obteniendo callos como resultado en ambos

medios de cultivo con distintas concentraciones de auxinas, además, en algunos medios de cultivo combinaron varias auxinas y citoquininas para observar la variación en los resultados.

Si bien se han realizado investigaciones en mejorana, ninguna se ha desarrollado dentro del país, además, son casi nulas las investigaciones realizadas en las hojas de *Origanum majorana* L., a pesar de que estas, junto con los tallos, son las que poseen gran cantidad de metabolitos secundarios, por lo que usualmente se opta por tener aceites esenciales de estas partes de la planta. (Mamani & Gómez, 2019)

Dentro de la biotecnología el cultivo *in vitro* es importante ya que puede facilitar proyectos, reduciendo el tiempo de espera e incluso brindando un mejor control en el proceso de crecimiento de las plantas, si hablamos de la biotecnología vegetal, dentro de los últimos años ha despertado un gran interés debido a la necesidad actual de recursos vegetales para usos básicos como la alimentación y la salud (Levitus *et al.*, 2010).

## Objetivos

### **Objetivo General**

Inducir células madre en segmentos de hoja de *Origanum majorana* L, utilizando 3 concentraciones de citoquininas y auxinas.

### **Objetivos específicos**

- Estandarizar un protocolo de desinfección en hojas de *Origanum majorana* L. para la obtención de células madre y su conservación en el banco de germoplasma de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, utilizando cultivo *in vitro*, en la provincia de Pichincha.
- Optimizar un medio de cultivo para la inducción a células madre de *Origanum majorana* L. y su conservación en el banco de germoplasma de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE en la provincia de Pichincha
- Inducir a la formación de células madre de *Origanum majorana* L. utilizando 3 concentraciones de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) en la provincia de Pichincha

## Hipótesis

Las citoquininas y auxinas inducen a la formación de células madre en segmentos de hojas de *Origanum majorana* L.

## Capítulo II: Marco Teórico

### Descripción de la especie

#### ***Descripción botánica***

El género *Origanum* comprende plantas que se caracterizan por poseer una gran cantidad de aceites esenciales, además son parte de la familia Lamiaceae, a la cual pertenecen varias plantas aromáticas como la menta y el romero (Guevara, 2018).

La mejorana como la gran parte de las Lamiaceas es una planta tipo arbusto, con tallos erectos, casi leñosos, este tallo se ramifica formando una mata de entre 30 a 50 cm. Sus hojas son opuestas, ovales y pecioladas, además, presenta una inflorescencia que consta de pequeñas flores agrupadas en el eje principal (AGEXPORT, 2020).

#### **Figura 1**

*Planta de Origanum majorana L.*



#### ***Taxonomía***

*Origanum* es uno de los 200 géneros de la familia Lamiaceae de 3500 especies, la mayoría de ellas son aromáticas y crecen de forma silvestre en la cuenca mediterránea. Este

género consta con más de 44 especies, 6 subespecies, 3 variedades botánicas y 18 híbridos naturales (Goel & Vasudeva, 2015).

**Tabla 1**

*Taxonomía de Origanum majorana L.*

<b>Taxonomía</b>	
<b>Reino</b>	Plantas
<b>División</b>	Tracheophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Lamiales
<b>Familia</b>	Lamiaceae
<b>Género</b>	<i>Origanum</i>
<b>Especie</b>	<i>Origanum majorana L.</i>

### ***Distribución Geográfica***

La mejorana se encuentra distribuida alrededor de los seis continentes, sin embargo, se le considera nativa de Eurasia por lo que es aquí donde se encuentra una mayor población y variedad de la especie. Esta planta al igual que las de su género son ampliamente cultivadas en el Neotrópico, sobre todo en países como; Ecuador, Colombia, Perú, Bolivia, Venezuela y Brasil (GBIF, 2021).

### ***Uso y Propiedades***

La mejorana es caracterizada por tener un olor y sabor dulce con un toque de picante. Esta especie tiene una composición química rica en timol, ácidos fenólicos, flavonoides, hidroquinonas y otras sustancias. Además, se ha demostrado que la mejorana tiene

capacidades antioxidantes, antivirales, posee efectos paliativos, antiespasmódicos, y una capacidad de sedar el sistema nervioso (Fonnegra & Jiménez, 2007).

### ***Establecimiento in vitro***

Se han realizado varios estudios en cuanto a la propagación del género *Origanum*, dentro de las especies que más se propagan se encuentra *Origanum vulgare*, *Origanum syriacum* y *Origanum acutidens*. Camacho *et al.*, (2018) logró el crecimiento *in vitro* de *Origanum vulgare*, más conocida como orégano, que es una de las especies más investigadas debido a su uso doméstico y medicinal, esto lo realizó utilizando semillas de la planta proporcionadas por SENA y utilizando distintas concentraciones de auxinas y citoquininas.

En cuanto a la mejorana, varios autores han logrado su cultivo *in vitro*, proponiendo varios protocolos de desinfección y de micropropagación utilizando las semillas de la especie o algunos segmentos nodales. Para el proceso de crecimiento dentro de estas investigaciones han utilizado distintas fitohormonas como: 2,4D, BAP y Kinetina

### **Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales**

#### ***Generalidades***

Uno de los pioneros en cuanto al cultivo *in vitro* fue el botánico Haberlandt, el cual en 1898 en la Universidad de Graz en Austria inició los cultivos de células a partir del mesófilo de *Tradescantia*, *Ornithogalum* y *Erithromium*, a pesar de que sus experimentos fueron atribuidos como fallidos en 1902 lanzó la hipótesis de la totipotencia celular (Perea, 2009).

El cultivo de tejidos se puede definir como un conjunto de técnicas que permiten que un explante vegetal sea cultivado de forma aséptica en un medio de cultivo que tiene una composición química definida. Si bien, esta definición deja muchas puertas abiertas, es una de las más aceptadas (Levitus *et al.*, 2010).

### **Medios de Cultivo**

Los medios de cultivo deben componerse básicamente de: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares y gelificantes. Existen varios medios de cultivo comerciales que contienen los compuestos básicos, y pueden ser modificados de acuerdo a las necesidades que requiera la planta, es por esto que constantemente se están desarrollando nuevas fórmulas según la especie que se quiere introducir (Perea, 2009).

El medio de cultivo más utilizado es el de Murashige y Skoog (1962) (MS) que tiene una composición de amonio:nitrato 1:2, este fue inventado por los científicos Toshio Murashige y Folke Skoog en 1962 durante investigaciones con tabaco (Murashige y Skoog, 1962). El medio de cultivo con sales minerales MS al ser tan popular, es ampliamente comercializado como polvo para poder disolverlo en agua e incluir la cantidad de fuente de carbono y hormonas de crecimiento que se requieran (Morales-Rubio *et al.*, 2016).

Existen otros medios de cultivo que son muy comunes, como: El de Knudson, Gamborg, Fossard, etc. Dentro de esta investigación el medio de cultivo utilizado será el de Murashige y Skoog (MS) (Perea, 2009).

### **Callogénesis**

El crecimiento desorganizado, callogénesis o la inducción a células madre es una de las técnicas de cultivo de células vegetales más comunes. Este tipo de crecimiento rara vez se encuentra en la naturaleza, pero, ocurre con mucha frecuencia en el establecimiento *in vitro*, los agregados celulares que se forman en este sistema, carecen de una estructura reconocible. Los cultivos de callos permiten el mantenimiento a largo plazo de las líneas de células vegetales y proporcionan al investigador una fuente nueva de material vegetal sin necesidad de seguir explotando la materia prima. (Moscatiello *et al.*, 2013)

## **Reguladores de Crecimiento**

Un fitorregulador es una sustancia producida por la planta de forma interna en bajas concentraciones, su efecto se enfoca a nivel celular, modificando los patrones de crecimiento de la planta. Pueden ser sintetizados de forma química o a través de otros organismos, y siempre se debe tomar en cuenta la cantidad y la forma de aplicación para cada una de estas hormonas (Cortés *et al.*, 2019)

Hasta el momento se han podido identificar nueve grupos de hormonas vegetales y estos son: auxinas, giberelinas (GA), citoquininas (CK), brasinosteroides (BR), estrigolactonas (SL), etileno, ácido abscísico (ABA), jasmonatos (JA) y ácido salicílico (SA) (Fichet, 2017)

Para esta investigación se utilizará auxinas y citoquininas (2,4-D y 6-BAP), para inducir callo en segmentos de hoja de *Origanum majorana* L.

