



Universidad
Católica de
Valencia
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

Revisión acerca de las técnicas de cultivo *in vitro* empleadas en el género *Satureja* L.

Alumno Jose María Guijarro Blanco
Tutor Jorge Juan Vicedo
Curso académico 2021-2022



Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas que han contribuido de alguna manera a que este trabajo saliera adelante.

En primer lugar, gracias a mi tutor, el Dr. Jorge Juan Vicedo, el cual se ha preocupado mucho por como avanzaba en el trabajo y ha puesto mucho esmero en las correcciones. En segundo lugar, a todos los profesores que se han esforzado en su trabajo y han conseguido transmitir su pasión y sus conocimientos al alumnado.

Por último, especial agradecimientos a mis padres, sin los cuales ni yo estaría aquí, ni hubiera podido estudiar esta carrera. También a Mamen, por acompañarme tan largas horas en la biblioteca y hacerme más ameno el estudio.

A todos, gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
LISTADO DE ABREVIATURAS	V
RESUMEN:.....	VII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. GÉNERO SATUREJA	1
1.2. DESCRIPCIÓN ETNOBOTÁNICA DEL GÉNERO <i>SATUREJA</i>	2
1.3. EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....	4
1.4. TÉCNICAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	5
1.5. JUSTIFICACIÓN DE LA REVISIÓN.....	11
2. OBJETIVOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
3.1. DISEÑO DE LA ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA	13
3.2. BASES DE DATOS	13
3.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	15
3.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	15
3.5. ECUACIONES DE BÚSQUEDA.....	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1. RESULTADOS BIBLIOMÉTRICOS	19
4.2. RESULTADOS ANALÍTICOS.....	25
5. CONCLUSIONES.	45
6. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN.....	47
7. BIBLIOGRAFÍA.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de Satureja L. en el continente europeo y el norte de África. Fuente: Euro+MedPlantBase, 2016	2
Figura 2: Principales componentes de Satureja hortensis L. responsables de su actividad biológica. Fuente: (Fierascu et al., 2018)	4
Figura 3 Métodos de destilación sobre la concentración de aceite esencial y perfil de aroma de Satureja rechingeri Jamzad. Fuente: (Sefidkon y Emami Bistgani, 2021).....	5
Figura 4. Diagrama de los métodos actuales empleados para producción a gran escala de compuestos bioactivos, empleando cultivo de tejidos in vitro de plantas. Fuente: (Espinosa-Leal et al., 2018).....	7
Figura 5. Diagrama de barras con el total de artículos empleados para este estudio, divididos en intervalos de 5 años desde 1996 hasta 2025.....	20
Figura 6. Localización geográfica de las investigaciones publicadas acerca del tema en estudio (países coloreados en verde.....	26
Figura 7. Porcentaje de medios de cultivo empleados las publicaciones seleccionadas para el presente trabajo.61% MS, 27% B5, 6% WPM y 6% LS.	41
Figura 8. Total de reguladores del crecimiento empleados en las publicaciones.	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo clasificado en macronutrientes, micronutrientes, y vitaminas y otros suplementos; MS Murashige and Skoog, G5 = Gamborg et al., W= White, LM= Lloyd and McCown, VW= Vacin and Went, Km=Kudson modificado, M= Mitra et al. y NN= medio Nitsch and Nitsch. Fuente: (Saa & Elshahed, 2012)	8
Tabla 2. Ecuaciones de búsqueda generadas.	17
Tabla 3. Cantidad total de resultados obtenidos tras la búsqueda bibliográfica, y agrupados según la ecuación empleada y clasificadas de la “A” a la “J”	19
Tabla 4. Artículos incluidos en este trabajo divididos en intervalos de 5 años desde 1996 hasta 2025.....	19
Tabla 5. Autores, título, revista y año de publicación de los artículos incluidos en este estudio.....	21
Tabla 6. Condiciones ambientales establecidas para el cultivo in vitro del género <i>Satureja</i> desde 1996 hasta 2025. Se muestra Especie, Temperatura (°C), Fotoperiodo, Intensidad lumínica.....	27
Tabla 7. Medios de cultivo empleados en el cultivo in vitro del género <i>Satureja</i> , reguladores de crecimiento adicionados (mg/L), otros elementos adicionados al medio, técnicas de cultivo, tipo de explantes clasificados por autor y especie.....	31
Tabla 8. Clasificación de publicaciones en función del análisis de variación somaclonal (Sí/No) (Sí/No).....	44

LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviaturas	
LS	Linsmaier y Skoog
B5	Gamborg
MS	Murashige and Skoog
AIB	Ácido indol-3-butírico
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ANA	Ácido 1-naftalenacético
BAP	6-Bencilaminopurina
2iP	6-(γ,γ -Dimetilalilamino)purina
KIN	Kinetina
ZN	Zeatina
TDZ	Tidiazuron
PPM	Plant preservative mixture" (PPM
PVP	Polivinilpirrolidona
MWCNT	<i>Multi Walled Carbon Nano Tubes</i>
MeJA	Jasmonato de metilo
WPM	<i>Woody Plant Medium</i>
NaPP	Pirofosfato de sodio

RESUMEN:

Satureja L. es uno de los géneros de plantas medicinales más importantes por el conjunto de actividades biológicas descritas para sus extractos. Las técnicas de cultivo *in vitro* constituyen un conjunto de herramientas biotecnológicas de gran interés en la producción de plantas con interés económico, ya que permiten propagar genotipos de forma masiva, o desarrollar clones de plantas mejoradas. A pesar del interés que este género suscita, todavía no se ha realizado una revisión bibliográfica acerca de la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* en ellas. Por este motivo, el objetivo principal de este trabajo se centra en explorar el estado del conocimiento actual acerca de la aplicación de estas técnicas en *Satureja*. Para ello, se ha realizado una búsqueda bibliográfica en las principales bases de datos científicas (Web of Science, Google Scholar, etc.) empleando distintas ecuaciones de búsqueda y palabras clave, y aplicando un total de 8 criterios de inclusión y exclusión. Se han obtenido y analizado 29 trabajos científicos y el análisis de los resultados muestra una intensificación en el número de publicaciones durante los últimos años, la mayoría de ellos publicados en Irán. Las temperaturas de cultivo ensayadas oscilan entre los 21°C y 25°C, y el fotoperiodo mayoritario es de 16 horas. La técnica de cultivo *in vitro* más empleada es la micropropagación, seguida del cultivo de callo y cultivo celular en suspensión. Los medios de cultivo más empleados son MS (61%), B5 (27%), LS (6%) y WPM (6%). Los reguladores de crecimiento más empleados fueron BAP, AIB, ANA, KIN, AIA, y TDZ. Aunque hay cierto desarrollo del cultivo *in vitro* en *Satureja*, sería deseable estudiar un mayor número de especies, analizar el efecto de reguladores no probados hasta la fecha, y ampliar el rango de concentraciones, para sacar el máximo provecho de estas plantas.

Palabras clave: *Satureja*, *in vitro*, micropropagación, callo, medios, técnicas, cultivo, reguladores del crecimiento vegetal.

ABSTRACT

Satureja L. is one of the most important medicinal plant genera due to the set of biological activities described for its extracts. *In vitro* culture techniques constitute a set of biotechnological tools of great interest in the production of plants with economic interest, since they allow genotypes to be propagated massively, or clones of improved plants to be developed. Despite the interest that this genus arouses, a literature review on the application of *in vitro* culture techniques has not yet been carried out. For this reason, the main objective of this work focuses on exploring the state of current knowledge about the application of these techniques in *Satureja*. For this reason, a bibliographic search was carried out in the main scientific databases (Web of Science, Google Scholar, etc.) using different keyword and search equations, and applying a total of 8 inclusion and exclusion criteria. 29 scientific works have been obtained and analyzed and the analysis of the results shows an intensification in the number of publications during the last years, most of them published in Iran. The culture temperatures tested range between 21°C and 25°C, and the majority photoperiod is 16 hours. The most widely used *in vitro* culture technique is micropropagation, followed by callus culture and suspension cell culture. The most used culture media are MS (61%), B5 (27%), LS (6%) and WPM (6%). The most used growth regulators were BAP, AIB, ANA, KIN, AIA, and TDZ. Although there is some development of *in vitro* culture in *Satureja*, it would be desirable to study a larger number of species, analyze the effect of regulators not tested to date, and broaden the range of concentrations, in order to get the most out of these plants.

Keywords: *Satureja*, *in vitro*, micropropagation, callus, media, techniques, culture, plant growth regulators.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Género *Satureja*

La familia Lamiaceae (Labiatae), conocida popularmente como labiadas en español, o como “*the mint family*” en países de habla inglesa, es característica por su abundancia en especies aromáticas, condimentarias, y medicinales debido a la riqueza en compuestos bioactivos presentes en sus aceites esenciales. Es un grupo único de plantas con flores que está mundialmente distribuido (Zhao et al., 2021).

Según estudios filogenéticos recientes, esta familia consta de unos, 79 géneros y distribuidos en 12 subfamilias (Zhao et al., 2021). El género *Satureja* consta de alrededor de 200-215 especies (Doroszenko, 1986), sin embargo, algunos autores le atribuyen a este género aproximadamente 38 especies (Euro+MedPlantBase, 2016), o 50 (Roskov et al., 2016).

Las plantas de este género son conocidas como “*Savory*” (en inglés) o ajedreas (en castellano) y son, mayoritariamente, hierbas perennes y aromáticas, con distribución prácticamente exclusiva de la cuenca del Mediterráneo, de las cuales 11 son consideradas endémicas de un territorio restringido (Sefidkon & Emami Bistgani, 2021).

Suelen tener un hábito arbustivo o semi-arbustivo, y cuenta con plantas anuales (*Satureja hortensis* L.) y perennes (*Satureja obovata* Lange) que crecen en zonas áridas, secas, sobre suelos pedregosos y calizos, así como en múltiples localizaciones montañosas y acantilados rocosos soleados y abiertos (Dodoš et al., 2021; Navarro-Rocha et al., 2020). Este género se encuentra distribuido por el Mediterráneo (Figura 1) incluyendo norte de África, el oeste y noreste chino (Durmić-pâsić et al., 2019), Europa del este, Islas Canarias (Hamidpour et al., 2014) y algunas partes de América (Jafari et al., 2016).

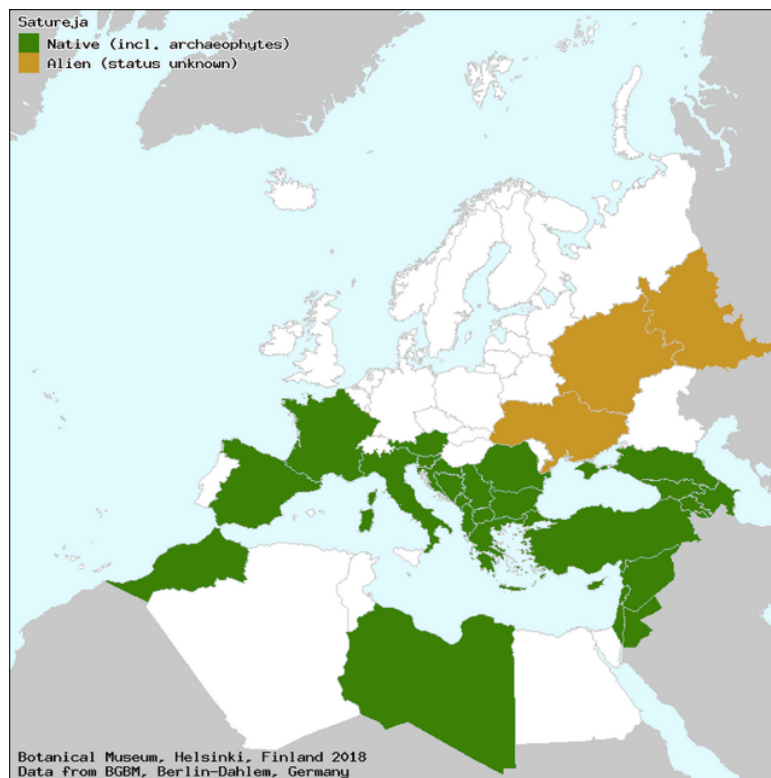


Figura 1. Distribución geográfica de *Satureja L.* en el continente europeo y el norte de África. **Fuente:** Euro+MedPlantBase, 2016

1.2. Descripción etnobotánica del género *Satureja*

Las especies del género *Satureja* han tenido un amplio uso popular a lo largo de la historia debido, principalmente, a sus propiedades conservantes de cara al almacenamiento de alimentos, pues se han documentado múltiples actividades biológicas tales como las antimicrobianas, antiparasitarias y antioxidantes (Mulas, 2006).

Este tipo de plantas se ha empleado tradicionalmente para condimentar alimentos, ya que potencia la palatabilidad, provoca una mejor digestión y tiene efectos nutraceuticos (Mulas, 2006). Cabe destacar que los nutraceuticos son alimentos, o parte de estos, que brindan beneficios para la salud o pretenden prevenir o tratar una enfermedad, además de aportar nutrientes necesarios en la dietas (Chianetta et al., 2021).

En medicina popular, se ha documentado el uso de varias especies de *Satureja* para combatir enfermedades infecciosas (Jafari et al., 2016) por las propiedades antimicrobianas, antiparasitarias, antivirales, antioxidantes, antiinflamatorias, que se le han atribuido (Abdali et al., 2017). Además, se ha documentado su uso como

antinociceptivas, antidiabéticas, hepatoprotectivas, anticolesterolémicas, anti cáncer y efectos citotóxicos, efectos cardiovasculares, actividad diurética, efectos en la fertilidad (efectos positivos en ratas macho, así como disminución de eyaculación precoz), actividad gastrointestinal (antiespasmódica), efectos inmunoestimulantes, actividad relacionada con la respiración, efectos contra el Alzheimer (Fierascu et al., 2018; Hamidpour et al., 2014; Jafari et al., 2016), y efectos biocidas de potencial aplicación en la creación de bio-pesticidas (Navarro-Rocha et al., 2020).

En muchas partes del mundo, las especies de *Satureja* se utilizan tradicionalmente para tratar a pacientes con diversas enfermedades y complicaciones. Este hecho se debe a la presencia de diferentes clases de metabolitos en *Satureja* y sus numerosas aplicaciones etnomédicas y etnofarmacológicas (Saeidnia et al., 2016).

La actividad antioxidante de este género le viene concedida debido a la presencia de compuestos polifenólicos, como en los aceites esenciales extraídos de este género. Se demostró que el aceite esencial comercial (de Irán) ejerce un efecto antioxidante considerable, según lo determinado por diferentes ensayos, como 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6 -sulfonato) sal de diamonio (ABTS), tiocianato férrico y blanqueo de β -caroteno. Se ha demostrado que la adición de un aceite esencial extraído de una especie de este género, como por ejemplo *S. hortensis*, (obtenido por hidrodestilación) a las nanopartículas de quitosano, puede conferir a estas ciertas propiedades antioxidantes (que oscilan entre el 43,66 % y el 56,99 %, según lo determinado por el ensayo DPPH) (Sefidkon & Emami Bistgani, 2021).

Respecto a la actividad antimicrobiana, se ha demostrado que se debe a la presencia de monoterpenos como el carvacrol, cimeno y timol en los aceites esenciales (Davoodi & Nejad-ebrahimi, 2022). Esta propiedad se ha empleado para prevenir el deterioro de alimentos, contra patógenos de otras plantas, e incluso patógenos humanos (Sefidkon & Emami Bistgani, 2021). Mediante el ensayo de difusión en disco, el aceite esencial de por ejemplo la especie *Satureja bachtiarica*, se ha demostrado actividad antibacteriana contra bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*. Utilizando el método de *broth dilution*, la concentración inhibitoria mínima (CMI) del aceite esencial de *S. bachtiarica* se calculó en 31 mg/mL. Además, de esta misma especie se genera extracto etanólico y se aplica contra bacterias Gram-positivas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*) (Jafari et al., 2016).

