



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Propagación *in vitro* de plantas del género
Mentha spp., a partir de segmentos nodales

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA AGRÍCOLA

PRESENTA:

OLGA ELIZABETH FUENTES CADENA

ASESORA: M.C. LAURA VIRGINIA NUÑEZ BALDERAS



CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX. 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTO **APROBATORIO**

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de DEPARTAMENTO DE CUAUTITLÁN.
EXAMENES PROFESIONALES



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Propagación in vitro de plantas del género Mentha spp., a partir de segmentos nodales

Que presenta la pasante: OLGA ELIZABETH FUENTES CADENA

Con número de cuenta: 31103493-4 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Septiembre de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Rosa Navarrete Maya	
VOCAL	M. en E. Elva Martínez Holguín	
SECRETARIO	M. en C. Laura Virginia Nuñez Balderas	
1er. SUPLENTE	M. en C. Alfonsina Judith Hernández	
2do. SUPLENTE	Biol. María Victoria Hernández Pimentel	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/ntm*

DEDICATORIA

A mi mamá, que siempre confió en mí y me enseñó que sin importar cuanto duela perder podremos recuperarnos, porque el amor en nuestra familia es tan fuerte que nos impulsará a llegar tan lejos como soñemos.

AGRADECIMIENTOS

A Liz, Kenia y Pablo, por ser mis mejores amigos y el apoyo que necesité cuando las cosas parecían perder el sentido.

A mis abuelitos, que apoyaron mis sueños y siempre me tuvieron en sus oraciones.

A mi asesora, por el tiempo que dedicó conmigo a este proyecto, por su paciencia y recomendaciones. Quien de principio a fin de la carrera estuvo presente.

A mis profesores, por mostrarme la mejor cara de la agricultura y que fuera de la Universidad siempre habrá alguien a quien puedo ayudar.

A la Universidad, por mostrarme lo inmenso del conocimiento; por ser el lugar donde pasé los mejores años de mi vida, se convirtió en mi hogar y me brindó los espacios y herramientas para crecer en lo académico y personal.

ÍNDICE

1. RESUMEN	10
2. INTRODUCCIÓN	11
3. OBJETIVOS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4. ANTECEDENTES	15
4.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	15
4.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	16
4.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA	18
4.3.1. PRODUCCIÓN	18
4.3.2. ACEITES ESENCIALES Y SU USO	21
4.3.3. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES	25
4.4. REQUERIMIENTOS EDAFOCLIMÁTICOS	26
4.5. MÉTODOS DE PROPAGACIÓN CONVENCIONAL Y MANEJO DE PLANTACIONES	28
4.6. PLAGAS Y ENFERMEDADES QUE AFECTAN AL CULTIVO	30
4.6.1. PLAGAS	30
4.6.2. ENFERMEDADES	32
4.7. ETAPAS EN LA PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i>	33
4.8. REGULADORES EMPLEADOS EN LA PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i>	35
4.8.1. AUXINAS	36
4.8.2. CITOCININAS	37

4.9. PROTOCOLOS DE MICROPROPAGACIÓN DE <i>MENTHA</i> A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES.	38
4.9.1. ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO ESTÉRIL	39
4.9.2. MULTIPLICACIÓN, ELONGACIÓN Y ENRAIZAMIENTO	40
4.9.3. TRASPLANTE Y ACLIMATACIÓN	42
5. METODOLOGÍA	44
5.1. MATERIALES	47
5.2 MÉTODOS	48
5.2.1. SELECCIÓN DE PLANTA MADRE	48
5.2.2. DESINFECCIÓN	48
5.2.3. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO Y ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i>	49
5.2.4. MULTIPLICACIÓN Y ENRAIZAMIENTO	50
5.2.4.1. REMOCIÓN DE ÁPICES	50
5.2.4.2. ÍNDICE DE ENRAIZAMIENTO	50
5.2.5. ACLIMATACIÓN	51
5.2.5.1. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS SUSTRATOS EMPLEADOS EN LA ACLIMATACIÓN	54
5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
6.1. EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN Y EVALUACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA ESTABLECIMIENTO	57
6.2. EVALUACIÓN DE LA MULTIPLICACIÓN	59
6.2.1. NÚMERO Y LONGITUD DE BROTES	59