## **Citoquininas**

Las citoquininas son un grupo de hormonas vegetales que regulan la división celular, la fotosíntesis, la senescencia y el desarrollo de cloroplastos. Estas hormonas no han sido muy estudiadas (Criado, *et al.*, 2010).

Existen dos tipos de citoquininas, las de origen natural y las de origen sintético, ambas tienen una actividad biológica similar, conservan su base de adenina, sin embargo, las sintéticas son más potentes que las endógenas. Las principales formas conjugadas son: Nucleósidos, nucleótidos, glicósidos, alanilderivados, metiltioderivados (Gordillo, 2019).

## **6-Bencilaminopurina.**

El 6-BAP se caracteriza por inducir el crecimiento y desarrollo de las plantas al estimular la división celular, se le considera una citoquinina sintética de primera generación. Su presentación es como un polvo soluble en etanol y ácido. Este producto también es utilizado

junto con el ácido giberélico para mantener las hojas frescas y mejorar la tanto la forma, como el sabor de las frutas (Castillo-Pérez *et al.*, 2019).

### **Auxinas**

Son hormonas que tienen un punto de acción a nivel celular, donde intervienen en los procesos de división, elongación y diferenciación celular. El ácido 3-indol-acético (AIA) es una de las principales auxinas producidas de manera natural, sin embargo, también se conocen otro tipo de auxinas que son producidas de manera sintética como el ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D), el ácido indol-butírico (IBA), y el ácido  $\alpha$ -naftalenacético (NAA) (Alcántara *et al.*, 2019).

### **Ácido 2,4-diclorofenoxiacético**

El 2,4-D es un componente activo con fórmula  $C_8H_6Cl_2O_3$ . Es utilizado como herbicida contra malezas de hoja ancha en los cultivos de cereales, en pastos y prados. También se utiliza en cantidades altas para eliminar malezas, y en cantidades muy bajas como reguladora del crecimiento (Organización Mundial de la Salud, 1993).

### Capítulo III: Metodología

#### Fase de Campo

Las plantas de mejorana (*Origanum majorana* L.) fueron obtenidas en la zona de Nayón ubicada al Nororiente de la ciudad de Quito, 90° 90' 00" S; 78° 26' 00" O, posteriormente fueron trasladadas al Valle de los Chillos, en donde se les realizó un tratamiento fitosanitario. Las hojas se seccionaron junto con el tallo y se colocaron en un recipiente con papel toalla humedecido para conservar la muestra hasta ser transportadas al Laboratorio de Cultivos de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

#### Fase de Laboratorio

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, localizada en Sangolquí, Cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, 0° 18,81 S; 78° 26,64 O.

#### ***Selección del explante***

Para la formación de callo se requiere que el explante fisiológicamente sea joven, ya que estos tejidos tienen mayor capacidad para desdiferenciarse. Se ha observado que la edad tanto de la planta donante como del explante es un factor importante, debido a que los tejidos más jóvenes suelen ser los más exitosos dentro del cultivo *in vitro* (Ríos, 2009).

Dentro del laboratorio se seleccionaron hojas jóvenes de *Origanum majorana* L., de aproximadamente 9 a 15 días desde su brotación, se observó que no presenten lastimaduras o contaminación visible para su introducción.

**Figura 2**

*Hojas de Origanum majorana L. de aproximadamente 1 cm de largo*

***Establecimiento in vitro de hojas de Origanum majorana L.***

**Etapas de desinfección de hojas de *O. majorana L.*** El objetivo de esta etapa es lograr obtener explantes libres de contaminación, para lo cual, inicialmente éstos fueron lavados con agua corriente por 5 segundos, a continuación, se colocó una solución de detergente al 2% más 5 gotas de Tween 20, por 5 minutos, se agitó de forma constante y posteriormente se realizó el enjuague con agua destilada hasta eliminar el detergente completamente. Como siguiente paso se colocó alcohol al 70% durante 1 minuto, se mantuvo en agitación constante y se lavó con agua destilada. Finalmente, se colocó hipoclorito de sodio, con 5 gotas de Tween 20, de acuerdo a los tratamientos que se indican en la Tabla 2. Dentro de cámara de flujo laminar de marca ESCO (SHC 4A2), previamente desinfectada con etanol al 70%, y esterilizada con radiación ultravioleta, se lavó los explantes con agua estéril tres veces.

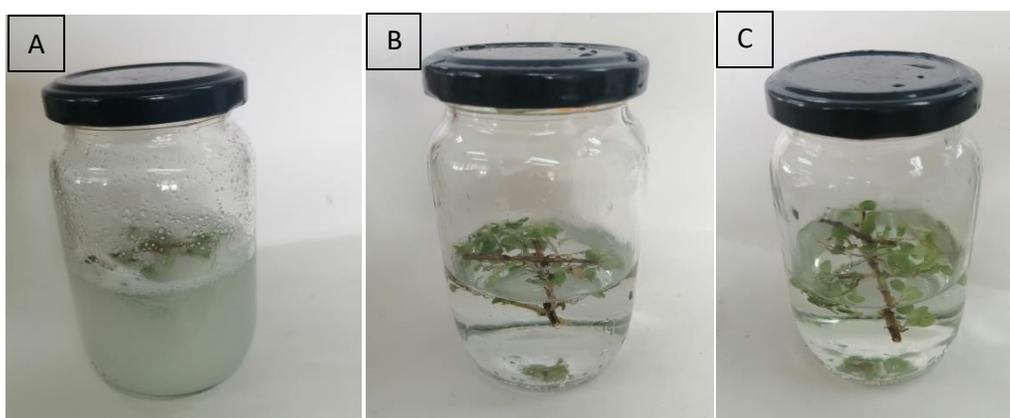
**Tabla 2**

*Protocolo de desinfección para hojas de Origanum majorana L.*

Tratamiento	Concentración de hipoclorito de sodio (%)	Tiempo (min)
	v/v)	
T1	1	
T2	2	5
T3	3	

**Figura 3**

*Protocolo de desinfección de las hojas de Origanum majorana L.*



Nota. Hojas de *Origanum majorana* L. sumergidas en: A) Solución de detergente 2%, B) Etanol al 70% y C) Solución de hipoclorito de sodio al 3%

Los explantes de *Origanum majorana* L., se cultivaron en medio de cultivo MS, suplementado con 30 g/l de sacarosa comercial y 2.2 g/l de Phytigel; el pH del medio de cultivo fue ajustado en un rango de 5,7-5,8 y fue sometido a un proceso de autoclavado durante 30 minutos.

Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento, cada repetición constaba de 10 frascos de vidrio con capacidad de 250 mL, donde se adicionó 30 mL de medio de cultivo semisólido MS y cuatro explantes. Se tomó como unidad experimental cada explante sembrado.

Una vez sembrados los explantes fueron colocados en la sala de incubación a una temperatura de  $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , con luz natural indirecta. Se evaluó la contaminación de los explantes mediante observación a los 7 y 14 días después del cultivo.

**Etapas de evaluación del medio de cultivo.** El objetivo de esta etapa fue determinar la concentración de medio de cultivo semisólido MS para que los explantes se desarrollen de mejor manera, para ello, se analizó el necrosamiento de los mismos en el medio de cultivo MS  $\frac{1}{2}$  y MS completo, suplementados con 15 g/l y 30 g/l de sacarosa comercial respectivamente. Fueron llevados a un pH entre 5,7-5,8 y se utilizó una concentración de 2,2 g/l de Phytigel. Se realizó de igual forma tres repeticiones de 10 frascos de vidrio. Los explantes sembrados fueron colocados en la sala de incubación.

**Tabla 3**

*Protocolo de optimización de medio de cultivo para hojas de O. majorana L.*

Tratamiento	Concentración de Sacarosa Comercial (g/l)
MS	30
MS $\frac{1}{2}$	15

**Etapas de inducción a células madre en hojas de *O. majorana* L.** El objetivo de esta etapa fue determinar la concentración de óptima de 2,4-D y 6-BAP para la inducción a células madre. Inicialmente, en una cámara de flujo laminar, se realizó la disección de las hojas de mejorana, en segmentos de, 0,5 a 1 cm de largo, para lo cual se utilizó una pinza y bisturí estériles. Los explantes fueron sembrados en frascos de vidrio con 30 mL del mejor medio de cultivo determinado en el acápite anterior, con 2,2 g/l de Phytigel como agente gelificante, el pH fue mantenido en un rango de 5,7-5,8, y suplementado con tres concentraciones de 2,4-D y 6-BAP, como se muestra en la Tabla 4. Los explantes sembrados fueron colocados en incubación y fueron evaluados a los 14, 21, 28 y 35 días de cultivados.