Otro campo interesante de aplicación de los extractos del género *Satureja* sería el agroalimentario y veterinario, debido a las propiedades antiparasitarias y plaguicidas que se han documentado (Fierascu et al., 2018; Sefidkon & Emami Bistgani, 2021). Por ejemplo, se ha estudiado la actividad amebicida de la especie *Satureja cuneifolia* conferida mediante un extracto de metanol (1-32 mg/mL) contra *Acanthamoeba catelanii*, experimento que concluyó con éxito (Jafari et al., 2016). Por otro lado, aceites esenciales obtenidos de *S. hortensis*, han demostrado poseer poder insecticida contra *Bruchus dentipes* con un 83,7% de mortalidad a una concentración de 5µL/L y una exposición de 6h (Fierascu et al., 2018).

1.3. Extracción de aceites esenciales

La extracción de aceites esenciales es uno de los puntos críticos para la identificación de metabolitos secundarios como fenol, flavonoides, fenilpropanoides, terpenoides, alcaloides y monoterpénos. Los principales compuestos que se han descrito en este género son: alcanfor, carvacrol, timol, fenoles y flavonoides (Figura 2) (Fierascu et al., 2018; Saeidnia et al., 2016). Además, la presencia de estos en la planta, cambia según la variación estacional, factores climáticos, procedimientos agronómicos, disposición genética, etc. (Navarro-Rocha et al., 2020; Sefidkon & Emami Bistgani, 2021).

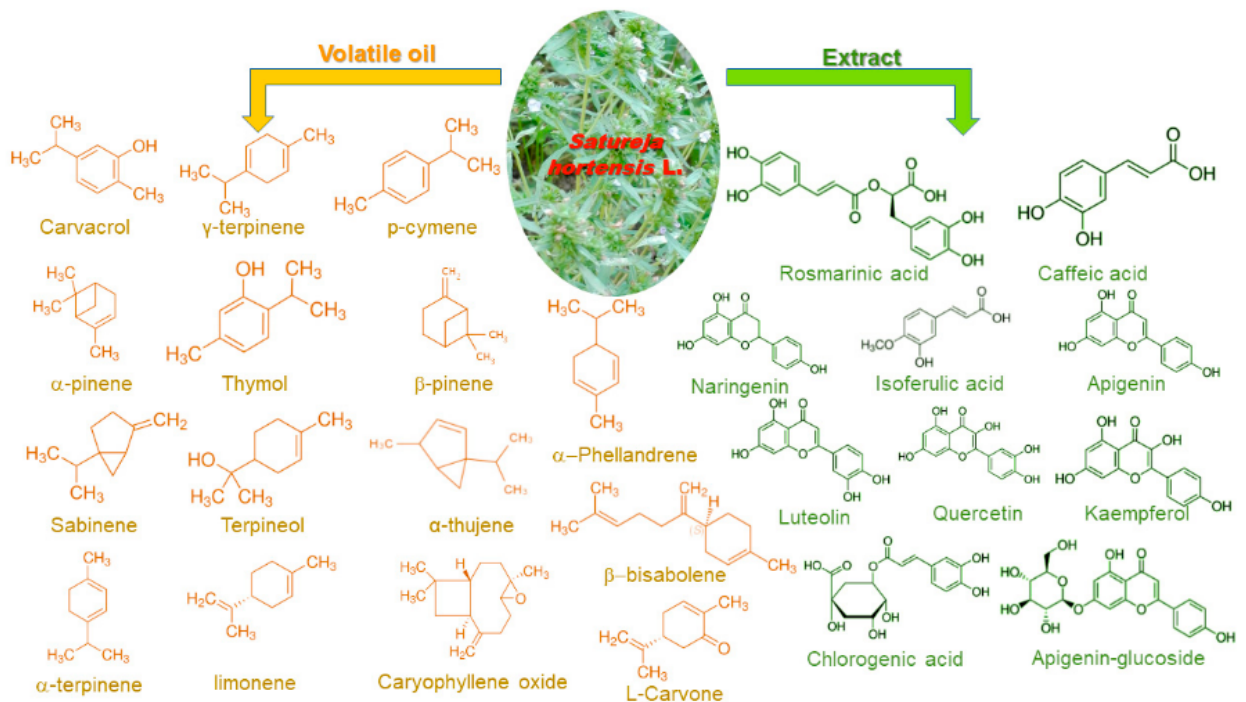


Figura 2: Principales componentes de *Satureja hortensis* L. responsables de su actividad biológica. **Fuente:** (Fierascu et al., 2018)

La extracción de estos aceites puede llevarse a cabo mediante diferentes métodos tales como la destilación (Figura 3), hidrodestilación (Destilación con vapor y destilación con agua y vapor), extracción Soxhlet, maceración, extracción asistida por ultrasonidos, extracción asistida por microondas y extracción con agua subcrítica (Fierascu et al., 2018).

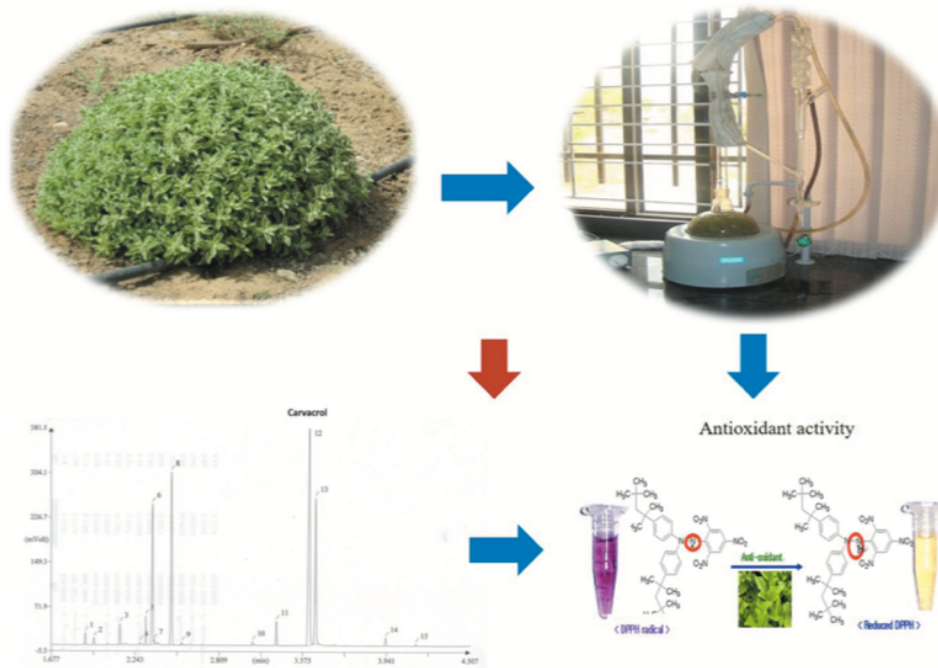


Figura 3 Métodos de destilación sobre la concentración de aceite esencial y perfil de aroma de *Satureja rechingeri* Jamzad. **Fuente:** (Sefidkon y Emami Bistgani, 2021)

1.4. Técnicas de cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* incluye un conjunto de herramientas biotecnológica orientadas al manejo de células, tejidos, órganos, o plántulas en condiciones estériles, controlando el aporte nutricional, y otras sustancias requeridas para la morfogénesis y desarrollo, así como el control de las condiciones ambientales (temperatura, fotoperiodo, intensidad lumínica, etc.) (Phillips & Garda, 2019). Algunos ejemplos de estas técnicas son, tal y como sigue:

- Micropropagación: Se trata de una clonación de plantas en recipientes cerrados bajo condiciones estériles. Dentro de estos recipientes las plantas crecen debido a los nutrientes que se les proporciona (A. V. Roberts & Schum, 2003).

- Embriogénesis somática y organogénesis: Proceso por el cual las células o tejido somáticos se desarrollan en embriones diferenciados (Hussain et al., 2012).
- Cultivo de suspensión celular: Se lleva a cabo mediante la transferencia de células del callo a un medio líquido, donde las células crecen bajo un constante agitado (Hussain et al., 2012; Moscatiello et al., 2013).
- Transformación genética (cultivo de raíces en cabellera *Hairy root*): Este se lleva a cabo mediante la inoculación de *Agrobacterium rhizogenes* o *A. tumefaciens* (Ono & Tian, 2011).

La organogénesis se refiere a la producción de nuevos órganos vegetales en condiciones de cultivo controladas *in vitro*, a partir de una planta madre o donadora de material vegetal susceptible de regeneración llamado explante (Espinosa-Leal et al., 2018).

La regeneración de tejidos *in vitro* se puede lograr directamente a partir de meristemos, tejidos o/y órganos que contengan células meristemáticas (organogénesis directa), o indirectamente a partir de células desdiferenciadas originadas por la proliferación de callos (organogénesis indirecta) (Espinosa-Leal et al., 2018; Hussain et al., 2012). Los cultivos resultantes se pueden utilizar posteriormente para la producción masiva de plantas (micropropagación) o para el cultivo de órganos específicos (por ejemplo, raíces en *Hairy root culture* para transformación genética) como se explica en la figura 6.

La callogénesis produce una masa amorfa de células en respuesta a la exposición de los explantes a diferentes reguladores del crecimiento. Luego, el callo se puede usar para regenerar plantas enteras, o se puede escalar para la producción de metabolitos con interés económico en cultivos de suspensión celular (Morales-Rubio et al., 2016).

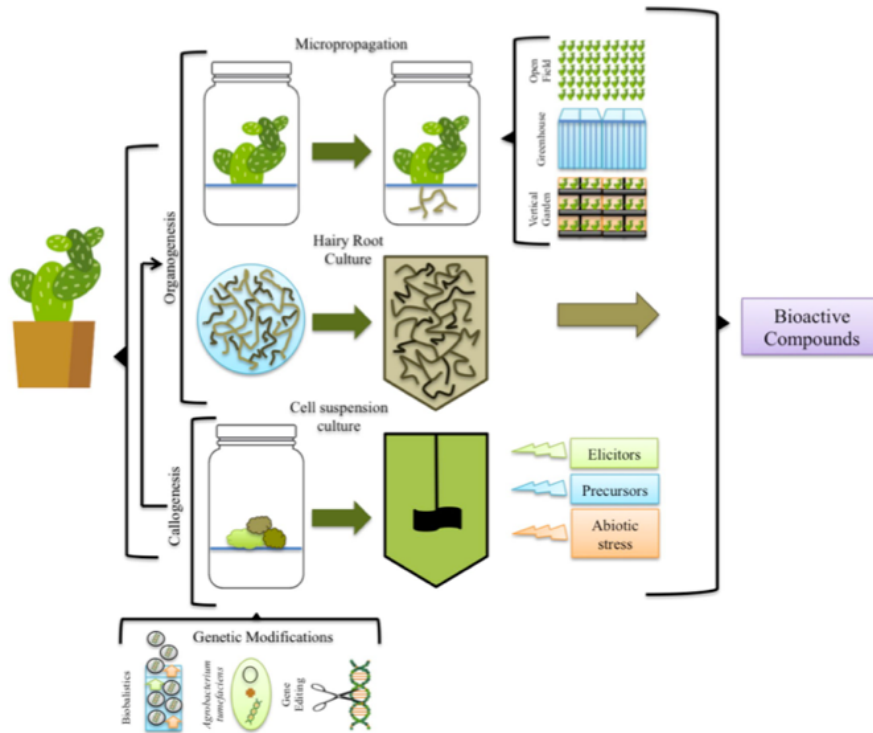


Figura 4. Diagrama de los métodos actuales empleados para producción a gran escala de compuestos bioactivos, empleando cultivo de tejidos *in vitro* de plantas. **Fuente:** (Espinosa-Leal et al., 2018)

En concreto la micropropagación de tejidos vegetales siguen una serie de pasos que constituyen protocolos más o menos complejos de trabajo de laboratorio. Por ejemplo, la micropropagación consta de 5 etapas, tal como se menciona a continuación (Espinosa-Leal et al., 2018; Hussain et al., 2012):

- Fase 0. Preparación de la planta donadora/madre: Cualquier tejido de la planta se puede utilizar.
- Fase 1. Iniciación: Tejido esterilizado y situado en medio de cultivo (generalmente se añade bactericida y fungicida).
- Fase 2. Multiplicación: Incrementar número de propágulos.
- Fase 3. Enraizamiento; Este se lleva a cabo al mismo tiempo y en el mismo medio utilizado para la fase anterior.
- Fase 4. Acimatación; las plantas son privadas del medio de cultivo y gradualmente se van pasando a diferentes sustratos.

1.4.1. Medios de cultivo empleados

El crecimiento y desarrollo óptimos de los tejidos cultivados *in vitro* puede variar mucho dependiendo del tipo de nutrientes proporcionados (Gago et al., 2011). El medio de cultivo empleado debe estar compuesto por: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, una fuente de carbono, y agentes de solidificación, estos últimos en caso de sistemas de cultivo en medios sólidos, semisólidos, o en doble fase. Además, los medios de cultivo se suelen suplementar con reguladores de crecimiento exógenos para potenciar los procesos de diferenciación, crecimiento y desarrollo vegetal. Las formulaciones básicas que se suelen emplear son LS, B5 y MS (Saa & Elshahed, 2012).

La composición mineral (macronutrientes y micronutrientes) de las formulaciones empleadas en cultivo *in vitro* se suele elegir en función de los requerimientos nutricionales de la especie, cultivar, o genotipo en cuestión. De este modo, se pueden emplear medios de cultivo ya desarrollados (Tabla 1) más concentrados en sales, tales como el MS, u otros con menores niveles de nutrientes inorgánicos, tales como el B5 (Phillips & Garda, 2019).

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo clasificado en macronutrientes, micronutrientes, y vitaminas y otros suplementos; MS Murashige and Skoog, G5 (B5) = Gamborg et al., W= White, LM= Lloyd and McCown, VW= Vacin and Went, Km=Kudson modificado, M= Mitra et al. y NN= medio Nitsch and Nitsch. **Fuente:** (Saa & Elshahed, 2012).