**Tabla 4**

*Concentraciones de las fitohormonas utilizadas en hojas de *Origanum majorana* L. para la inducción de células madre*

Tratamiento	Reguladores de crecimiento	
	2,4-D (mg/L)	6-BAP (mg/L)
<b>T0</b>	0	0
<b>T1</b>	1	0,12
<b>T2</b>	2	0,23
<b>T3</b>	3	0,35

### **Análisis de Datos**

Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA). Para realizar la evaluación estadística de los datos obtenidos, se realizó un histograma y un Q-Q Plot para determinar si los datos seguían una tendencia normal. Una vez que se corroboró la tendencia de los valores obtenidos, se aplicaron pruebas paramétricas o no paramétricas conforme sea el

caso. Las diferencias significativas entre las medianas se evaluaron mediante el Test de Duncan, utilizando el software estadístico InfoStat (versión 2020).

## Capítulo IV: Resultados

### Desinfección de hojas de *O. majorana* L.

Los resultados de porcentaje de contaminación con respecto a cada tratamiento se presentan en la Tabla 5. Los explantes no presentaron oxidación ni necrosamiento.

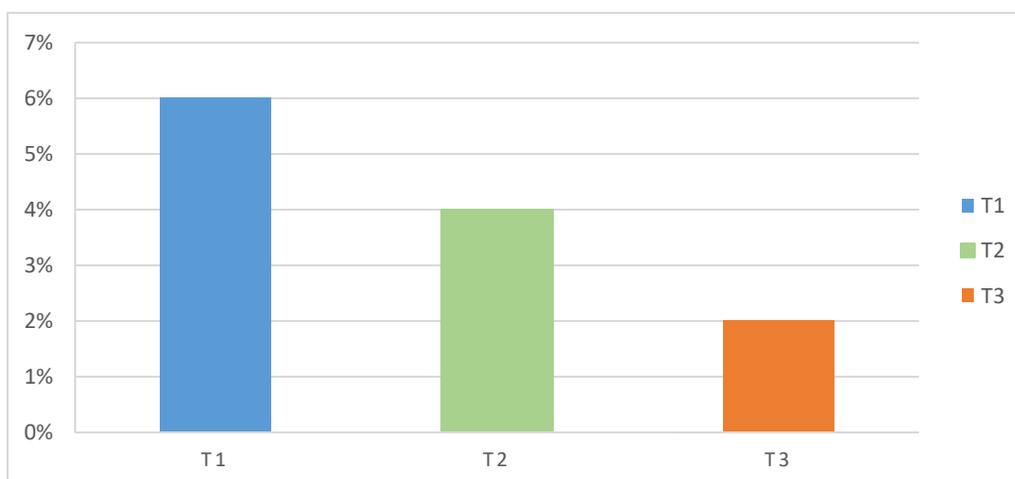
**Tabla 5**

*Porcentajes de contaminación obtenidos en los distintos tratamientos de desinfección de hojas de *O. majorana* L. a los 21 días.*

Tratamiento	Contaminación (%)
T1	6
T2	4
T3	2

**Figura 4**

*Representación gráfica de los porcentajes de contaminación obtenidos en los distintos tratamientos de desinfección de hojas de *O. majorana* L.*

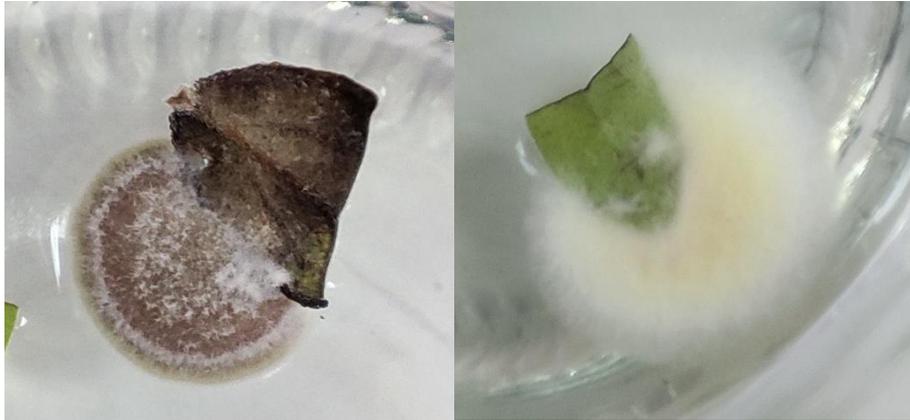


Se presentó contaminación tanto de hongos como de bacterias como se puede observar en la Figura 5 y Figura 6. El porcentaje de contaminación por hongos y bacterias en

cada tratamiento se presenta en la Figura 7, también se puede visualizar el porcentaje de explantes viables.

### Figura 5

*Contaminación por hongos en hojas de O. majorana L. a los 14 días de cultivo*



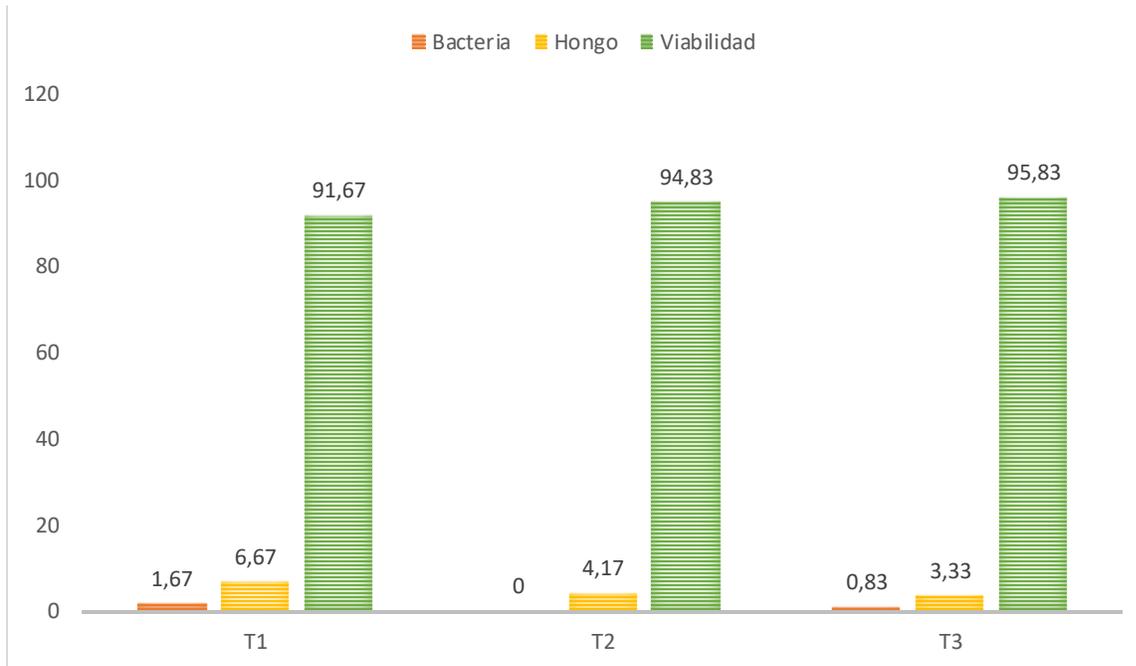
### Figura 6

*Contaminación por bacteria en hojas de Origanum majorana L. a los 14 días de cultivo*