Medium Components (mg/L)	MS	G5	W	LM	VW	Km	M	NN
Macronutrients								
Ca ₃ (PO ₄) ₂					200.0			
NH ₄ NO ₃	1650.0			400.0				720.0
KNO ₃	1900.0	2500.0	80.0		525.0	180.0	180.0	950.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440.0	150.0		96.0				166.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.0	250.0	720.0	370.0	250.0	250.0	250.0	185.0
KH ₂ PO ₄	170.0			170.0	250.0	150.0	150.0	68.0
(NH ₄) ₂ SO ₄		134.0			500.0	100.0	100.0	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O		150.0	16.5					
CaNO ₃ ·4H ₂ O			300.0	556.0		200.0	200.0	
Na ₂ SO ₄			200.0					
KCl			65.0					
K ₂ SO ₄				990.0				
Micronutrients								
KI	0.83	0.75	0.75			80.0	0.03	

Medium Components (mg/L)	MS	G5	W	LM	VW	Km	M	NN
H3BO3	6.20	3.0	1.5	6.2		6.2	0.6	10.0
MnSO4.4H2O	22.30		7.0		0.75	0.075		25.0
MnSO4.H2O		10.0		29.43				
ZnSO4.7H2O	8.6	2.0	2.6	8.6			0.05	10.0
Na2MoO4.2H2O	0.25	0.25		0.25		0.25	0.05	0.25
CuSO4.5H2O	0.025	0.025		0.25		0.025		0.025
CoCl2.6H2O	0.025	0.025				0.025		
Co(NO3)2.6H2O							0.05	
Na2EDTA	37.3	37.3		37.3		74.6	37.3	37.3
FeSO4.7H2O	27.8	27.8		27.8		25.0	27.8	27.8
MnCl2						3.9	0.4	
Fe(C4H4O6)3.2H2O					28.0			
Vitamins and other supplements								
Inositol	100.0	100.0		100.0				100.0
Glycine	2.0	2.0	3.0	2.0				2.0
Thiamine HCl	0.1	10.0	0.1	1.0		0.3	0.3	0.5
Pyridoxine HCl	0.5		0.1	0.5		0.3	0.3	0.5
Nicotinic acid	0.5		0.5	0.5			1.25	5.0
Ca-panthothenate			1.0					
Cysteine HCl			1.0					
Riboflavin						0.3	0.05	
Biotin							0.05	0.05
Folic acid							0.3	0.5

Los reguladores de crecimiento juegan un papel clave a la hora de asegurar el éxito del cultivo, y el tipo y concentración de regulador/es empleado/s va a depender del objetivo final. De entre los diez grandes grupos de reguladores del crecimiento vegetal descritos hasta la fecha, sólo cuatro se emplean comúnmente en cultivo *in vitro*: auxinas, citoquininas, giberelinas y ácido abscísico (Hussain et al., 2012).

Las auxinas son fitohormonas de bajo peso molecular involucradas en cualquier aspecto del desarrollo de la planta (morfogénesis, división celular y elongación). Estas pueden ser transportadas largas distancias mediante el tejido vascular. Estudios anteriores sugieren que esta es sintetizada tanto en regiones meristemáticas como en órganos en crecimiento. Las citoquininas son fitohormonas producidas en tejidos meristemáticos en desarrollo. El efecto de estas resulta crítico para la división celular, ya que regulan directamente la síntesis de proteínas involucradas en la mitosis (Small & Degenhardt, 2018).

En este sentido las auxinas más comunes empleadas AIB, 2,4D y ANA y las citoquininas más utilizadas BAP, 2iP, KIN, ZN, y TDZ (Gaspar et al., 1996; Leal et al., 2017) De este modo, la combinación de auxinas y citoquininas determinará el tipo y la extensión de la organogénesis (Monfort et al., 2018; Saa & Elshahed, 2012).

Además, existen otros reguladores de crecimiento, tales como giberelinas, ácido abscísico, etileno, jasmonatos y brasinoesteroides, con una aplicación todavía minoritaria en cultivo *in vitro*, en comparación con citoquininas y auxinas (Phillips & Garda, 2019).

1.4.2. Ventajas y desventajas del empleo de las técnicas de cultivo *in vitro*

Respecto a las ventajas del cultivo *in vitro* (Bhatia et al., 2015; Hussain et al., 2012)

- Existencia de la posibilidad de crecimiento de plantas bajo condiciones asépticas y en un ambiente controlado.
- Generación de variedades mejoradas, como tolerantes a la salinidad o al estrés del calor y la sequía.
- Capacidad de cultivo de plantas libre de virus.
- Transformación genética para obtención de metabolitos secundarios.
- Cultivo independiente de la estación del año.
- Regeneración de especies amenazadas.

Respecto a las desventajas (Bhatia et al., 2015):

- Requiere de personal especializado para el desempeño.
- Las plantas producidas son nutricionalmente dependientes.
- Son muy susceptibles contaminación.

- Variación genética entre clones cuando no es buscada.

En la propagación *in vitro* de plantas, una de las mayores preocupaciones es la estabilidad genética del material vegetal producido. Esto es, la capacidad de mantener una línea genética fiel al material original, debido a que las condiciones del cultivo *in vitro*, y la aplicación de reguladores del crecimiento, pueden producir una eventual variabilidad genética originada por mutación, activación de retrotransposones, reordenamientos cromosómicos (entre otras anomalías citogenéticas y moleculares) que pueden ser un problema a la hora de emplear las plantas producidas con fines agroforestares, o en conservación de especies amenazadas (Benson, 1996; Juan-Vicedo et al., 2022; Leva et al., 2012) ya que no aseguran la fidelidad genética y morfológica con respecto al material original.

1.5. Justificación de la revisión

Satureja es uno de los géneros medicinales más importantes de la familia Lamiaceae debido al elevado interés que suscitan sus extractos, así como los metabolitos bioactivos que los componen, tales como carvacrol y timol (Sefidkon & Emami Bistgani, 2021). En este sentido, las revisiones publicadas sobre este género se centran en estos productos naturales, o en la caracterización del perfil de bioactividades (Abdali et al., 2017; Babajafari et al., 2015; D et al., 2011; Fierascu et al., 2018; Hamidpour et al., 2014; Jafari et al., 2016; Khaledi et al., 2020; Momtaz & Abdollahi, 2008; Saeidnia et al., 2016; Sefidkon & Emami Bistgani, 2021). Sin embargo, no hay todavía revisiones publicadas que recopilen el conjunto de técnicas de cultivo *in vitro* empleadas para la propagación de especies de este género. Es por este motivo que la realización de este trabajo cobra importancia, ya que recogerá, por primera vez, las técnicas de cultivo *in vitro* empleadas con el género *Satureja*, para analizar así aspectos básicos como son las técnicas aplicadas, los medios de cultivo empleados, las condiciones ambientales del cultivo, los reguladores de crecimiento adicionados, entre otros aspectos de interés científico.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica acerca de las técnicas de cultivo *in vitro* aplicadas a las distintas especies del género *Satureja*.

Para alcanzar este objetivo, el trabajo se ha instrumentalizado a través de los siguientes objetivos específicos:

- Revisar la información publicada en las principales bases de datos científicas sobre las técnicas de cultivo *in vitro* empleadas en el género *Satureja* y evaluar la distribución de las publicaciones en el tiempo, y por países.
- Realizar un análisis de la información muestreada acerca de las condiciones ambientales de cultivo *in vitro* en las distintas especies del género estudiadas hasta la fecha.
- Sintetizar los aspectos más importantes del cultivo *in vitro* (técnicas exploradas, medios de cultivo, reguladores del crecimiento, y suplementos empleados, así como el estudio de la variación somaclonal) en base a los resultados obtenidos en la bibliografía.
- Evaluar el conjunto de la información obtenida para detectar lagunas de conocimiento en el tema, y discutir posibles líneas futuras de investigación.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Con la finalidad de alcanzar los objetivos propuestos en este Trabajo Fin de Grado, se ha utilizado la metodología clásica de análisis bibliográfico para poder determinar el estado de conocimiento actual del tema propuesto, a través del estudio y análisis crítico de las distintas fuentes documentales disponibles hasta la fecha.

Para ello, se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva de trabajos científicos centrados en el estudio del cultivo *in vitro* del género *Satureja* publicados en revistas científicas de ámbito internacional.

3.1. Diseño de la estrategia de búsqueda

La estrategia de búsqueda empleada se ha basado en recopilar la información publicada durante el periodo de tiempo comprendido entre el 1 de enero de 1970 y el 31 de marzo de 2022. La información se ha obtenido a través de la utilización de ecuaciones de búsqueda (Tabla 2) aplicando los criterios de inclusión y exclusión enumerados en los apartados 3.3 y 3.4. Para ello, se ha acudido a distintas bases de datos de prestigio y alcance internacional tales como Web of Science (WOS), Current Contents Connect (CCC), Derwent Innovations Index (DIIDW), Korean Journal Database (KJD), Medline, Russian Science Citation Index (RSCI), Scielo y GoogleScholar cuyas características generales se describen a continuación.

3.2. Bases de datos

- Web of Science (WOS): Constituye la principal plataforma de información científica a nivel mundial y está constituida por una agrupación de bases de datos de gran prestigio y visibilidad internacional. Actualmente, es propiedad de Clarivate Analytics y está disponible para el público español a través de la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT), y de acceso libre para las instituciones científicas y educativas tales como universidades y centros de investigación. Contiene revistas científicas de todo tipo que publican artículos originales, revisiones, notas cortas, actas de conferencias, etc., clasificadas en un amplio abanico de disciplinas científicas organizadas en un ranking basado en distintas métricas fundamentadas en la visibilidad e impacto de los trabajos

publicados (medidos, entre otros, por citas). Recopila información desde 1900 hasta el presente.

- *Current Contents Connect (CCC)*: Es una de las colecciones completas de contenido y herramientas disponibles en la WOS. Es una base de datos que ayuda a los investigadores a mantenerse actualizados al proporcionar un fácil acceso en línea a tablas completas de contenidos, resúmenes e información bibliográfica, de los números publicados más recientemente de las principales revistas académicas. Ofrece: cobertura integral y relevante, análisis perspicaz, identificación fácil del autor y *Cover-to-cover* (permite acceso a toda la información disponible en las revistas, no solo a los artículos). Recopila información desde 1998-presente.
- *Derwent Innovations Index (DIIDW)*: Es una más de las herramientas ofrecidas por *Clarivate Analytics* que permite el acceso online a más de 30 millones de invenciones en más de 65 millones de documentos de patentes. La cobertura incluye registros de patentes de *Derwent World Patents Index* e información sobre citas de patentes de *Derwent Patents Citation Index*. Recopila información desde 1980-presente.
- *Korean Journal Database (KJD)*: Otra base de datos incluida en *Clarivate Analytics*. Consiste en literatura de investigación de Corea del Sur. La cobertura de materias incluye Artes y Humanidades, Ciencias de la Vida y Biomedicina, Ciencias Físicas, Ciencias Sociales y Tecnología. Recopila información desde 1980-presente.
- *Medline*: Es la principal base de datos bibliográfica de *National Library of Medicine* (NLM) de EE. UU., que contiene más de 25 millones de referencias a artículos de revistas de ciencias de la vida con una concentración en biomedicina. Una característica distintiva es que los registros están indexados con *NLM Medical Subject Headings (MeSH)*. *Medline* es el componente principal de PubMed, parte de la serie de bases de datos Entrez proporcionadas por el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) de NLM. Actualmente, citas de más de 5.200 revistas mundiales en aproximadamente 40 idiomas; alrededor de 60 idiomas para revistas antiguas. Recopila información desde 1950-presente.

- Russian Science Citation Index (RSCI): Una vez más forma parte de *Clarivate Analytics*. Se creó en asociación con la Biblioteca Electrónica Científica de Rusia (eLibrary.ru). El contenido es seleccionado por el comité editorial de eLibrary para reflejar la literatura académica más influyente en Rusia basada en el análisis de citas y utiliza 138 revistas académicas rusas de editoriales de la Academia Rusa de Ciencias, en ciencias sociales y humanidades, tecnologías e ingeniería, ciencias básicas y naturales, ciencias de la vida y medicina. Recopila información desde 2005-presente.
- Scielo: Ofrece literatura académica en materia de ciencias, ciencias sociales, artes y humanidades publicada en las principales revistas de acceso abierto de América Latina, Portugal, España y Sudáfrica. Recopila información desde 2002-presente.
- GoogleScholar: Incluye artículos de revistas y conferencias, tesis y disertaciones, libros académicos, preimpresiones, resúmenes, informes técnicos y otra literatura académica de todas las áreas amplias de investigación. Se indexan artículos de investigación y resúmenes de la mayoría de las principales editoriales y repositorios académicos de todo el mundo, incluidas fuentes gratuitas y de suscripción.

3.3. Criterios de inclusión

- Se incluirán solo artículos que realicen cultivo *in vitro* de alguna especie del género *Satureja*.
- Sólo se emplearán artículos originales publicados en revistas científicas.
- Solo se buscarán artículos en inglés, sin embargo, otros idiomas que puedan aparecer también serán aceptados.
- Se incluirán artículos cuyo objetivo principal no sea el cultivo *in vitro* de este género, siempre que en alguna de las fases o experimentos del estudio empleen alguna de estas técnicas.

3.4. Criterios de exclusión

- Se excluirán todos aquellos artículos de estudios realizados que no realicen cultivo *in vitro* de alguna especie del género *Satureja*.
- No se incluirán revisiones científicas o artículos que no sean la fuente principal de la información buscada, así como comunicaciones a congresos, resúmenes, y cualquier fuente de información perteneciente a la literatura gris.
- No se realizarán búsquedas que no sean en inglés.
- Se excluirán aquellos artículos que no empleen el cultivo *in vitro* dentro de alguna de sus fases o experimentos.

3.5. Ecuaciones de búsqueda

Para la elaboración de las ecuaciones de búsqueda se seleccionaron y emplearon las palabras clave que estuvieran relacionadas y fueran pertinentes al tema y objetivo del presente estudio. Además, se utilizaron diferentes operadores booleanos para conectar las palabras claves. En concreto se usaron: “AND” y “OR”.

De este modo el operador “AND” fue usado para encontrar registros que incluyeran ambos términos conectados por este operador. “OR” fue empleado para encontrar publicaciones que contuvieran cualquier de los términos separados por este operador. Cabe destacar que este último operador, es especialmente útil cuando se usan sinónimos, ya que permite un abanico más amplio de resultados. Por otro lado, como se observa en la tabla 2, se utilizó “TS” o “TI” para las ecuaciones de búsqueda, donde “TS” significa *Topic* y “TI” *Title*.

Así pues, se han generado un total de once ecuaciones de búsqueda, mostradas en la Tabla 2. Tras la aplicación de estas ecuaciones, se agruparon las publicaciones en función del período de publicación, siendo cada intervalo acotado para dicha agrupación de 5 años (1996-2000, 2001-2005, 2006-2010, 2011-2015, 2016-2020, 2021-2025) (Tabla 3). Se decidió agrupar las publicaciones seleccionadas según los criterios de inclusión, en intervalos de tiempo (5 años en este caso), para estimar si existía alguna tendencia en el número de publicaciones realizadas desde el inicio del periodo de revisión hasta la actualidad.

Tabla 2. Ecuaciones de búsqueda generadas.

Nº de Ecuación	Ecuación	Base de datos empleada	Período de tiempo acotado
A	TS=("satureja" OR "savory") AND ("micropropagation" OR "plant cell culture" OR "organogenesis" OR "meristem culture") AND ("essential oil" OR "photochemistry" OR "terpene")	Collections = CCC, DIIDW, KJD, MEDLINE, RSCI, SCIELO, WOS	1970-2022
B	TS=("satureja" OR "savory") AND ("micropropagation" OR "organogenesis" OR "meristem culture") AND ("essential oil" OR "terpene")		
C	TS=("satureja" OR "savory") AND ("micropropagation" OR "organogenesis") AND ("essential oil" OR "terpene")		
D	TI=("satureja" OR "savory") AND (" micropropagation" OR "organogenesis") AND ("essential oil")		
E	TS=("satureja") AND ("in vitro culture")		
F	TS=("Satureja") AND ("in vitro plant production")		
G	TS=("Satureja") AND ("laboratory plant production")		
H	TS=("savory" OR "satureja") AND ("in vitro culture")		
I	(((TS=(satureja)) OR TS=(savory)) AND TS=(in vitro culture)) AND TS=(micropropagation)		
J	TS=("in vitro culture of satureja")		
K	Google Scholar "Satureja in vitro culture"	Google Scholar	

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados bibliométricos

En este estudio se han revisado un total de 29 artículos. En las siguientes tablas (Tabla 3 y 4) se recogen los resultados obtenidos.