**Figura 7**

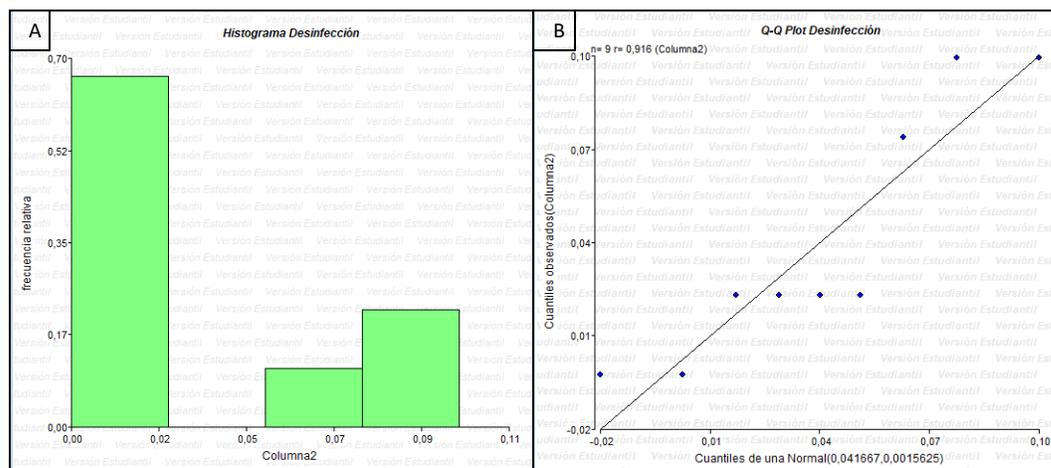
*Datos obtenidos de contaminación por hongos y bacterias después de cada tratamiento de desinfección en hojas de *Origanum majorana* L.*



En la Figura 8 se puede visualizar las pruebas de normalidad que se realizaron para los datos obtenidos, en donde se verifica que los valores no siguen una tendencia normal, por lo tanto, se aplicaron pruebas no paramétricas para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Figura 8

Pruebas de normalidad de los datos obtenidos en la desinfección de hojas de *Origanum majorana* L.



Nota. Se muestran las pruebas de normalidad A) Histograma, B) Q-Q plot, los cuales muestran que no existe una tendencia normal en los datos

Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis donde el valor-p (0,3500) es mayor al nivel de significancia (0,05), por lo que se concluye que los tratamientos no tienen una diferencia estadística significativa. Se realizó el Test de Duncan para poder identificar el mejor tratamiento (Tabla 6), aquí se pudo observar que el tratamiento T3 tiene una media de contaminación más baja, se determinó que este es el mejor tratamiento.

Tabla 6

Test: Duncan Alfa=0,05 de la etapa de desinfección de hojas de *Origanum majorana* L.

Tratamientos	n	Medias	E.E.	Agrupación
T1	3	0,02	0,02	A
T2	3	0,04	0,02	A
T3	3	0,06	0,02	A

## Evaluación de medio de cultivo

Los datos obtenidos en esta etapa se observan en la Tabla 7, donde se puede apreciar que los valores de necrosamiento y de viabilidad para cada uno de los tratamientos. En la Figura 10 se puede evidenciar el necrosamiento de las hojas.

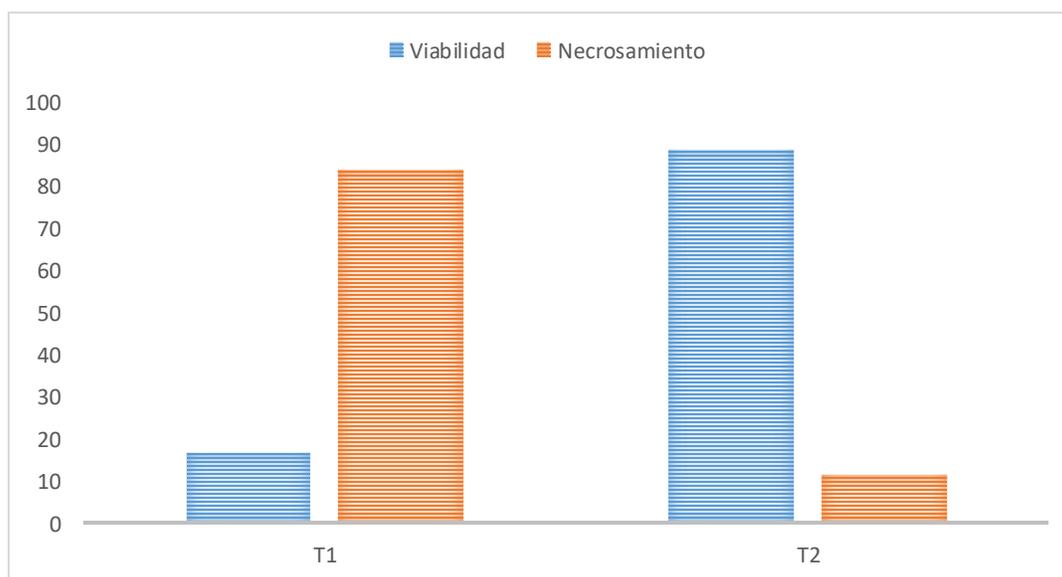
**Tabla 7**

*Valores de viabilidad y necrosamiento obtenidos en hojas de *Origanum majorana* L. después de los 21 días de cultivo.*

Tratamientos	Contaminación (%)	Viabilidad (%)	Necrosamiento (%)
<b>MS ½</b>	0	16,67	83,83
<b>MS completo</b>	0	88,33	11,67

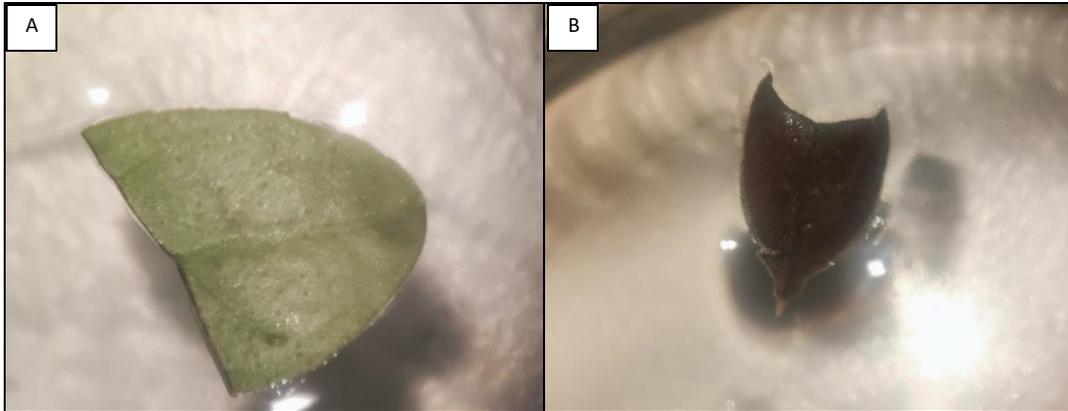
**Figura 9**

*Gráfica de los valores de viabilidad y necrosamiento obtenidos en hojas de *Origanum majorana* L. a los 21 días de cultivo.*



**Figura 10**

*Necrosamiento en hojas de Origanum majorana L. observados a los 21 días de cultivo*

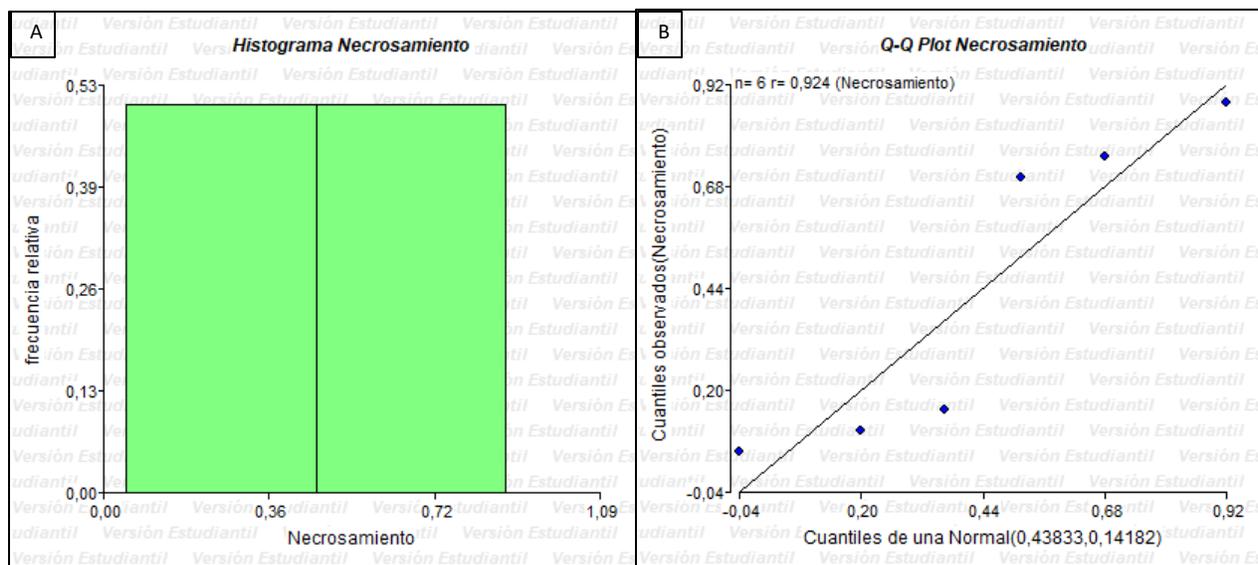


*Nota.* A) Hoja viable, B) Hoja necrosada

Se realizaron las pruebas de normalidad que se pueden visualizar en la Figura 11. Tanto en el histograma como en el Q-Q Plot, no se pudo determinar si los datos eran normales, ya que no se utilizaron los datos suficientes, por lo que se comprobó con la prueba de Shapiro-Wilks (modificado).