En primer lugar, la tabla 3 recopila la cantidad de resultados obtenidos tras el uso de las ecuaciones de búsqueda generadas, clasificadas cada ecuación con el total de resultados.

Tabla 3. Cantidad total de resultados obtenidos tras la búsqueda bibliográfica, y agrupados según la ecuación empleada y clasificadas de la "A" a la "K".

Nº de Ecuación	Resultados
A	464009
B	92584
C	65321
D	808
E	71
F	62
G	61
H	3610
I	12
J	75
K	10300

En segundo lugar, tal y como se ha comentado con anterioridad, las publicaciones seleccionadas para este estudio han sido agrupadas en intervalos de 5 años desde 1996 hasta 2025 (Tabla 4).

Tabla 4. Artículos incluidos en este trabajo divididos en intervalos de 5 años desde 1996 hasta 2025.

Intervalos	Nº Artículos	Porcentaje (%)
1996-2000	1	3,45

Intervalos	Nº Artículos	Porcentaje (%)
2001-2005	1	3,45
2006-2010	1	3,45
2011-2015	9	31,03
2016-2020	14	48,28
2021-2025	3	10,34
Total	29	100,00

Con el fin de representar estos resultados de una manera más gráfica, en la Figura 5 se muestra un diagrama de barras donde con los datos de la tabla 4.

En primer lugar, cabe destacar que tal y como se observa en la Figura 5, durante los tres primeros intervalos de tiempo (1996-2000, 2001-2005 y 2006-2010), el número de publicaciones referidas al tema del trabajo fue bastante bajo, ya que, comparado con los resultados obtenidos para los otros tres intervalos de tiempo (2011-2015 y 2016-2020, 2021-2025), los cuales representan el 89,65% del total de trabajos publicados.

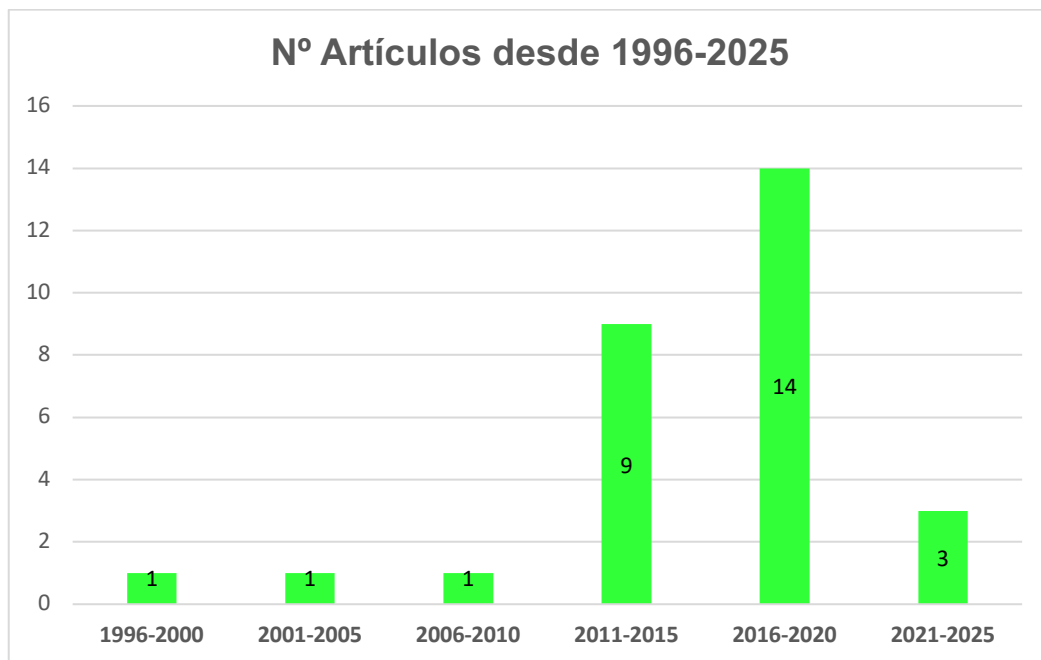


Figura 5. Diagrama de barras con el total de artículos empleados para este estudio, divididos en intervalos de 5 años desde 1996 hasta 2025.

De este modo, se evidencia que es desde el año 2011 cuando se nota un cambio sustancial, puesto que, hasta ese momento únicamente se había publicado 3 artículos

que cumplieran los criterios de inclusión descritos para este trabajo. En el siguiente lustro, las investigaciones realizadas sobre el cultivo *in vitro* de tejidos del género *Satureja* aumenta hasta 14 publicaciones. Por otro lado, en el siguiente intervalo de tiempo en estudio, es decir, los próximos cinco años (2021-2025), de los cuales únicamente se ha completado la primera anualidad y la segunda se encuentra todavía en curso, cabe destacar que se han publicado 3 artículos que cumplen con los criterios de inclusión. Con todo ello, se podría afirmar que existe un aumento de interés y preocupación por generar conocimiento y arrojar luz sobre las partes aún desconocidas dentro de este campo de estudio.

Así pues, en la Tabla 5 se muestran los artículos empleados en el presente estudio, donde se muestran los autores, el título de cada publicación, la revista donde ha sido publicado y el año de dicha publicación.

Tabla 5. Autores, título, revista y año de publicación de los artículos incluidos en este estudio.

Autor/es	Título	Revista	Año
Arrebola, M.L.; Socorro, O.; Barcelo-Munoz, A.; Simon-Perez, E.; Plielgo-Alfaro, F.	Micropropagation of <i>S. obovata</i> Lag.	Hort Science	1997
Güllüce, M.; Sökmen, M.; Daferera, D.; Açar, G.; Özkan, H.; Kartal, N.; Polissiou, M.; Sökmen, A.; Şahin, F.	In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of <i>Satureja hortensis</i> L.	Journal of Agricultural and Food Chemistry	2003
Tepe, Bektas; Sokmen, Atalay	Production and optimisation of rosmarinic acid by <i>Satureja hortensis</i> L. callus cultures	Natural Product Research	
Ramak, Parvin; Sharifi, Mozafar Osaloo, Shahrokh Kazempour Ebrahimzadeh, Hassan Behmanesh, Mehrdad	Studies on seed germination and in vitro shoot multiplication of <i>Satureja khuzistanica</i> Jamzad, an important medicinal plant	African Journal of Biotechnology	2011
Pistelli, Laura; Noccioli, Cecilia D'Angiolillo, Francesca Pistelli, Luisa	Composition of volatile in micropropagated and field grown aromatic plants from tuscan islands	Acta Biochimica Polonica	2013

Autor/es	Título	Revista	Año
Torres-martínez, Rafael; Bello-gonzález, Miguel Ángel Molina-torres, Jorge Ramírez-chávez, Enrique García-rodríguez, Yolanda Fulgencio-negrete, Rodolfo García-hernández, Alejandra López-gómez, Rodolfo Martínez-pacheco, Mauro Manuel Nieves, Blanca Chávez, Lara	Effect of fertilization on growth and the content of volatile compounds of <i>Satureja macrostema</i> (Benth) Briq .	Revista Mexicana de Ciencias Forestales	2013
Navroski, M. C.I.; Waldow, D. A.G. Reiniger, L. R.S. Golle, D. P. Curti, A. R. Pereira, M. O.	Multiplicação in vitro de segmentos apicais caulinares de segurelha (<i>Satureja hortensis</i> L.)	Revista Brasileira de Plantas Mediciniais	2014
Sahraroo, Amir; Babalar, Mesbah Mirjalili, Mohammad Hossein Moghaddam, Mohammad Reza Fattahi Ebrahimi, Samad Nejad	In-vitro callus induction and rosmarinic acid quantification in Callus culture of <i>Satureja khuzistanica</i> Jamzad (Lamiaceae)	Iranian Journal of Pharmaceutical Research	2014
Karimi, Naser; Ghasmpour, Hamid Reza; Yari, Mozghan	Effect of Different Growth Regulators on Callus Induction and Plant Regeneration of <i>Satureja</i> species	Annual Research & Review in Biology	2014
Teshome, Shiferaw; Soromessa, Teshome	In Vitro Propagation of <i>Satureja Abyssinica</i> (Benth) Briq – A Valuable Medicinal Plant	Advances in Life Science and Technology	2015
Ghorbanpour, Mansour	Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant <i>Satureja khuzestanica</i> grown in vitro	Carbon	2015
Mozafari, Ali Akbar; Vafaei, Yavar Karami, Edris	In vitro propagation and conservation of <i>Satureja avromanica</i> Maroofi—an indigenous threatened medicinal plant of Iran	Physiology and Molecular Biology of Plants	2015

Autor/es	Título	Revista	Año
Teshome, Indrias; Teshome, Shiferaw Soromessa, Teshome Feyissa, Tileye	Development of an efficient in vitro propagation protocol for <i>Satureja punctata</i> – A rare aromatic and medicinal plant	Taiwania	2016
Sahraroo, Amir; Mirjalili, Hossein Mohammad Corchete, Purificación Babalar, Mesbah Fattahi Moghadam, Mohammad Reza	Establishment and characterization of a <i>Satureja khuzistanica</i> Jamzad (Lamiaceae) cell suspension culture: a new in vitro source of rosmarinic acid	Cytotechnology	2016
Khojasteh, Abbas; Mirjalili, Hossein Mohammad Palazon, Javier Eibl, Regine Cusido, Rosa M.	Methyl jasmonate enhanced production of rosmarinic acid in cell cultures of <i>Satureja khuzistanica</i> in a bioreactor	Engineering in Life Sciences	2016
Ghaffarzadeh-Namazi, Leila; Keller, E. R. Joachim Senula, Angelica Babaeian, Nadali	Investigations on various methods for cryopreservation of callus of the medicinal plant <i>Satureja spicigera</i>	Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants	2017
Teshome, Shiferaw; Soromessa, Teshome; Feyissa, Tileye	In vitro propagation of a threatened medicinal plant <i>Satureja abyssinica</i> through nodal explants – Antimicrobial and antifungal herb	International Journal of BioSciences and Technology	2017
Shariat, Anahita; Karimzadeh, Ghasem Assareh, Mohammad Hassan Hadian, Javad	Metabolite profiling and molecular responses in a drought-tolerant savory, <i>Satureja rechingeri</i> exposed to water deficit	3 Biotech	2018
Mirjani, Leila; Salimi, Azam Matinizadeh, Mohammad Razavi, Khadijeh Shahbazi, Maryam	Biotization with <i>Glomus fasciculatum</i> to enhance the acclimatization and absorption of nutrients by micropropagated savory (<i>Satureja Khuzistanica</i> Jamzad) plantlets	Journal of Elementology	2018
Sahraroo, A.; Mirjalili, M. H. Corchete, P. Babalar, M. Fattahi-Moghadam, M. R. Zarei, A.	Enhancement of rosmarinic acid production by <i>Satureja khuzistanica</i> cell suspensions: Effects of phenylalanine and sucrose	Sabrao Journal of Breeding and Genetics	2018

Autor/es	Título	Revista	Año
Khojasteh, Abbas; Metón, Isidoro Camino, Sergio Cusido, Rosa M. Eibl, Regine Palazon, Javier	<i>In vitro</i> study of the anticancer effects of biotechnological extracts of the Endangered Plant species <i>Satureja khuzistanica</i>	International journal of molecular sciences	2019
Fatemi, Farzaneh; Abdollahi, Mohammad Reza Mirzaie-asl, Asghar Dastan, Dara Garagounis, Constantine Papadopoulou, Kalliope	Identification and expression profiling of rosmarinic acid biosynthetic genes from <i>Satureja khuzistanica</i> under carbon nanotubes and methyl jasmonate elicitation	Plant Cell, Tissue and Organ Culture	2019
Mirjani, Leila; Salimi, Azam Matinizadeh, Mohammad Razavi, Khadijeh Shahbazi, Maryam	The role of arbuscular mycorrhizal fungi on acclimatization of micropropagated plantlet <i>Satureja khuzistanica</i> Jam. by ameliorating of antioxidant activity and expression of PAL gene	Scientia Horticulturae	2019
Sarropoulou, Virginia; Maloupa, Eleni	<i>In vitro</i> propagation of <i>Satureja thymbra</i> L. (Lamiaceae): A valuable aromatic- medicinal native plant of the Mediterranean region	GSC Biological and Pharmaceutical Sciences	2019
Fatemi, Farzaneh; Abdollahi, Mohammad Reza Mirzaie-asl, Asghar Dastan, Dara Garagounis, Constantine Papadopoulou, Kalliope	Phytochemical, antioxidant, enzyme activity and antifungal properties of <i>Satureja khuzistanica</i> <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> explants stimulated by some chemical elicitors	Pharmaceutical Biology	2020
Ramak, Parvin; Ghanbari, Fardin Shayan, Amir Ali	Influence of sodium pyrophosphate on carvacrol biosynthesis in <i>Satureja khuzistanica</i> Jamzad, and its effects on antioxidant, cytotoxic and antibacterial activity against periodontal bacteria	Plant Cell, Tissue and Organ Culture	2020

Autor/es	Título	Revista	Año
Bektaş, Ersan	Changes in essential oil composition, phenylalanine ammonia lyase gene expression and rosmarinic acid content during shoot organogenesis in cytokinin-treated <i>Satureja spicigera</i> (C. Koch) boiss. shoots	Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology	2020
Bahmani, Helia; Maroufi, Asad Majdi, Mohammad Fakheri, Barat Ali	Thymol production in hairy root culture of Sahendian savory (<i>Satureja sahendica</i> Bornm)	Plant Biotechnology Reports	2021
Shariat, Anahita; Sefidkon, Fatemeh	Tetraploid induction in savory (<i>Satureja khuzistanica</i>): cytological, morphological, phytochemical and physiological changes	Plant Cell, Tissue and Organ Culture	2021
Khlebnikova, Darya A.; "Efanova, Evgeniya M. Danilova, Nina A. Shcherbakova, Yaroslava V. Sidorova, Irina Rivera"	Flavonoid Accumulation in an Aseptic Culture of Summer Savory (<i>Satureja hortensis</i> L.)	Plants	2022

4.2. Resultados analíticos

El objetivo de este estudio ha sido realizar una revisión sobre el estado del conocimiento actual de la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* en el género *Satureja*. Tras la realización de la búsqueda bibliográfica, se analizaron los estudios publicados en base al tipo de técnica realizada, el medio de cultivo empleado, los reguladores del crecimiento adicionados, así como de los parámetros ambientales más importantes del cultivo *in vitro* tales como la temperatura, fotoperiodo, pH e intensidad lumínica, y por último la localización geográfica.

Localización geográfica:

Se ha llevado a cabo un análisis geográfico de los estudios tal y como se muestra en la Figura 6, donde se marcan en verde los países en los que se han realizado los estudios. En concreto: Brasil (1), España (1), Etiopía (3), Grecia (1), Irán (18), Italia (1), México

(1), Rusia (1) y Turquía (3). Cabe destacar que la mayoría de las publicaciones han sido llevadas a cabo en Irán.

El hecho de que la mayoría de los estudios fueran realizados en Irán puede deberse a dos razones. En primer lugar, estas regiones la medicina tradicional está más presente en la sociedad que las habita. En concreto, en Irán la familia de las labiadas tiene una gran importancia debido a sus usos médicos tradicionales, propiedades aromáticas y culinarias, usos ornamentales y farmacología (Naghibi et al., 2005). En segundo lugar, podría deberse a que la especie endémica de Irán *S. khuzistanica* ha resultado ser una gran productora de ácido rosmarínico, por se está intento explotar de una manera industrial (Khojasteh et al., 2020).

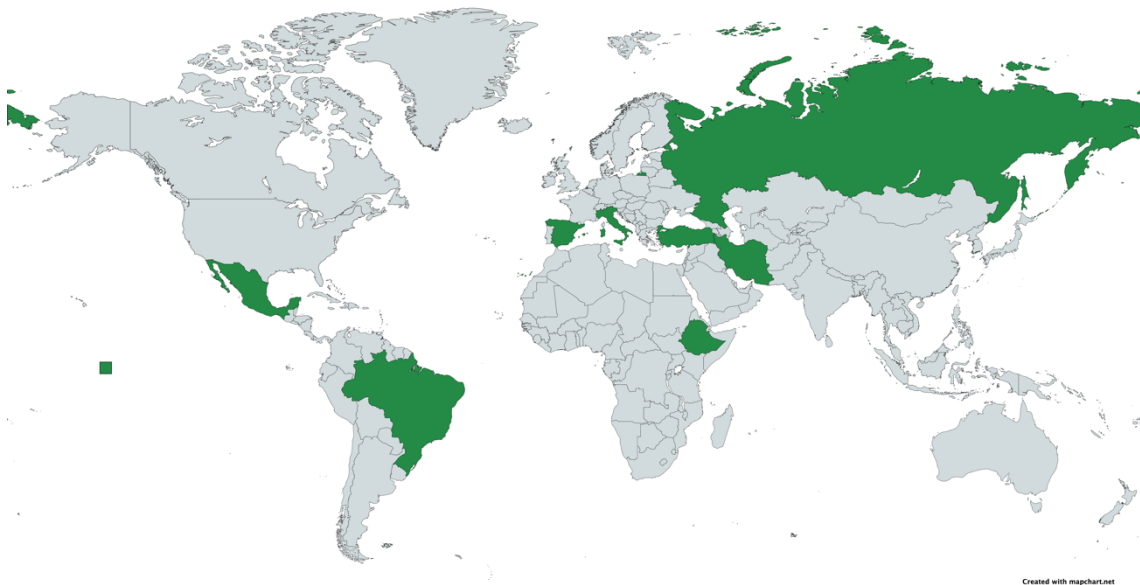


Figura 6. Localización geográfica de las investigaciones publicadas acerca del tema en estudio (países coloreados en verde).

Condiciones ambientales.

A continuación, en la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos del estudio llevado a cabo, donde se recoge la especie que se ha cultivado, la temperatura de cultivo, la intensidad lumínica y el fotoperiodo.

De entre de los parámetros ambientales que se controlan exhaustivamente en cultivo *in vitro*, el fotoperiodo es de gran importancia para asegurar el éxito del experimento (Moreno & Oropeza, 2017). En este estudio, de los 29 artículos que cumplían los

criterios de inclusión, 20 han empleado un fotoperiodo de 16:8, es decir, 16h de luz y 8h de oscuridad (Arrebola et al., 1997; Bahmani et al., 2021; Bektaş, 2020; Fatemi et al., 2019, 2020; Ghaffarzadeh-Namazi et al., 2017; Ghorbanpour & Hadian, 2015; Karimi et al., 2014; Khlebnikova et al., 2022; Mirjani et al., 2018, 2019; Mozafari et al., 2015; Navroski et al., 2014; Pistelli et al., 2013; Ramak et al., 2011, 2020; Sahraroo et al., 2014; Sarropoulou & Maloupa, 2019; I. Teshome et al., 2016; S. Teshome et al., 2017; S. Teshome & Soromessa, 2015) Esto se debe a que la plantas de verano, como lo son las especies del género *Satureja*, crecen mejor en fotoperiodos de luz de día largo, es decir, 16h de luz frente a 8h de oscuridad . Por otro lado, en 7 de las publicaciones revisadas se ha mantenido el cultivo en completa oscuridad (Bahmani et al., 2021; Fatemi et al., 2019; Güllüce et al., 2003; Khojasteh et al., 2016, 2019; Sahraroo et al., 2016; Tepe & Sokmen, 2007), hecho que se debe a que el cultivo de callos es considerablemente más eficaz en condiciones de plenas oscuridad que si se le expone a la luz (Adil et al., 2019). Por último, en 3 publicaciones del total, no se especificaba que tipo de fotoperiodo/exposición ha tenido el cultivo (Sahraroo et al., 2018; Shariat & Sefidkon, 2021; Torres-martínez et al., 2013).

Respecto a la temperatura empleada, tal y como se evidencia en la Tabla 6, los rangos empleados son de 21°C a 25°C, En este sentido, no ha sido posible extraer una correlación entre la temperatura empleada y la técnica de cultivo *in vitro* empleada, ya que se aplican temperaturas indiferentemente de la técnica de cultivo.

Tabla 6. Condiciones ambientales establecidas para el cultivo *in vitro* del género *Satureja* desde 1996 hasta 2025. Se muestra Especie, Temperatura (°C), Fotoperiodo, Intensidad lumínica.

Especie	Temperatura (°C)	Fotoperiodo	Intensidad Lumínica	Referencias
<i>Satureja obovata</i> Lag.	25 ± 1	16:8 (4 semanas)	Lámparas fluorescentes Gro-lux (45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	(Arrebola et al., 1997)
<i>Satureja hortensis</i>	25 ±2	Oscuridad (4 semanas)	-	(Güllüce et al., 2003)
<i>S. hortensis</i>	25	Oscuridad (8 semanas)	-	(Tepe & Sokmen, 2007)
<i>S. khuzistanica</i> Jamzad	25 ± 2	16:8 (6 semanas)	Tubos fluorescentes de color blanco frío (35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).	(Ramak et al., 2011)

Espece	Temperatura (°C)	Fotoperiodo	Intensidad Lumínica	Referencias
<i>S. hortensis</i>	22 ± 1	16:8 (4 semanas)	Tubos fluorescentes de color blanco frío (Philips TLM 40W/33RS) (80 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR)	(Pistelli et al., 2013)
<i>S. macrostema</i> (Benth) Briq.	-	-	-	(Torres-martínez et al., 2013)
<i>S. hortensis</i>	25 ± 2	16:8 (8,5 semanas)	Lámparas fluorescentes blancas de luz diurna de 20 W dispuestas a una distancia de 25 cm. (20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	(Navroski et al., 2014)
<i>S. khuzistanica</i>	25 ± 2	16:8 (4 semanas)	Lámparas fluorescentes de luz diurna fría (40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	(Sahraroo et al., 2014)
<i>S. avromanica</i> y <i>S. hortensis</i>	25 ± 1	16:8 (2 semanas)	Lámparas fluorescentes Gro-Lux de 1200 lux	(Karimi et al., 2014)
<i>S. abyssinica</i> (Benth.) Briq	25 ± 2	16:8 (4 semanas)	Tubos fluorescentes de color blanco frío (40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	(S. Teshome & Soromessa, 2015)
<i>S. khuzistanica</i>	25 ± 2	16:8 (3 semanas)	Lámparas fluorescentes (5) de color blanco frío, 75W (30–40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	(Ghorbanpour & Hadian, 2015)
<i>S. avromanica</i>	25 ± 1	16:8 (4,3 semanas)	40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	(Mozafari et al., 2015)
<i>S. khuzistanica</i> Jamzad	25	Oscuridad (3 semanas)	-	(Khojasteh et al., 2016)
<i>S. khuzistanica</i> Jamzad	23 ± 2	Oscuridad (4 semanas)	-	(Sahraroo et al., 2016)
<i>S. punctata</i>	25 ± 2	16:8 (4,3 semanas)	-	(I. Teshome et al., 2016)

Espece	Temperatura (°C)	Fotoperiodo	Intensidad Lumínica	Referencias
<i>S. spcigera</i>	25	16:8 (6 semanas)	-	Ghaffarzadeh 2017
<i>S. abyssinica</i> (Benth.) Briq	25 ± 2	16:8 (4 semanas)	Tubos fluorescentes de color blanco frío (40 µmol m ⁻² s ⁻¹)	(S. Teshome et al., 2017)
<i>S. khuzistanica</i> Jamzad	23 ± 2	Oscuridad (3 semanas)	-	(Sahraroo et al., 2018)
<i>S. khuzistanica</i> Jamzad	22 ± 3	16:8h	200 µm m ⁻² s ⁻¹	(Mirjani et al., 2018)
<i>S. khuzistanica</i> Jamzad	23 ± 3	16:8h	densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 12000 Lux	(Mirjani et al., 2019)
<i>S. thymbra</i>	22 ± 1	16:8 (5 semanas)	Tubos fluorescentes de color blanco frío (40 µmol m ⁻² s ⁻¹)	(Sarropoulou & Maloupa, 2019)
<i>S. khuzistanica</i> Jamzad	24 ± 2	16:8 (3 semanas); Oscuridad	-	(Fatemi et al., 2019)
<i>S. khuzistanica</i> Jamzad	25	Oscuridad (3 semanas)	-	(Khojasteh et al., 2019)
<i>S. spcigera</i> (C. Koch) boiss.	25 ± 1	16:8 (4,3 semanas)	Tubos fluorescentes de color blanco frío (50 µmol m ⁻² s ⁻¹)	(Bektaş, 2020)
<i>S. khuzistanica</i> Jamzad	25 ± 2	16:8 (3,6 semanas)	Tubos fluorescentes de color blanco frío (35 µmol m ⁻² s ⁻¹)	(Ramak et al., 2020)
<i>S. khuzistanica</i> Jamzad	24 ± 2	16:8 (2 semanas)	Tubos fluorescentes de color blanco frío (40 µmol m ⁻² s ⁻¹)	(Fatemi et al., 2020)
<i>S. sahendica</i> (Bornm)	25 ± 1	16:8 (3 semanas); Oscuridad 2, 3, 5 días	-	(Bahmani et al., 2021)
<i>S. khuzistanica</i> Jamzad	25	16:8 (4,3 semanas)	-	(Shariat & Sefidkon, 2021)

Especie	Temperatura (°C)	Fotoperiodo	Intensidad Lumínica	Referencias
<i>S. hortensis</i>	21 ± 2	16:8 (4 semanas)	Lámparas fluorescentes de 2500 Lux, 22 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 4000K OSRAM;	(Khlebnikova et al., 2022)

A continuación, se muestra la tabla 7, donde se recogen las especies de *Satureja* cultivadas, las técnicas de cultivo llevadas a cabo, los tipos de explantes empleados, medio de cultivo proporcionados a la planta, junto con los reguladores de crecimiento adicionados a la fórmula de cultivo y los posibles diferentes compuestos añadidos al medio de cultivo.

Tabla 7. Medios de cultivo empleados en el cultivo *in vitro* del género *Satureja*, reguladores de crecimiento adicionados (mg/L), otros elementos adicionados al medio, técnicas de cultivo, tipo de explantes clasificados por autor y especie.

Especie	Técnica	Explantos	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Otros compuestos	Referencias
<i>S. obovata</i> Lag.	Micropropagación	Segmentos nodales de juveniles; Segmentos nodales de adultos	MS	Test: BA (0; 0,128; 0,256; 0,5mg/L) 0,225 mg/L); Enraizamiento (test): AIB (0,28; 0,57 mg/L); Óptimo: BAP (0,256 mg/L) juveniles y AIB (0,57 mg/L) enraizamiento	-	(Arrebola et al., 1997)
<i>S. hortensis</i>	Callogénesis	Callo desde semilla	B5	AIB (1 mg/L) (No realiza estudio)	-	(Güllüce et al., 2003)
<i>S. hortensis</i>	Callogénesis	Callo desde semilla	50% MS, 50% B5	Test: AIB (1 mg/L) + BAP (5 mg/L); AIB (1 mg/L) + BAP (1 mg/L); Óptimo: AIB (1 mg/L) + BAP (5 mg/L) (más biomasa); AIB (1 mg/L) + BAP (1 mg/L) (más Ác. Rosmarínico)	-	(Tepe & Sokmen, 2007)

Espece	Técnica	Explantos	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Otros compuestos	Referencias
<i>S. khuzistanica</i> Jamzad	Micropropagación	Segmentos nodales de juveniles	LS	Test: BAP +KIN (0.05-0,2 mg/L); AIB (0,2 y 0,6 mg/L) + BAP (0,2 y 0,6 mg/L); Enraizamiento (test) AIA + ANA + AIB (0,288; 0,575; 1,15 mg/L); Óptimo: BAP +KIN (0,575; 0,2 mg/L), Enraizamiento: AIB (0,288 mg/L)	-	(Ramak et al., 2011)
<i>S. hortensis</i>	Micropropagación	Segmento nodal de planta adulta	MS	BAP (0,5 mg/L); Enraizamiento: AIB (0,5 mg/L) (No realiza estudio)	0.05% (v/v) "Plant preservative mixture" (PPM)	(Pistelli et al., 2013)
<i>S. macrostema</i> (Benth) Briq.	Micropropagación	Segmentos nodales de juveniles	MS	AIB (0,1 mg/L)	-	(Torres-martínez et al., 2013)
<i>S. hortensis</i>	Micropropagación	Segmentos apicales	MS	Test: ANA (0 y 0,12 mg/L); BAP (0; 0,58; 1,15; 1,72 y 2,3 mg/L); Enraizamiento (test): ANA (0,12 mg/L); Óptimo: brotes ANA (0,12 mg/L y BAP (1,72 y 2,3 mg/L), enraizamiento (ANA 0,12 mg/L)	100 mg/L de mioinositol	(Navroski et al., 2014)

Especie	Técnica	Explantos	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Otros compuestos	Referencias
<i>S. khuzistanica</i>	Callogénesis	Segmentos de brotes de planta joven	MS, B5	Brotos: BAP (2 mg/L); Callo: BAP o KIN (0, 1, 2, 5) + AIB (0,1; 1; 2 o 5); Óptimo: (1,0 mg/L) AIB (5,0 mg/L) BAP // (1,0 mg/L) AIB (1,0 mg/L) KIN	0,2 % (w/v) PVP; 20 mg/L L-Glutamina	(Sahraroo et al., 2014)
<i>S. avromanica</i> <i>S. hortensis</i> .	Callogénesis	Segmentos de hojas; callo de hipocótilo y hojas	MS	Test: callo = KIN (0,1; 1 2 mg/L) y 2,4-D (1 mg/L) para <i>S. hortensis</i> ; ANA (0,5 y 1,5 mg/L), BAP y 2,4-D (0,5 mg/L) para <i>S. Avromanica</i> ; brote = (1 mg/L) BAP + (0 mg/L) AIB, (1 mg/L) BAP + (0,1 mg/L) AIB y (1 mg/L) BAP + (1 mg/L) AIB; Óptimo: <i>S. hortensis</i> hipocótilo (1 mg/L) 2,4-D y (2 mg/L) KIN; (0,5 mg/L) 2,4-D, (0,5 mg/L) BAP y (0,5 mg/L) NAA hipocotilos <i>S. avromanica</i> . segmentos de hipocótilo de <i>S. avromanica</i> (1 mg/L) BAP y (1 mg/L) AIB	-	(Karimi et al., 2014)