Figura 11

Pruebas de normalidad de los datos de necrosamiento en hojas de *Origanum majorana* L. obtenidos en la etapa de evaluación de medio de cultivo



Nota. Se muestran las pruebas de normalidad A) Histograma, B) Q-Q plot, los cuales muestran que no existe una tendencia normal en los datos

La prueba de Shapiro-Wilks (modificado) mostró un valor-p (0,0642) que es mayor al nivel de significancia (0,05), por lo tanto, los datos tienen una distribución normal. Por esta razón se utilizó el Test de Duncan (Tabla 8) para determinar el mejor tratamiento.

**Tabla 8**

Test: Duncan Alfa=0,05 de la etapa de evaluación de medio de cultivo para la inducción de células madre en hojas de *Origanum majorana* L.

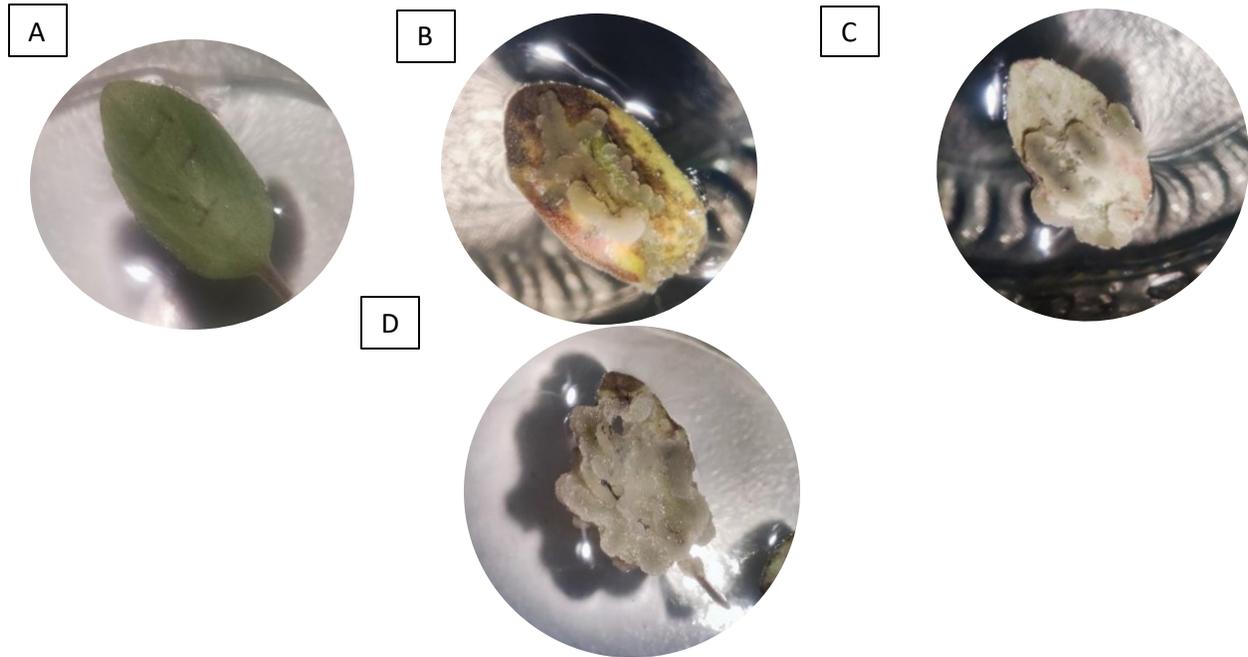
Tratamientos	n	Medias	E.E.	Agrupación
<b>MS</b>	3	0,10	0,04	A
<b>MS ½</b>	3	0,78	0,04	B

### Inducción a células madre en hojas de *O. majorana* L.

La presencia de callo se pudo observar en todos los tratamientos a partir del día 35 posterior a su inoculación, esto puede observarse en la Figura 12. Los datos obtenidos de inducción a callo en cada tratamiento se detallan en la Tabla 9

**Figura 12**

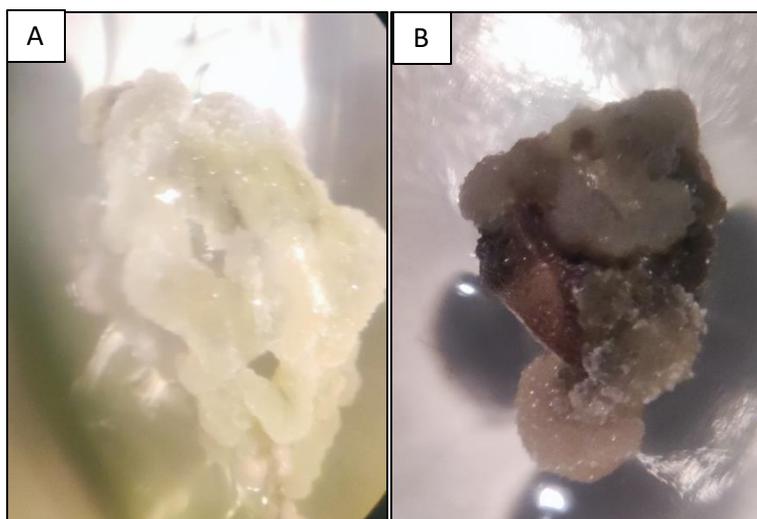
*Proceso de inducción a células madre in vitro a partir de hojas de O. majorana en el transcurso de 28 días.*



*Nota.* Callo formado en hojas de *Origanum majorana* L., a los 14 días (A), 21 días (B), a los 28 días (C) y a los 35 días (D) posteriores a la siembra

### Figura 13

*Variaciones de callo que se presentaron en los tratamientos de inducción a células madre en hojas de Origanum majorana L.*



*Nota.* A) Callo formado a partir de una hoja verde, B) Callo formado a partir de una hoja oxidada.

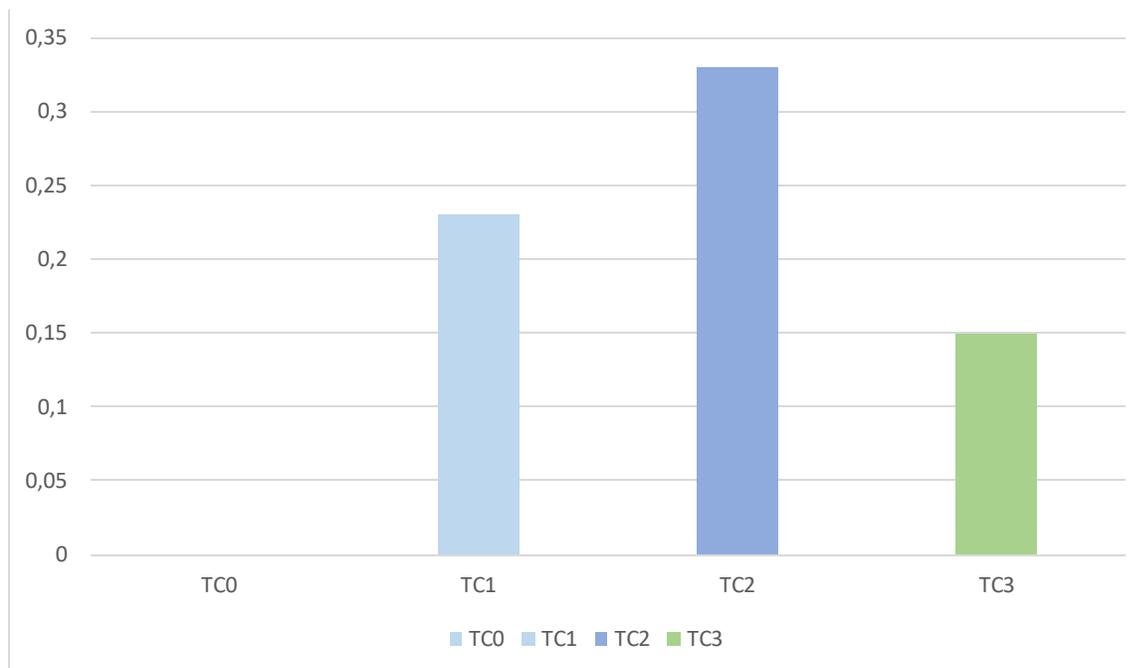
### Tabla 9

*Datos de porcentaje de inducción a células madre en hojas de Origanum majorana L. obtenidos en los distintos tratamientos con 2,4-D y 6-BAP.*

Tratamiento	Células Madre (%)
TC0	0
TC1	23
TC2	33
TC3	15

## Figura 14

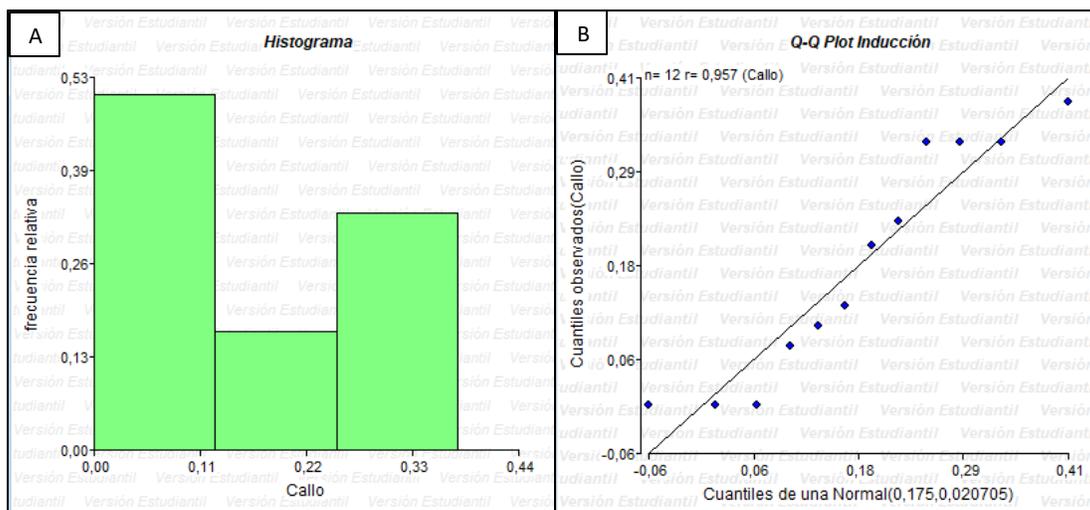
*Gráfica de los datos obtenidos a los 35 días en el proceso de inducción a células madre en hojas de *Origanum majorna* L. aplicando distintos tratamientos con 2,4-D y 6-BAP.*



En la Figura 15 se observan las pruebas de normalidad que se realizaron con los valores obtenidos, en donde se verifica que los datos no siguen una tendencia normal, por lo tanto, se aplicaron pruebas no paramétricas para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Figura 15

Pruebas de normalidad de los datos obtenidos en la inducción de células madre en hojas de *Origanum majorna* L.



Nota. Se muestran las pruebas de normalidad A) Histograma, B) Q-Q plot, los cuales muestran que no existe una tendencia normal en los datos

Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis donde el valor-p (0,0417) es menor que el nivel de significancia (0,05), es decir que los tratamientos tienen una diferencia estadística significativa. Se utilizó el Test de Duncan (Tabla 9) para determinar el mejor tratamiento, se puede observar que el tratamiento TC1 es el que presenta una media mayor de inducción de células madre por lo que se determina que este es el mejor tratamiento.

**Tabla 10**

*Test: Duncan Alfa=0,05 de la etapa de inducción de células madre a partir de hojas de *Origanum majorana* L.*

<b>Tratamientos</b>	<b>n</b>	<b>Medias</b>	<b>E.E.</b>	<b>Agrupación</b>
<b>TC2</b>	3	0,33	0,05	A
<b>TC1</b>	3	0,23	0,05	A B
<b>TC3</b>	3	0,14	0,05	B C
<b>TC0</b>	3	0,00	0,05	C

## Capítulo V: Discusión

*Origanum majorana* L. es una planta aromática de la familia Lamiaceae, esta familia cuenta con varias plantas consideradas medicinales por su composición; dentro de ellas se encuentra la mejorana, la cual consta de taninos, pentosas, terpenos y sesquiterpenos, que le otorgan propiedades bactericidas, relajantes, inmunoestimulantes y antifúngicas. Además, se caracteriza por tener un olor y sabor agradables, aportándole distintas aplicaciones en la gastronomía, cosmética, industria alimentaria y farmacéutica (Meza *et al.*, 2007).

El cultivo tradicional de la mejorana puede tomar mucho tiempo, se suele realizar la cosecha a los cuatro meses de la siembra y dos meses después se puede realizar el segundo corte. Sin embargo, cuando hay plantaciones tardías, se puede realizar solo una cosecha a los 5 meses de trasplante (Rodríguez *et al.*, 2000). Por lo tanto, para realizar un producto en base a esta planta, se requeriría de mucho tiempo y espacio para obtener una cosecha abundante. Se plantea el cultivo *in vitro* de la mejorana como una mejor opción para su producción masiva, ya que a partir de la totipotencialidad de las células vegetales se puede desarrollar un nuevo ser biológico a partir de algo mucho más simple como un órgano (Alcántara *et al.*, 2017). El cultivo *in vitro* permite obtener metabolitos secundarios sin la necesidad de esperar que la planta crezca completamente; de esta forma, si se quiere realizar productos a nivel industrial, este tipo de cultivo sería la mejor opción. Además, no se necesitan cantidades extensas de terreno para la producción masiva (Tazeb, 2017).

### **Desinfección de las hojas de *Origanum majorana* L.**

Para el establecimiento *in vitro*, el proceso de desinfección es una etapa previa importante para que la introducción sea óptima, aprovechando todo el material vegetal. En los controles del protocolo de desinfección realizados en este ensayo se evidenció contaminación del 100% de los explantes, debido a bacterias y hongos. Según Ramírez-Rojas *et al.* (2016), las bacterias pueden habitar como saprofitos, epifitos, endófitos, simbioses y patógenos de

animales, humanos y plantas. Cassells & Doyle-Prestwich (2009) menciona que los explantes que tienen más riesgo de contaminación son las hojas, y tallos, ya que los microorganismos se pueden alojar en la cutícula de las hojas y en las cavidades de los tallos.

Los hongos constituyen uno de los mayores problemas en cultivo *in vitro*, estos pueden introducirse con el explante, por el ambiente del laboratorio y/o manipulación. Estos pueden interferir con el desarrollo del explante ya que son invasivos (Álvarez *et al.*, 2016). Según Sánchez *et al.* (2006) las plantas aromáticas medicinales como la mejorana, poseen microorganismos como bacterias u hongos. El *Aspergillus* es uno de los géneros de hongos que más se aísla en distintos tipos de alimentos; en cuanto a las bacterias se presenta con mayor frecuencia *Bacillus ssp.* Sin embargo, con los tratamientos realizados en esta investigación, se pudo reducir la contaminación a porcentajes menores al 10%. El protocolo de desinfección aplicado estuvo basado en los estudios de Korkor *et al* (2017) e Iyer & Pai (2000) que fueron realizados en semillas y tallos de *Origanum majorana* L. respectivamente, por lo que se realizó modificaciones para adecuarlo a hojas.

### **Evaluación del medio de cultivo**

Según los resultados mencionados en la presente investigación, los explantes sembrados en medio de cultivo con sales minerales MS ½ presentaron un menor porcentaje de viabilidad, por lo que se optó por utilizar el MS a concentración completa en la siguiente etapa. Las hojas que fueron sembradas con menor cantidad de nutrientes presentaron necrosis, lo que según Novoa *et al.* (2018) quien evaluó el efecto de las deficiencias y excesos del potasio y del boro, la necrosis en hojas es uno de los síntomas de la falta de potasio en las plantas. Según Roca & Mroginski (1993) el medio de cultivo MS contiene altos niveles de potasio, el cual es importante para el desarrollo de las plantas; dentro de sus funciones principales constan, la regulación osmótica, el incremento de electrolitos en la célula, la regulación de agua en la planta y la disminución de ataque por microorganismos al reducir la acumulación de

cadenas de carbohidratos, los cuales pueden incrementar la proliferación de bacterias y hongos (Castillo *et al.*, 2019).