Especie	Técnica	Explantos	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Otros compuestos	Referencias
<i>S. abyssinica</i> (Benth.) Briq	Micropropagación	Segmento nodal de plántula	MS; 1/2MS	Test: BAP o KIN (0,0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0 mg/L), y BAP + KIN y cada uno en combinación con 0,25 mg/L de ANA; Enraizamiento: AIB, ANA y AIA (0,0; 0,02; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mg/L); Óptimo: N° brote (1,25 mg/L) KIN, Altura de brote (0,5 mg/L) BAP, Raíz (2,0 mg/L) AIB, Longitud de raíz (1,0 mg/L) AIB, N° medio de enraizamiento (0,2 mg/L) ANA, y longitud media de la raíz (0,5 mg/L) AIA	-	(S. Teshome & Soromessa, 2015)
<i>S. khuzistanica</i>	Callogénesis	Segmento de raíz, tallo y hoja	B5	MWCNTs (0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750 y 1000 mg/L) (No realiza estudio)	-	(Ghorbanpour & Hadian, 2015)
<i>S. avromanica</i>	Micropropagación	Segmentos de brotes de planta joven	MS + WPM	Test: BAP y TDZ (0, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 5 y 10) por separado o BAP y TDZ (0, 2, 5 y 10 mg l ⁻¹) en combinación con AIB y 2,4-D (0, 0.1, 0.5 y 1); Óptimo: número medio de brotes (2 mg/L)	-	(Mozafari et al., 2015)

Espece	Técnica	Explantos	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Otros compuestos	Referencias
				BAP, elongación de brotes (2 mg/L) TDZ y (5 mg/L) BAP brotes más largos. (0,1 mg/L) AIB enraizamiento.		
<i>S. khuzistanica</i>	Cultivo en suspensión	Suspensión celular a partir de callo	B5	Suspensión celular: BAP (5 mg/L) + AIB (1 mg/L); MeJA (11,5 mg/L)	20 (mg/L) L-glutamina, 200 (mg/L) hidrolizado de caseína,	(Khojasteh et al., 2016)
<i>S. khuzistanica</i>	Cultivo en suspensión	Suspensión celular a partir de callo	B5	Suspensión celular: B5 + BAP (5 mg/L) + AIB (1 mg/L)	(2 x10 ³ mg/L) polivinilpirrolidona (PVP), (20 mg/L) L-glutamina, (200 mg/L) hidrolizado de caseína,	(Sahraroo et al., 2016)
<i>S. punctata</i>	Micropropagación	Segmentos de brotes de planta joven	MS; 1/2MS	Test: BAP, KIN, AIB, AIA o ANA (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mg/L); Enraizamiento: AIB, AIA y ANA (0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2,5 mg/L); Óptimo: mayor número medio de	-	(I. Teshome et al., 2016)

Especie	Técnica	Explantos	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Otros compuestos	Referencias
				brotos (0,5 mg/L) BAP. BAP + NAA número medio de brotes. Los mejores reguladores de crecimiento en altura de brotes en medio libre (testigo). mayor número de raíces y longitud de raíz (1,0 mg/L) IBA.		
<i>S. spicigera</i>	Callogénesis	-	MS	2,4-D (0,5 mg/L), BAP (0,6 mg/L)	-	Ghaffarzadeh 2017
<i>S. abyssinica</i> (Benth.) Briq	Micropropagación	Segmentos nodales de juveniles	MS; 1/2MS	Segmentos nodales: BAP o KIN (0; 0,04; 0,8; 1; 1,25; 1,5; 1,8; 2 mg/L) o BAP (0,8; 1; 1,5; 2; 2,8, 3 mg/L) + KIN (0,5 mg/L); Enraizamiento: AIB, AIA, ANA (0; 0,4; 0,5; 1,0; 1,4; 2,0; 2,75; 3 mg/L); Óptimo: longitud del brote (1,0 mg/L) BAP. número de raíces (0.5 mg/L) IBA. Promedio de raíz más larga (1,4 mg/L) IBA	-	(S. Teshome et al., 2017)
<i>S. khuzistanica</i>	Cultivo en suspensión	Suspensión celular a partir de callo	B5	BAP (5 mg/L) + AIB (1 mg/L) (No realiza estudio)	L-glutamina (20 mg/L) hidrolizado de caseína (200 mg/L)	(Sahraroo et al., 2018)

Espece	Técnica	Explantos	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Otros compuestos	Referencias
<i>S. khuzistanica</i>	Micropropagación	Brotos del ápice y brotes axilares	MS	Segmentos nodales: BAP (0,5 mg/L) 2iP (0,3 mg/L) + AIB (0,1 mg/L): Enraizamiento: AIB (1 mg/L) + ANA (0,1 mg/L) (No realiza estudio)	-	(Mirjani et al., 2018)
<i>S. khuzistanica</i>	Micropropagación	Brotos del ápice y brotes axilares	MS	Segmentos nodales: BAP (0,5 mg/L) 2iP (0,3 mg/L) + AIB (0,1 mg/L): Enraizamiento: AIB (1 mg/L) + ANA (0,1 mg/L)	-	(Mirjani et al., 2019)
<i>S. thymbra</i>	Micropropagación	Segmentos de brotes de planta joven	MS, WPM	Segmentos nodales: BAP (0,5 mg/L); Enraizamiento: AIB solo (0,25; 0,5; 1 mg/L) y (0,25 mg/L) AIB + (ANA + AIA) en 2 concentraciones diferentes (0,25; 0,5 mg/L). ANA (0,1; 0,25; 0,5; 1 mg/L) solo y (0,25 mg/L) ANA + AIA (0,25; 0,5 mg/L). AIA (0,1; 0,25; 0,5; 1 mg/L) solo, (0,25; 0,5 mg/L) AIA con (0,25 mg/L) AIB o 0,25 mg/L ANA; Óptimo: (1 mg/L) AIB de mayor enraizamiento, (0,5 mg/L) NAA de máximo número de	-	(Sarropoulou & Maloupa, 2019)

Espece	Técnica	Explantos	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Otros compuestos	Referencias
				raíces, y (0,1 mg/L) AIA de mayor longitud de raíces.		
<i>S. khuzistanica</i>	Calogénesis, Cultivo en suspensión	Segmentos nodales desde callo	B5	Callo: MWCNTs (0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750 y 1000 mg/L); Suspensión celular: BAP (5 mg/L) + AIB (1 mg/L); Segmentos nodales (medio líquido): MS + BAP (2 mg/L)	L-glutamina (20 mg/L), hidrolizado de caseína (200 mg/L), 0.2% (w/v) polivinilpirrolidona (PVP)	(Fatemi et al., 2019)
<i>S. khuzistanica</i>	Cultivo en suspensión	Suspensión celular a partir de callo	B5	Suspensión celular: BAP (5 mg/L) + AIB (1 mg/L)	-	(Khojasteh et al., 2019)
<i>S. spicigera</i> (C. Koch) boiss.	Micropropagación	Segmentos nodales de juveniles	MS	Segmentos nodales: ZN y TDZ (0,25; 0,5; 1,0; 2; 4 mg/L); Óptimo: Nº nodos TDZ (0,25 mg/L), brotes TDZ (4 mg/L),	-	(Bektaş, 2020)

Especie	Técnica	Explantos	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Otros compuestos	Referencias
				elongación TDZ (0,25 mg/L), biomasa ZN (1 mg/L)		
<i>S. khuzistanica</i>	Micropropagación	Segmentos nodales	LS	BAP (2 mg/L)	NaPP	(Ramak et al., 2020)
<i>S. khuzistanica</i>	Micropropagación, Cultivo en suspensión	Segmentos nodales	MS; MS líquido	Segmentos nodales: BAP (2 mg/L); Suspensión celular: MWCNTs (0, 50, 100, 250 mg/L); (No realiza estudio); MejA (0, 50, 100, 250 mg/L)	0.2% (w/v) polivinilpirrolidona (PVP)	(Fatemi et al., 2020)
<i>S. sahendica</i> (Bornm)	Hairy root	Segmentos nodales	MS	Inducción de Hairy root: <i>A. rhizogenes</i> (ATCC 15834, LBA 9402 y A4)	-	(Bahmani et al., 2021)
<i>S. khuzistanica</i>	Micropropagación	Segmentos nodales	1/2 MS	2iP (0,3 mg/L), TDZ (0,1 mg/L), AIB (0,05 mg/L), BAP (0,5 mg/L), ANA (0,1 mg/L); Enraizamiento: AIB (1 mg/L), ANA (0,1 mg/L)	-	(Shariat & Sefidkon, 2021)
<i>S. hortensis</i>	Callogénesis	Segmentos nodales	MS	Callo: BAP (1 mg/L)		(Khlebnikova et al., 2022)

Medios de cultivo.

Tal y como se observa en la Tabla 7 los medios de cultivo empleados son: **MS (Murashige & Skoog, 1962)** (Arrebola et al., 1997; Bahmani et al., 2021; Bektaş, 2020; Fatemi et al., 2019, 2020; Ghaffarzadeh-Namazi et al., 2017; Ghorbanpour & Hadian, 2015; Karimi et al., 2014; Khlebnikova et al., 2022; Mirjani et al., 2018, 2019; Mozafari et al., 2015; Navroski et al., 2014; Pistelli et al., 2013; Sahraroo et al., 2014; Sarropoulou & Maloupa, 2019; Shariat & Sefidkon, 2021; Tepe & Sokmen, 2007; I. Teshome et al., 2016; S. Teshome et al., 2017; S. Teshome & Soromessa, 2015; Torres-martínez et al., 2013), **B5 (Gamborg et al., 1968)** (Fatemi et al., 2020; Ghorbanpour y Hadian, 2015; Güllüce et al., 2003; Khojasteh et al., 2016, 2019; Sahraroo et al., 2014, 2016, 2018; Tepe y Sokmen, 2007), **WPM (Lloyd & McGown, 1980)** (Mozafari et al., 2015; Sarropoulou & Maloupa, 2019) medio que se recomienda emplear para el cultivo de plantas leñosas (Phillips & Garda, 2019), y **LS (Linsmaier y Skoog, 1965)** (Ramak et al., 2011, 2020). Cuando se pretende establecer un nuevo protocolo para el cultivo de cultivos, lo más efectivo es emplear un medio basal universal, como los mencionados (MS, B5 y LS), y adicionarle las concentraciones de algún compuesto que se quiera estudiar (Saa & Elshahed, 2012).

Según (Phillips & Garda, 2019), el medio más empleado en el cultivo de tejidos vegetales es el MS, con un 82% del total de publicaciones revisadas por los autores. En segundo lugar, el medio más empleado es el WPM con un 6%, B5 con un 5%, y el medio LS se encuentra dentro del 7% junto con el resto de medio empleados. La Figura 7 ilustra el porcentaje de medios empleados en los artículos incluidos en este estudio. Si bien no coincide en valores numéricos con (Phillips & Garda, 2019), sí es cierto que el medio más empleados en el MS (61%) como cabía esperar, seguido del B5 con un 27%, con un valor alto en relación con los resultados expuestos en (Phillips & Garda, 2019), y WPM y LS coinciden con un 6% cada uno.

Cabe destacar que sabiendo que *Satureja* es un género de plantas leñosas (Shanaida et al., 2021), siendo WPM un medio formulado para el cultivo de este tipo de plantas (Lloyd & McGown, 1980; Phillips & Garda, 2019), solo en el 6% de las publicaciones analizadas en las que se lleva a cabo un cultivo *in vitro* de *Satureja*, se emplee WPM.

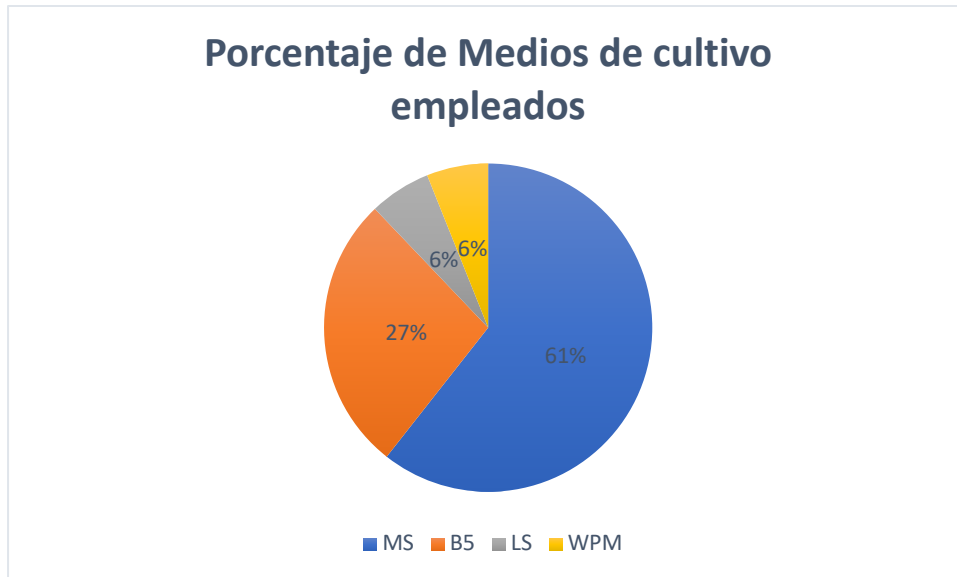


Figura 7. Porcentaje de medios de cultivo empleados las publicaciones seleccionadas para el presente trabajo. 61% MS, 27% B5, 6% WPM y 6% LS.

Reguladores del crecimiento.

Tal y como se ha mencionado previamente, en el cultivo *in vitro* se emplea un medio basal (MS, B5, LS y WPM los más comunes como se evidencia) al que se le añaden compuestos a concentraciones variables. En este sentido, los reguladores de crecimiento son las variables más efectivas, en concreto las auxinas y citoquininas (Saa & Elshahed, 2012).

En cuanto a las auxinas según (Phillips & Garda, 2019), ANA (15% de las citas) y AIB (9% de las citas) son las auxinas más utilizadas, seguidas por 2,4-D y AIA. Siendo ANA, AIB y AIA empleadas para la multiplicación de brotes y, especialmente, en las fases de enraizamiento. Respecto a las citoquininas, BAP es la más empleada (31% de las citas), seguida de KIN (7,5%). TDZ y 2-iP son menos citadas (4 % de las citas cada uno). Las citoquininas naturales como ZN son caras y menos estables químicamente que las versiones sintéticas, como BA. (Phillips & Garda, 2019).

De este modo, dentro del grupo de las **citoquininas**, se ha empleado **KIN, BAP, TDZ, ZN y 2iP**; (Arrebola et al., 1997; Bektaş, 2020; Fatemi et al., 2019, 2020; Ghaffarzadeh-Namazi et al., 2017; Güllüce et al., 2003; Karimi et al., 2014; Khlebnikova et al., 2022; Khojasteh et al., 2020, 2016; Mirjani et al., 2018, 2019; Mozafari et al., 2015; Navroski et al., 2014; Pistelli et al., 2013; Ramak et al., 2011, 2020; Sahrarou et al., 2014, 2016; Sarropoulou & Maloupa, 2019; Shariat & Sefidkon, 2021; Tepe & Sokmen, 2007; I.

Teshome et al., 2016; S. Teshome et al., 2017; S. Teshome & Soromessa, 2015); y dentro del grupo de las **auxinas AIA, BAI, ANA y 2,4-D** (Fatemi et al., 2020; Ghaffarzadeh-Namazi et al., 2017; Güllüce et al., 2003; Karimi et al., 2014; Khojasteh et al., 2016, 2019; Mirjani et al., 2018, 2019; Mozafari et al., 2015; Navroski et al., 2014; Pistelli et al., 2013; Ramak et al., 2011; Sahraroo et al., 2014, 2016, 2018; Sarropoulou & Maloupa, 2019; Shariat & Sefidkon, 2021; Tepe & Sokmen, 2007; I. Teshome et al., 2016; S. Teshome et al., 2017; S. Teshome & Soromessa, 2015; Torres-martínez et al., 2013). Por otro lado, determinados autores emplearon otro tipo de reguladores del crecimiento, como por ejemplo MWCN (*Multi-Walled Carbon Nanotubes*), un material basado en el carbono que tiene un efecto sobre el crecimiento de las plantas (Ghorbanpour & Hadian, 2015; Pérez-Hernández et al., 2020), o como es el caso de (Bahmani et al., 2021), el cual realiza un *Hairy Root Culture* de *S. sahendica* junto con *Agrobacterium rhizogenes*.