### **Inducción a células madre**

Roca & Mroginski (1993) indican que una combinación de citoquininas y auxinas generalmente induce a la formación de células madre, por lo que en esta investigación se usó una combinación de dos reguladores de crecimiento (2,4-D y 6-BAP) a distintas concentraciones, estos reguladores fueron seleccionados en base a investigaciones previas realizadas en *Origanum majorana* L., en plantas del mismo género o familia (Kumar & Bhardwaj, 2020).

En el presente estudio se realizó la inducción de callo a partir de hojas, si bien no se encuentran muchas investigaciones en cuanto a la formación de callo a partir de hojas de *Origanum majorana* L., las concentraciones utilizadas fueron basadas en protocolos de inducción de *Origanum vulgare* y en investigaciones realizadas a partir de distintos explantes de *O. majorana* L. Dentro de este estudio se observó que el tratamiento con 2 mg/L de 2,4-D y 0,23 mg/L de 6-BAP fue el que presentó mayor porcentaje (33%) de inducción de células madre; sin embargo, Devasigamani & Kuppan (2013) utilizando una concentración de 2 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de BAP en yemas de *Origanum vulgare*, obtuvieron una respuesta del 90% en cuanto a la inducción de células madre, es decir, un porcentaje mayor de callo, esto podría indicarnos que una concentración mayor de 6-BAP podría permitirnos obtener un mayor porcentaje de callo, pero se debe considerar que se emplearon distintos tipos de explantes. En un estudio realizado por Korkor *et al.* (2017), se obtuvo un mejor porcentaje de callo al utilizar 2,4-D (2 mg/L) combinado con una citoquinina a una concentración de 0,5 mg/L. Esto podría confirmar que, al aumentar la concentración de la citoquinina, el porcentaje de células madre podría aumentar.

En los resultados observados en la Figura 13A y la Figura 13B se muestra las diferencias que presentan los callos según el estado de los explantes. Varias de las hojas pasaron por un proceso de oxidación para poder formar el callo, mientras que otras presentaron el callo sin oxidación. Según Van Staden *et al.* (2006), el estado oxidativo de las plantas se puede presentar por la escisión del explante, la composición del medio de cultivo, el desbalance de citoquininas/auxinas y otras condiciones. La variación de los callos observado en los resultados fue independiente del tratamiento usado, por lo que no se podría atribuir a la cantidad de citoquininas/auxinas. Esto se podría explicar por la escisión del explante, lo que pudo haber inducido este estado de oxidación.

Córdova *et al.* (2014) indica que en la etapa de establecimiento *in vitro*, muchos de los explantes empiezan a perder el color verde e inician un oscurecimiento, liberando una mezcla de sustancias fenólicas que pueden o no ser inhibitorios o tóxicos; en este proyecto, se observa que la oxidación no afecta la viabilidad del explante para formar callo. Azofeifa (2009) indica que varias investigaciones *in vitro* asocian efectos benéficos en el desarrollo de los explantes con la presencia de algunas formas de ROS, en algunos trabajos, se puede adicionar intencionalmente al medio de cultivo un agente oxidante, por ejemplo, el uso de agentes antioxidantes, favorece la embriogénesis en el tabaco cultivado *in vitro* (Science Press and International Rice Research Institute, 1983)

## Capítulo VI: Conclusiones

- Se logró establecer un protocolo de desinfección correspondiente al tratamiento 3 (detergente 2%, etanol 70% e hipoclorito de sodio 3%) que permitió que el 98% de los explantes introducidos no presenten ningún tipo de contaminación y sean viables para una posterior etapa de inducción a células madre.
- Se determinó que el medio de cultivo con sales minerales MS a su concentración completa, permite una viabilidad del 88,3% en comparación con el 16,67% de viabilidad en el medio de cultivo MS  $\frac{1}{2}$  el cual presenta necrosamiento.
- Se definió que el tratamiento 2 que corresponde al medio de cultivo con sales minerales MS suplementado con 2 mg/L de 2,4-D y 0,23 mg/L de 6-BAP indujo a una mayor cantidad de células madre (33%) que los otros tratamientos, por lo que se estableció a éste como el mejor.
- Se observó que la oxidación en hojas de *Origanum majorana* L. no afecta en la viabilidad del explante para poder inducir células madre.

### Capítulo VII: Recomendaciones

- Se recomienda realizar más estudios en donde se evalúe los efectos positivos y negativos de aumentar la concentración de citoquininas en la inducción de células madre en hojas de *Origanum majorana* L.
- Realizar análisis de los principios activos que se encuentren en el callo originado a partir de hojas de mejorana (*Origanum majorana* L.)
- Establecer suspensiones celulares para verificar la cantidad de metabolitos secundarios que puedan estar presentes en la suspensión y si es que esta es mayor a la que se produce en los callos como tal.
- Determinar si existen diferencias entre los compuestos que presentan los callos formados en hojas oxidadas y los que se formaron en hojas verdes.

## Bibliografía

- Agexport. (2020). *Mejorana, Origanum majorana*. <https://www.export.com.gt/documentos/guia-de-cultivos/guia-de-cultivo-de-mejorana.pdf>
- Causton C, Jäger H, Jiménez-Uzcátegui G, Keith I, Jenna Wong L, Pagad S (2020). Global Register of Introduced and Invasive Species - Galápagos Islands, Ecuador. Version 1.5. Invasive Species Specialist Group ISSG. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/gabofb> accessed via GBIF.org on 2022-09-26.
- Criado, M., Caputo, C., & Roberts, I. (2010). Las citocininas. Nueva herramienta para mejorar la removilización de carbono y nitrógeno en trigo y la eficiencia de fertilización. *Inst. de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales Inba-Ex IBYF (Conicet-Fauba)*, 15. <https://fertilizar.org.ar/wp-content/uploads/2021/02/2010-no-15-Las-citocininas.-Nueva-herramienta-para-mejorar-la-removilizacio%CC%81n-de-carbono-y-nitro%CC%81geno-en-trigo-y-la-eficiencia-de-fertilizacio%CC%81n.pdf>
- Cortés, J., Godoy, J., Cortés, J., & Sánchez, R. (2019, abril 26). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17 (32), 109-129.
- Fichet, L.T. 2017. Biosíntesis de las Fitohormonas y Modo de Acción de los Reguladores de Crecimiento. Serie Nutrición Vegetal Núm. 92. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 6 p
- Fonnegra, R., & Jiménez, S. L. (2007). *Plantas Medicinales Aprobadas en Colombia* (2da ed.). Editorial Universidad de Antioquia. <https://books.google.com.ec/books?id=K8el-7ZeFpsC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Guevara, E. (2018). Evaluación de la actividad antimicrobiana “*in vitro*” del extracto hidroetanólico de hojas de *Origanum majorana* en cepas de *Proteus spp.* [Proyecto de investigación previo a la obtención del grado académico de magister en farmacia clínica y hospitalaria]. Universidad Regional Autónoma de los Andes.

- Gordillo, L. (2019). *Análisis Histológico de la Acción de las Auxinas y Citoquininas en la Elongación de la Raíz. Discusión de la Influencia de la Mejora de la Composición y Calidad de los Productos Derivados*. [Trabajo Fin de Grado Ciencia y Tecnología de los Alimentos].  
[https://dehesa.unex.es/bitstream/10662/9564/1/TFGUEx\\_2019\\_Gordillo\\_Calatrava.pdf](https://dehesa.unex.es/bitstream/10662/9564/1/TFGUEx_2019_Gordillo_Calatrava.pdf)
- Goel, P., & Vasudeva, N. (2015). *Origanum majorana L.*- Pyto-pharmacological review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 6(4), 261-267.
- Origanum majorana L.* in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset  
<https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-09-25.
- Alcántara, J., Catilla, M., & Sánchez, R. (2017). *Importancia de los cultivos vegetales Invitro para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación*. 1(1), 71-83.
- Álvarez, S. P., López, N. E. L., Tapia, M. A. M., Leal, A. P. A., Guerrero, A. M., & Cultivos Tropicales. (2016). Short communication Contaminant fungi in *in vitro* establishment of potato apexes. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.26063.69284>
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de Oxidación y oscurecimiento de Explantes Cultivados *in vitro*. 2009, 20(1), 153-175.
- Bina, F., & Rahimi, R. (2017). Sweet Marjoram: A Review of Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Biological Activities. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 22(1), 175-185. <https://doi.org/10.1177/2156587216650793>
- Cassells, A. C., & Doyle-Prestwich, B. (2009). Contamination Detection and Elimination in Plant Cell Culture. En M. C. Flickinger, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology* (p. eib241). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib241>
- Castillo, L., Maldonado, J., Castro, Á., & Álvarez, C. (2019). *Efecto de 6-bencilaminopurina y nitrato de potasio sobre la micropropagación in vitro de Laelia anceps subsp. Anceps (Orchidaceae)*. 22(1), 32-38.

- Castillo-Pérez, L. J., Maldonado-Miranda, J. J., Alonso-Castro, Á. J., & Carranza-Álvarez, C. (2019). Efecto de 6-bencilaminopurina y nitrato de potasio sobre la micropropagación *in vitro* de *Laelia anceps* subsp. *Anceps* (Orchidaceae)//Effect of 6-benzylaminopurine and potassium nitrate on the *in vitro* micropropagation of *Laelia anceps* subsp. *Anceps* (Orchidaceae). *Biotecnia*, 22(1), 32-38. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i1.1122>
- Córdova, A., Cobos, M., Imán, S., & Castro, J. (2014). Un método eficiente para la inducción de callos *in vitro* en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh «Camu Camu». *Scientia Agropecuaria*, 25-34. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.01.03>
- Devasigamani, L., & Kuppan, N. (2013). Callus Induction and Regeneration of Multiple Shoots from *in vitro* apical bud explant of *Origanum vulgare*. An important medicinal plant. 3(4), 898-903.
- Estrada, K. (2021). Mejorana, *Origanum majorana*. Unión Europea. <https://www.export.com.gt/documentos/guia-de-cultivos/guia-de-cultivo-de-mejorana.pdf>
- Fonnegra, R., & Jiménez, S. L. (2007). *Plantas Medicinales Aprobadas en Colombia* (2da ed.). Editorial Universidad de Antioquia. <https://books.google.com.ec/books?id=K8el-7ZeFpsC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Korkor, A. M., Mohamed, S. A., kafie, O. M. A. E.-, & Gohar, A. A. (2017). Adaptation of the *in vitro* Culture of *Origanum majorana* L. For Production of Phenolic Acids. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 12(02), 30-38. <https://doi.org/10.9790/3008-1202013038>
- Kumar, M., & Bhardwaj, D. (2020). The underexploited biotechnology of overexploited *Origanum* species: Status, knowledge gaps, prospects and potential. *Plant Science Today*, 7(4). <https://doi.org/10.14719/pst.2020.7.4.816>
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal II* (Vol. 1). INTA.

<https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/BiotecnologiayMejoramientovegetalII.pdf>

Madroñero-Palacios, S., & Guzmán-Hernández, T. (2018). Desarrollo sostenible. Aplicabilidad y sus tendencias. *Revista Tecnología en Marcha*, 31(3).

<https://doi.org/10.18845/tm.v31i3.3907>

Mamani, R., & Gómez, J. (2019). “Efecto de la humedad de hojas de mejorana (*Origanum majorana* L.) y su rendimiento en la extracción de aceite esencial por arrastre de vapor” [Para optar el: Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial, Universidad Privada de Tacna]. <https://repositorio.upt.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12969/1625/Mamani-Condori-Gomez-Calderon.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Mena, P. (2010). *La Biodiversidad del Ecuador* (FLACSO, Vol. 1). FLACSO.

<https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/49907.pdf>

Meza, M., Gonzáles, N., & Usubillaga, A. (2007). *Composición del aceite esencial de Origanum majorana* L. extraído por diferentes técnicas y su actividad biológica. 24(4), 725-738.

Morales-Rubio, M. E., Espinosa-Leal, C., & Garza-Padrón, R. A. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. En Laboratorio de Micropropagación, Departamento de Biología Celular y Genética, Cuerpo Académico Consolidado de Biología Celular y Genética Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México (Ed.), *Investigación en plantas de importancia médica* (1.ª ed., pp. 351-410). OmniaScience. <https://doi.org/10.3926/oms.315>

Moscatiello, R., Baldan, B., & Navazio, L. (2013). Plant Cell Suspension Cultures. En F. J. M. Maathuis (Ed.), *Plant Mineral Nutrients* (pp. 77-93). Humana Press.

[https://doi.org/10.1007/978-1-62703-152-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-152-3_5)

Novoa, M. A., Miranda, D., & Melgarejo, L. M. (2018). Efecto de las deficiencias y excesos de fósforo, potasio y boro en la fisiología y el crecimiento de plantas de aguacate (*Persea*

- americana, cv. Hass). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 12(2), 293-307.  
<https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i2.8092>
- Perea, M. (2009). Cultivo de Tejidos Vegetales *In Vitro* (1ra ed.). Universidad Nacional de Colombia.  
[http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad\\_de\\_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas\\_Libros/Biologia/Cultivo\\_de\\_Tejidos\\_Vegetales\\_In\\_Vitro/Cultivo\\_de\\_Tejidos\\_Vegetales\\_In\\_Vitro.pdf](http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad_de_Ciencias/Publicaciones/Imagenes/Portadas_Libros/Biologia/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro/Cultivo_de_Tejidos_Vegetales_In_Vitro.pdf)
- Ramírez-Rojas, S., Osuna-Canizalez, F. D. J., García-Pérez, F., Canul-Ku, J., Hernández-Romano, J., Ornelas-Ocampo, K., & Landa-Salgado, P. (2016). Identificación molecular de bacterias asociadas a plantas ornamentales producidas *in vitro*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*.  
<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1511-3>
- Ríos, L. (2009). *Caracterización Morfológica de los Procesos de Desdiferenciación y Rediferenciación de Explantes Foliares de Cempaxúchil* [Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias en desarrollo de productos bióticos, Instituto Politécnico Nacional].  
<https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/7701/CARACMORFOL.pdf?sequence=1>
- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones* (Colombia, Vol. 7). CIAT.
- Rodriguez, C., Acosta, L., Fuentes, V., & Borrego, G. (2000). *Investigaciones agrícolas en especies de uso frecuente en la medicina tradicional: II. Mejorana *Origanum majorana* L.* 5(3), 87-90.
- Sánchez, V., Gonzáles, A., & Lurá, M. (2006). *Análisis Microbiológico de Hierbas Medicinales y su Contaminación por Especies de *Aspergillus* Toxicogénicas.* 25(1), 89-94.
- Science Press and International Rice Research Institute. (1983). *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement*.

- Tazeb, A. (2017). *Plant Tissue Culture Technique as a Novel Tool in Plant Breeding: A Review Article*. 12(2), 111-118. <https://doi.org/10.5829/idosi.ajeaes.2017.111.118>
- Valdés, J., Rodríguez, N., González, L., Velázquez, J., Rivero, D., Sourd, D., Martínez, F., & Rodríguez, J. (2012, diciembre). *La biotecnología como herramienta para la propagación, conservación y el mejoramiento genético del guayabo*. XIV(2), 7-19.
- Van Staden, J., Fennell, C. W., & Taylor, N. J. (2006). Plant Stress *in vitro*: The Role of Phytohormones. *Acta Horticulturae*, 725, 55-62.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.725.2>
- Wang, S., Zhou, L., Attia, F. A.-Z. K. K., Tang, Q., Wang, M., Liu, Z., Waterhouse, G. I. N., Liu, L., & Kang, W. (2021). *Origanum majorana* L.: A Nutritional Supplement With Immunomodulatory Effects. *Frontiers in Nutrition*, 8, 748031.  
<https://doi.org/10.3389/fnut.2021.748031>
- Zhiminaicela-Cabrera, J. B., Quevedo-Guerrero, J. N., Herrera Reyes, S. N., Sánchez Quinche, A. R., & Bermeo-Gualan, L. Y. (2020). Estudio Etnobotánico de Plantas Medicinales e Importancia de Conservar las Especies Vegetales Silvestres del Cantón Chilla, Ecuador. *Ethnoscintia - Brazilian Journal of Ethnobiology and Ethnoecology*, 5(1).  
<https://doi.org/10.18542/ethnoscintia.v5i1.10296>