La Figura 8 representa el total de reguladores de crecimiento empleados en la publicaciones. Como se observa el más usado en BAP con un total de 23 publicaciones, le sigue AIB con 19, evidenciando que ambos son los más empleados (Phillips & Garda, 2019), y además que desde el tercero más usado, al segundo, hay un salto bastante grande.

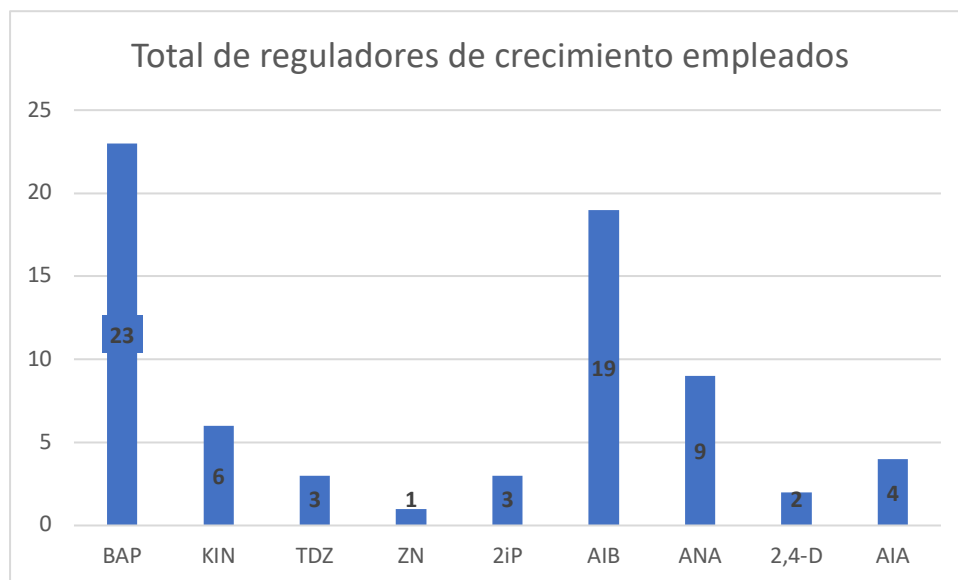


Figura 8. Total de reguladores del crecimiento empleados en las publicaciones.

Así mismo, tal y como se observa en la Tabla 7, las diferentes concentraciones empleadas y testadas en los diferentes estudios es considerablemente baja. Hoy en día el número de concentraciones comprobadas para el establecimiento de un protocolo de

cultivo es mayor (Bello et al., 2022) que las evidenciadas en este trabajo. De este modo, sería deseable que en futuras investigaciones se estudiara un rango mayor de concentraciones de reguladores del crecimiento. Además, es destacable que no se hayan empleado un regula las meta-topolinas, (6-(3-hidroxibencilamino)purina), ya que se están alcanzado la posición más popular y su uso en el cultivo de tejidos vegetales se está ampliando rápidamente. No solo han demostrado ser mejor citoquinina en la micropropagación, sino que también ayuda a aliviar diversos trastornos fisiológicos, el enraizamiento y la aclimatación de plantas generadas mediante cultivo de tejidos (Ahmad, 2021; Shaheen et al., 2022).

Cabe destacar que TDZ es más eficaz en plantas leñosas (Ahmad & Faisal, 2018; Ernst, 1994), sin embargo, en lo relativo al *Satureja* (leñoso), como se muestra en la tabla 7, sólo se emplea este regulador en tres ocasiones. En este sentido, (Phillips & Garda, 2019) evidencia que el 15% de las citas empleas ANA, sin embargo, en este estudio ocupa el tercer lugar por detrás de AIB y BAP.

Como se ha explicado anteriormente en este trabajo, las publicaciones revisadas emplean rangos de concentraciones de reguladores del crecimiento limitados, es decir, se utilizan pocas concentraciones de reguladores diferentes. En este sentido se debería de estudiar el cultivo de este género a unas concentraciones de reguladores del crecimiento más altas y de mayor variedad. Si bien se sabe que a bajas concentraciones tienen un efecto considerable, y que altas concentraciones puede ser inhibitorio, generaría conocimiento de gran calidad establecer unos parámetros estándar óptimos de concentraciones de estos reguladores (Small & Degenhardt, 2018).

Variación Somaclonal.

Dada la importancia de garantizar la fidelidad genética de los clones con respecto a la planta original, resulta especialmente interesante revisar si este tipo de estudios han sido acometidos en los trabajos publicados de micropropagación de *Satureja*. En la Tabla 8 se muestran las publicaciones que han empleado la micropropagación como técnica de cultivo de *Satureja*, y han realizado, además, un estudio de variación somaclonal.

Tabla 8. Clasificación de publicaciones en función del análisis de variación somaclonal (Sí/No).

Referencias		Estudio de la variación somaclonal
(Arrebola et al., 1997)	1997	No
(Ramak et al., 2011)	2011	No
(Pistelli et al., 2013)	2013	No
(Torres-martínez et al., 2013)	2013	No
Navroski et al., 2014)	2014	No
(S. Teshome & Soromessa, 2015)	2015	No
(Mozafari et al., 2015)	2015	Sí
(I. Teshome et al., 2016)	2016	No
(S. Teshome et al., 2017)	2017	No
(Shariat et al., 2018)	2018	No
(Mirjani et al., 2018)	2018	No
(Mirjani et al., 2019)	2019	No
(Sarropoulou & Maloupa, 2019)	2019	No
(Bektaş, 2020)	2020	Sí
(Ramak et al., 2020)	2020	No
(Fatemi et al., 2020)	2020	No
(Shariat & Sefidkon, 2021)	2021	No

Tal y como se evidencia en la tabla 8, únicamente se realiza análisis de variación somaclonal en un total de dos estudios, empleado el método descrito por (Williams et al., 1990) mediante RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Bektaş, 2020; Mozafari et al., 2015). Por lo tanto, sería deseable que cuando se tratase de un estudio donde se emplease la técnica de micropropagación se hiciera un estudio de variación somaclonal, con el fin garantizar una fidelidad genética de la nueva planta respecto de la planta original.

5. CONCLUSIONES.

A raíz de los resultados obtenidos en el presente Trabajo Fin de Grado, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- Se han publicado un total de 29 artículos relativos al objetivo principal del trabajo, de los cuales más del 90% han sido publicados en la última década.
- La mayoría de las publicaciones realizadas sobre el cultivo *in vitro* del género *Satureja* provienen del Irán, muy probablemente, debido al elevado interés etnofarmacológico y fitoquímico que presenta *S. khuzistanica*.
- Las técnicas de cultivo *in vitro* exploradas hasta la fecha en *Satureja* son: micropropagación, cultivo de callo y cultivo celular en suspensión, siendo la micropropagación la más empleada, seguida de cultivo de callo, cultivo celular en suspensión y finalmente
- Las condiciones ambientales empleadas para el cultivo *in vitro* han sido: temperatura comprendida entre 21°C y 25°C, fotoperiodo de 16 horas para micropropagación, y oscuridad completa para cultivo de callo y cultivo celular en suspensión.
- Los medios de cultivo más empleados en el cultivo *in vitro* del género *Satureja* son MS, B5, WPM y LS., siendo MS el mayoritario con un 61% de presencia, B5 con un 27% y tanto WPM como LS un 6%.
- Los reguladores de crecimiento más empleados han sido: ZN, 2,4-D, 2iP y TDZ, AIA, KIN, ANA, AIB y BAP. El más empleado ha sido BAP, apareciendo en el 79,3% de las publicaciones, seguido de AIB (65,5%), ANA (31%), KIN (20,7%), AIA (13,8%), TDZ y 2iP (10,3% cada uno), 2,4-D (6,9%) y ZN (3,4%).
- El estudio sobre la variación somaclonal de las plantas generadas mediante micropropagación, solo ha sido realizado en 2 de las 17 publicaciones totales que aplican la técnica de micropropagación

6. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Como resultado del análisis de la información contenida en la bibliografía revisada, se han detectado varias lagunas de conocimiento y, en relación a estas, se proponen las siguientes líneas futuras de investigación:

En primer lugar, cabe destacar que la investigación sobre este género en España es prácticamente nula en cuanto al cultivo *in vitro*, ya que solo se ha realizado un estudio frente a 18 realizados en Irán. Por este motivo sería deseable abrir líneas de investigación en la península, ya que es un género ampliamente distribuido en este país. Por lo tanto, se anima a la comunidad científica a llevar a cabo estudios acerca del cultivo *in vitro* del género *Satureja*.

En segundo lugar, dado el hecho comentado en la discusión, el cual evidencia que no se realizan estudios acerca de la variación somaclonal, con el fin de mantener una línea genética igual a la original, se insta a las futuras publicaciones a incluir este estudio, ya que genera nuevo conocimiento y asegura una fidelidad genética de la planta hija respecto de la madre.

Por otro lado, sabiendo que el medio WPM se emplea en plantas leñosas por su eficacia, sería deseable abrir nuevas líneas futuras en relación con este medio, ya que como se ha demostrado en esta revisión, solo se ha usado en el 6% de las publicaciones revisadas. Así mismo, durante los últimos años se han estado empleando las metatopolinas, una citoquinina que ha demostrado mejorar la micropropagación, ha disminuido trastornos fisiológicos, ha mejorado el enraizamiento y la aclimatación (Ahmad, 2021), y sin embargo, como se ha evidenciado en el presente trabajo, no se ha utilizado en *Satureja*. Por lo tanto, cómo línea futura de investigación sería interesante estudiar el efecto de este regulador del crecimiento en el género *Satureja*.

Por último, en relación a los reguladores de crecimiento, teniendo en cuenta los estrechos intervalos de concentraciones de estos que son testados en las publicaciones revisadas, sería de un gran aporte científico ampliar dicho intervalos, con el fin de obtener un protocolo óptimo de cultivo *in vitro* de este género.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdali, E., Javadi, S., Akhgari, M., & Hosseini, S. (2017). Chemical composition and biological properties of *Satureja avromanica* Maroofi. *Journal of Food Science and Technology*, 54(3), 727-734. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2512-0>
- Adil, M., Ren, X., & Jeong, B. R. (2019). Light elicited growth, antioxidant enzymes activities and production of medicinal compounds in callus culture of *Cnidium officinale* Makino. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 196(March), 111509. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.05.006>
- Ahmad, N. (2021). Meta-topolin: A Growth Regulator for Plant Biotechnology and Agriculture. En *Meta-topolin: A Growth Regulator for Plant Biotechnology and Agriculture*. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-9046-7>
- Ahmad, N., & Faisal, M. (2018). Thidiazuron: From urea derivative to plant growth regulator. En *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3>
- Arrebola, M. L., Socorro, O., Barcelo-Munoz, A., Simon-Perez, E., & Plielgo-Alfaro, F. (1997). Micropropagation of *S.obovata* Lag. *Hort Science*, 32(7), 1278-1280.
- Babajafari, S., Nikaein, F., & Mazloomi, S. M. (2015). A Review of the Benefits of *Satureja* Species on Metabolic Syndrome and Their Possible Mechanisms of Action. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 20(3), 212-223. <https://doi.org/10.1177/2156587214564188>
- Bahmani, H., Maroufi, A., Majdi, M., & Fakheri, B. A. (2021). Thymol production in hairy root culture of Sahendian savory (*Satureja sahendica* Bornm). *Plant Biotechnology Reports*, 15(2), 177-186. <https://doi.org/10.1007/s11816-021-00672-7>
- Bektaş, E. (2020). Changes in essential oil composition, phenylalanine ammonia lyase gene expression and rosmarinic acid content during shoot organogenesis in cytokinin-treated *Satureja spicigera* (C. Koch) boiss. shoots. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 29(3), 450-460. <https://doi.org/10.1007/s13562-020-00552-1>
- Bello, A. M., Aliabad, K. K., Saravi, A. T., & Zade, H. S. (2022). Determination of the Best Culture Medium and Plant Growth Regulators for Micropropagation of Neem Tree (*Azadirachta indica* A.Juss). *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 9(2), 237-245. <https://doi.org/10.22059/ijhst.2021.322456.463>
- Benson, E. E. (1996). Cryopreservation. Plant cell culture. A practical approach. London: Oxford University Press.
- Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., & Bera, T. (2015). Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences. *Modern Applications of Plant*

- Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, January, 1-439.
<https://doi.org/10.1016/c2014-0-02123-5>
- Chianetta, R., Sachinidis, A., Nikolic, D., Luzzu, L. M., Stoian, A. P., Toth, P. P., & Rizzo, M. (2021). Nutraceuticals and Cardiovascular Disease. En M. R. A. F.G. Cicero (Ed.), *Contemporary Cardiology* (pp. 67-87). Springer Nature Switzerland AG.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-62632-7_5
- D, T. S. P. M., Rastegarpanah, M., & Ph, D. (2011). Review article Antioxidants and infertility treatment , the role of Satureja Khuzestanica : A mini-systematic review. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 9(2), 61-70.
- Davoodi, M., & Nejad-ebrahimi, S. (2022). The chemical composition and antibacterial activity of a methanolic extract of Satureja khuzistanica. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58, 1-18. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902022e19233>
- Dodoš, T., Janković, S., Marin, P. D., & Rajčević, N. (2021). Essential oil composition and micromorphological traits of satureja montana l., s. subspicata bartel ex vis., and s. kitaibelii wierzb. ex heuff. plant organs. *Plants*, 10(3), 1-15.
<https://doi.org/10.3390/plants10030511>
- Doroszenko, A. (1986). *Taxonomic studies on the Satureja complex (Labiatae)*.
- Durmić-pâsić, A., Čakar, J., Pojskić, N., Bogunić, F., Lasić, L., Ahatović, A., Dorić, S., & Bajrović, K. (2019). Population genetic structure of Satureja subspicata bartl. ex vis. (Lamiaceae) in central dinaric alps and its relevance for DNA barcodings strategies. *Pakistan Journal of Botany*, 51(3), 923-932. [https://doi.org/10.30848/PJB2019-3\(35\)](https://doi.org/10.30848/PJB2019-3(35))
- Ernst, R. (1994). Effects of thidiazuron on in vitro propagation of Phalaenopsis and Doritaenopsis (Orchidaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39(3), 273-275.
<https://doi.org/10.1007/BF00035982>
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1-18.
<https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- (Euro+Med (2006-): Euro+Med PlantBase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. Published on the Internet
<http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/> [17/08/2021].
- Fatemi, F., Abdollahi, M. R., Mirzaie-asl, A., Dastan, D., Garagounis, C., & Papadopoulou, K. (2019). Identification and expression profiling of rosmarinic acid biosynthetic genes from Satureja khuzistanica under carbon nanotubes and methyl jasmonate elicitation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 136(3), 561-573.
<https://doi.org/10.1007/s11240-018-01537-8>

- Fatemi, F., Abdollahi, M. R., Mirzaie-asl, A., Dastan, D., & Papadopoulou, K. (2020). Phytochemical, antioxidant, enzyme activity and antifungal properties of *Satureja khuzistanica* in vitro and in vivo explants stimulated by some chemical elicitors. *Pharmaceutical Biology*, 58(1), 286-296. <https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1743324>
- Fierascu, I., Dinu-Pirvu, C. E., Fierascu, R. C., Velescu, B. S., Anuta, V., Ortan, A., & Jinga, V. (2018). Phytochemical profile and biological activities of *satureja hortensis* L.: A review of the last decade. *Molecules*, 23(10), 1-19. <https://doi.org/10.3390/molecules23102458>
- Gago, J., Pérez-tornero, O., Landín, M., Burgos, L., & Gallego, P. P. (2011). Improving knowledge of plant tissue culture and media formulation by neurofuzzy logic: A practical case of data mining using apricot databases. *Journal of Plant Physiology*, 168(15), 1858-1865. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.04.008>
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). NUTRIENT REQUIREMENTS OF SOYBEAN OF SUSPENSION. *Experimental Cell Research*, 50(9901), 151-158.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 32, 272–289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02822700>
- Ghaffarzadeh-Namazi, L., Keller, E. R. J., Senula, A., & Babaeian, N. (2017). Investigations on various methods for cryopreservation of callus of the medicinal plant *Satureja spicigera*. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 5, 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.09.003>
- Ghorbanpour, M., & Hadian, J. (2015). Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown in vitro. *Carbon*, 94, 749-759. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.07.056>
- Güllüce, M., Sökmen, M., Daferera, D., Açar, G., Özkan, H., Kartal, N., Polissiou, M., Sökmen, A., & Şahin, F. (2003). In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 3958-3965. <https://doi.org/10.1021/jf0340308>
- Hamidpour, R., Hamidpour, S., Hamidpour, M., Shahlari, M., & Sohraby, M. (2014). Summer savory: From the selection of traditional applications to the novel effect in relief, prevention, and treatment of a number of serious illnesses such as diabetes, cardiovascular disease, Alzheimer's disease, and cancer. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 4(3), 140-144. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.136540>

- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazier, H., & Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. En A. R. Leva & L. M. R. (Eds.), *Recent Advances in Plant Tissue Culture* (pp. 1-28). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/50568>
- Jafari, F., Ghavidel, F., & Zarshenas, M. M. (2016). A Critical Overview on the Pharmacological and Clinical Aspects of Popular Satureja Species. *JAMS Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 9(3), 118-127. <https://doi.org/10.1016/j.jams.2016.04.003>
- Juan-Vicedo, J., Francisco, S.-M., Cano-Castillo, M., & Casas, J. L. (2022). In Vitro Propagation, Genetic Assessment, and Medium-Term Conservation of the Coastal Endangered Species *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Cupressaceae) from Adult Trees. *Plants*, 11(187). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/plants11020187>
- Karimi, N., Ghasmpour, H. R., & Yari, M. (2014). Effect of Different Growth Regulators on Callus Induction and Plant Regeneration of Satureja species. *Annual Research & Review in Biology*, 4(16), 2646-2654.
- Khaledi, A., Meskini, & Maryam. (2020). A Systematic Review of the Effects of Satureja Khuzestanica Jamzad and Zataria Multiflora Boiss against Pseudomonas Aeruginosa. *Iran J Med Sci*, 45(2), 83-90. <https://doi.org/10.30476/IJMS.2019.72570.What>
- Khlebnikova, D. A., Efanova, E. M., Danilova, N. A., Shcherbakova, Y. V., & Sidorova, I. R. (2022). Flavonoid Accumulation in an Aseptic Culture of Summer Savory (*Satureja hortensis* L.). *Plants*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/plants11040533>
- Khojasteh, A., Metón, I., Camino, S., Cusido, R. M., Eibl, R., & Palazon, J. (2019). In Vitro Study of the Anticancer Effects of Biotechnological Extracts of the Endangered Plant Species Satureja Khuzistanica. *International journal of molecular sciences*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/ijms20102400>
- Khojasteh, A., Mirjalili, M. H., Alcalde, M. A., Cusido, R. M., Eibl, R., & Palazon, J. (2020). Powerful plant antioxidants: A new biosustainable approach to the production of rosmarinic acid. *Antioxidants*, 9(12), 1-31. <https://doi.org/10.3390/antiox9121273>
- Khojasteh, A., Mirjalili, M. H., Palazon, J., Eibl, R., & Cusido, R. M. (2016). Methyl jasmonate enhanced production of rosmarinic acid in cell cultures of Satureja khuzistanica in a bioreactor. *Engineering in Life Sciences*, 16(8), 740-749. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600064>
- Leal, F., Taghouti, M., Nunes, F., Silva, A., Coelho, A. C., & Matos, M. (2017). Thymus Plants: A Review—Micropropagation, Molecular and Antifungal Activity. *Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants*, March. <https://doi.org/10.5772/66623>

- Leva, A. R., Petruccelli, R., & Rinaldi, L. M. R. (2012). Somaclonal Variation in Tissue Culture: A Case Study with Olive. En A. R. Leva & L. M. R. (Eds.), *Recent Advances in Plant Tissue Culture* (pp. 123-150). <https://doi.org/10.3747/co.25.3884>
- Linsmaier, E. M., & Skoog, F. (1965). Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 18(1), 100-127. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1965.tb06874.x>
- Lloyd, G., & McGown, B. (1980). Commercially-Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by Use of Shoot-Tip Culture. *Proceedings of the International Plant Propagators' Society*, 30, 421-427.
- Mirjani, L., Salimi, A., Matinizadeh, M., Razavi, K., & Shahbazi, M. (2018). Biotization with *glomus fasciculatum* to enhance the acclimatization and absorption of nutrients by micropropagated savory (*Satureja Khuzistanica Jamzad*) plantlets. *Journal of Elementology*, 24(2), 785-802. <https://doi.org/10.5601/jelem.2018.23.4.1681>
- Mirjani, L., Salimi, A., Matinizadeh, M., Razavi, K., & Shahbazi, M. (2019). The role of arbuscular mycorrhizal fungi on acclimatization of micropropagated plantlet *Satureja khuzistanica* Jam. by ameliorating of antioxidant activity and expression of PAL gene. *Scientia Horticulturae*, 253(April), 364-370. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.060>
- Momtaz, S., & Abdollahi, M. (2008). A Systematic Review of the Biological Activities of *Satureja L . Species*. *Pharmacologyonline*, 54, 34-54.
- Monfort, L. E. F., Bertolucci, S. K. V., Lima, A. F., de Carvalho, A. A., Mohammed, A., Blank, A. F., & Pinto, J. E. B. P. (2018). Effects of plant growth regulators, different culture media and strength MS on production of volatile fraction composition in shoot cultures of *Ocimum basilicum*. *Industrial Crops and Products*, 116(December 2016), 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.075>
- Morales-Rubio, M. E., Espinosa-Leal, C., & Garza-Padrón, R. A. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. *Investigación en plantas de importancia médica*, 351-410. <https://doi.org/10.3926/oms.315>
- Moreno, M., & Oropeza, M. (2017). Efecto de las hormonas vegetales y el fotoperiodo en la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum L.*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 29-38. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.69499>
- Moscatiello, R., Baldan, B., & Navazio, L. (2013). Plant Cell Suspension Cultures. En F. Maathuis (Ed.), *Plant Mineral Nutrients. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, (pp. 77-93). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-62703-152-3_5
- Mozafari, A. A., Vafae, Y., & Karami, E. (2015). In vitro propagation and conservation

- of *Satureja avromanica* Maroofi—an indigenous threatened medicinal plant of Iran. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 21(3), 433-439. <https://doi.org/10.1007/s12298-015-0313-3>
- Mulas, M. (2006). Traditional uses of Labiatae in the Mediterranean area. *Acta Horticulturae*, 723, 25-32. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.723.1>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Naghibi, F., Mosaddegh, M., Motamed, S. M., & Ghorbani, A. (2005). Labiatae family in folk medicine in Iran: From ethnobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 4(2), 63-79. <https://doi.org/10.22037/IJPR.2010.619>
- Navarro-Rocha, J., Andrés, M. F., Díaz, C. E., Burillo, J., & González-Coloma, A. (2020). Composition and biocidal properties of essential oil from pre-domesticated Spanish *Satureja Montana*. *Industrial Crops and Products*, 145(March), 111958. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111958>
- Navroski, M. C. I., Waldow, D. A. G., Reiniger, L. R. S., Golle, D. P., Curti, A. R., & Pereira, M. O. (2014). Multiplicação in vitro de segmentos apicais caulinares de segurelha (*Satureja hortensis* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16(1), 117-121. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722014000100017>
- Ono, N. N., & Tian, L. (2011). Plant Science The multiplicity of hairy root cultures : Prolific possibilities. *Plant Science*, 180(3), 439-446. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.012>
- Pérez-Hernández, H., Gabriela, M.-P., Ileana, V.-R., Carmine, F., López-Valedz, F., Miranda-Arámbila, M., Citlali, P.-R., & Fabián, F.-L. (2020). Carbon Nanotubes as Plant Growth Regulators: Prospects. En E. Campos (Ed.), *Green Nanoparticles* (pp. 77-115). Springer, Cham. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-39246-8_4
- Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 55, 242-257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>
- Pistelli, L., Noccioli, C., D'Angiolillo, F., & Pistelli, L. (2013). Composition of volatile in micropropagated and field grown aromatic plants from tuscan islands. *Acta Biochimica Polonica*, 60(1), 43-50. https://doi.org/10.18388/abp.2013_1949
- Ramak, P., Ghanbari, F., & Shayan, A. A. (2020). Influence of sodium pyrophosphate on carvacrol biosynthesis in *Satureja khuzistanica* Jamzad, and its effects on antioxidant, cytotoxic and antibacterial activity against periodontal bacteria. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 141(2), 361-370. <https://doi.org/10.1007/s11240->

020-01792-8

- Ramak, P., Sharifi, M., Osaloo, S. K., Ebrahimzadeh, H., & Behmanesh, M. (2011). Studies on seed germination and in vitro shoot multiplication of *Satureja khuzistanica* Jamzad, an important medicinal plant. *African Journal of Biotechnology*, 10(83), 19407-19414. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1311>
- Roberts, A. V., & Schum, A. (2003). Cell, tissue and organ culture. En A. Roberts, T. Debener, & S. Gudin (Eds.), *Encyclopedia of Rose Science* (1st ed., pp. 57-66). Elsevier Ltd.
- Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Flann C., Bailly N., Kirk P., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., eds. (2016). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2016 Annual Checklist. Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2016. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-884X.
- Saa, A. I. M., & Elshahed, A. M. (2012). Plant Tissue Culture Media. En A. R. Leva & L. M. R. (Eds.), *Recent Advances in Plant Tissue Culture* (pp. 29-40). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/50569>
- Saeidnia, S., Gohari, A. R., Manayi, A., & Kourepaz-Mahmoodabadi, M. (2016). *Satureja Ethnomedicine, Phytochemical Diversity and Pharmacological Activities*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25026-7>
- Sahraroo, A., Babalar, M., Mirjalili, M. H., Moghaddam, M. R. F., & Ebrahimi, S. N. (2014). In-vitro callus induction and rosmarinic acid quantification in Callus culture of *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(4), 1445-1454. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2014.1570>
- Sahraroo, A., Mirjalili, M. H., Corchete, P., Babalar, M., Fattahi-Moghadam, M. R., & Zarei, A. (2018). Enhancement of rosmarinic acid production by *satureja khuzistanica* cell suspensions: Effects of phenylalanine and sucrose. *Sabrao Journal of Breeding and Genetics*, 50(1), 25-35.
- Sahraroo, A., Mirjalili, M. H., Corchete, P., Babalar, M., & Fattahi Moghadam, M. R. (2016). Establishment and characterization of a *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae) cell suspension culture: a new in vitro source of rosmarinic acid. *Cytotechnology*, 68(4), 1415-1424. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9901-x>
- Sarropoulou, V., & Maloupa, E. (2019). In vitro propagation of *Satureja thymbra* L. (Lamiaceae): A valuable aromatic- medicinal native plant of the Mediterranean region. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 09(02), 9-20. <https://doi.org/https://doi.org/10.30574/gscbps.2019.9.2.0190> Abstract
- Sefidkon, F., & Emami Bistgani, Z. (2021). Integrative review on ethnobotany, essential oil, phytochemical, agronomy, molecular and pharmacological properties of *Satureja* species. *Journal of Essential Oil Research*, 33(2), 114-132.

- <https://doi.org/10.1080/10412905.2021.1885512>
- Shaheen, A., Dewir, Y. H., Kher, M., Khan, M., El-Banna, A. N., & Alaizari, A. (2022). Synergistic effect of benzylaminopurine and meta-Topolin combination for micropropagation of gerbera 'Pink Melody'. *Ciencia e Agrotecnologia*, 46, 1-9. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202246017521>
- Shanaida, M., Jasicka-Misiak, I., & Wieczorek, P. P. (2021). Chromatographic analysis of polyphenols in the satureja hortensis L. (lamiaceae martinov) herb. *Pharmacologyonline*, 2, 1337-1345.
- Shariat, A., Karimzadeh, G., Assareh, M. H., & Hadian, J. (2018). Metabolite profiling and molecular responses in a drought-tolerant savory, Satureja rechingeri exposed to water deficit. *3 Biotech*, 8(11), 0. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1491-9>
- Shariat, A., & Sefidkon, F. (2021). Tetraploid induction in savory (Satureja khuzistanica): cytological, morphological, phytochemical and physiological changes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 146(1), 137-148. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02053-y>
- Small, C. C., & Degenhardt, D. (2018). Plant growth regulators for enhancing revegetation success in reclamation: A review. *Ecological Engineering*, 118(April), 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.04.010>
- Tepe, B., & Sokmen, A. (2007). Production and optimisation of rosmarinic acid by Satureja hortensis L. callus cultures. *Natural Product Research*, 21(13), 1133-1144. <https://doi.org/10.1080/14786410601130737>
- Teshome, I., Teshome, S., Soromessa, T., & Feyissa, T. (2016). Development of an efficient in vitro propagation protocol for satureja punctata – A rare aromatic and medicinal plant. *Taiwania*, 61(1), 41-48. <https://doi.org/10.6165/tai.2015.61.41>
- Teshome, S., & Soromessa, T. (2015). In Vitro Propagation of Satureja Abyssinica (Benth .) Briq . – A Valuable Medicinal Plant. *Advances in Life Science and Technology*, 34, 100-110.
- Teshome, S., Soromessa, T., & Feyissa, T. (2017). In vitro propagation of a threatened medicinal plant Satureja abyssinica through nodal explants – Antimicrobial and antifungal herb. *International Journal of BioSciences and Technology*, 10(3), 20-25.
- Torres-martínez, R., Bello-gonzález, M. Á., Molina-torres, J., Ramírez-chávez, E., García-rodríguez, Y., Fulgencio-negrete, R., García-hernández, A., López-gómez, R., Martínez-pacheco, M. M., Nieves, B., & Chávez, L. (2013). EFFECT OF FERTILIZATION ON GROWTH AND THE CONTENT OF VOLATILE COMPOUNDS OF Satureja macrostema (Benth) Briq . *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 5(21), 122-134.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA

polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531-6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>

Zhao, F., Chen, Y. P., Salmaki, Y., Drew, B. T., Wilson, T. C., Scheen, A. C., Celep, F., Bräuchler, C., Bendiksby, M., Wang, Q., Min, D. Z., Peng, H., Olmstead, R. G., Li, B., & Xiang, C. L. (2021). An updated tribal classification of Lamiaceae based on plastome phylogenomics. *BMC Biology*, 19(1), 1-27. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00931-z>