6.2.2. REMOCIÓN DE ÁPICES	60
6.2.3. ÍNDICE DE ENRAIZAMIENTO	61
6.3. EVALUACIÓN DEL SUSTRATO PARA ACLIMATACIÓN	62
<u>7. CONCLUSIONES</u>	<u>64</u>
<u>9. BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>66</u>
<u>ANEXOS</u>	<u>74</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Mentha x piperita</i> L. (Hlava <i>et al.</i> , 1990)	16
Figura 2. Estructura química del mentol	22
Figura 3. Estructura química del Ácido rosmarínico	24
Figura 4 . Posición de yemas (a), formación de nuevos brotes a partir de yemas axilares (b).	38
Figura 5. Diagrama de flujo del proceso de micropropagación propuesto para plantas del género <i>Mentha</i>	45
Figura 6 . Distribución de actividades en un protocolo de propagación in vitro para plantas del género <i>Mentha</i>	46
Figura 7 . Procedimiento de aclimatación.	53
Figura 8. Porcentaje de contaminación (A) y oxidación (B) observado con los tratamientos T10 y T20 para desinfección de explantes de <i>Mentha</i> spp.	57
Figura 9 . Unidades contaminadas por bacterias	58
Figura 10. Brotes formados al usar dos concentraciones de NAA en medio de cultivo Cruz Pizarro	59
Figura 11. Unidades con respuesta al tratamiento respecto al número de brotes formados (A); altura promedio de los brotes (B) al paso de 1,2, y 3 semanas.....	60
Figura 12 . Cantidad de brotes obtenidos al paso de 1,2, y 3 semanas	60
Figura 13 . Respuesta de unidades en las que se removieron los ápices	61
Figura 14 . Comparación de la densidad aparente (A) y humedad disponible (B) en las mezclas de sustrato: Peat moss, agrolita y vermiculita en las proporciones 1:1:1 (TA1) y 2:2:1 (TA2)	62

ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica (Heike 2005; SIB, 2019).....	15
Cuadro 2. Clasificación del mentol por su obtención (Robbers <i>et al.</i> , 1996).....	25
Cuadro 3. Plagas en el cultivo de <i>Mentha</i>	31
Cuadro 4. Hongos que provocan enfermedades en el cultivo de <i>Mentha</i>	32
Cuadro 5. Etapas en la propagación <i>in vitro</i>	34
Cuadro 6. Valores para el cálculo del índice de enraizamiento <i>in vitro</i> en <i>Mentha spp.</i>	51
Cuadro 7 . Características físicas de los componentes de las mezclas de sustrato utilizadas en la aclimatación.....	55
Cuadro 8. Tratamientos y variables a evaluar en cada etapa del protocolo de propagación <i>in vitro</i> para <i>Mentha</i>	56
Tabla 1. Producción en toneladas de hierbas aromáticas, en Huehuetlán el Chico, Puebla.....	19
Tabla 2. Producción en toneladas de hierbas aromáticas, en Ensenada, Baja California.....	19
Tabla 3. Tratamientos para la etapa de establecimiento	49
Tabla 4. Resultados del conteo para determinar el índice de enraizamiento <i>in vitro</i>	51

1. Resumen

A fin de obtener un protocolo de propagación *in vitro* para plantas del género *Mentha*, que pueda desarrollarse como práctica en el laboratorio de Cultivo de tejidos, se llevó a cabo un ensayo experimental que consistió en seis etapas: selección de la planta madre, desinfección del material vegetal, preparación del medio de cultivo, establecimiento de un cultivo estéril, multiplicación y enraizamiento, y aclimatación.

Se evaluó el efecto de dos tratamientos de desinfección T10: 10% cloro con Tween 0.1% y T20: 20% cloro con Tween 0.1%, para evitar la presencia de contaminantes provenientes del material vegetal. En el establecimiento de los cultivos se empleó NAA en dos concentraciones: 0.0, 0.05 μM y BAP a una concentración de 4.4 μM , a fin de promover la formación de brotes; en la multiplicación se cuantificó el incremento del número de brotes en el medio de cultivo seleccionado de la etapa de establecimiento y se determinó un índice de enraizamiento. Por último, en la aclimatación se determinó la densidad aparente y humedad disponible de dos mezclas de los sustratos peat moss, agrolita y vermiculita, en las proporciones 1:1:1 y 2:2:1.

El protocolo de propagación generado para la obtención de microplántulas de *Mentha spp.* es el siguiente: el tratamiento para desinfectar los segmentos nodales fue cloro al 10% con Tween 0.1% (T10); el medio de cultivo usado en las etapas de establecimiento y multiplicación fue Cruz Pizarro, adicionado con BAP 4.4 μM y NAA 0.05 μM (TE5) a fin de promover la formación de brotes y raíces sin que fuera necesaria una etapa de enraizamiento; para detener la elongación de los brotes y promover la ramificación de ellos se removieron los ápices, lo que permitió alcanzar una tasa de multiplicación de 1.8; la mezcla de sustrato adecuada para aclimatar fue peat moss, agrolita y vermiculita en proporción 2:2:1 (TA2), con ella fue posible mantener la humedad suficiente para evitar pudrición en los tejidos y que iniciara el crecimiento y desarrollo de las yemas axilares. Así, el tiempo de obtención de las microplantas siguiendo este protocolo fue de 20 semanas.

2. Introducción

La demanda de aceites como materia prima hace necesaria la producción a gran escala de plántulas sanas de *Mentha spp.*, obtener plantas completas a partir de explantes, callo o células individuales es primordial en: el mejoramiento genético, la selección de rasgos únicos, la rápida propagación clonal, la obtención de variantes somaclonales, de plantas libres de virus, plantas haploides o poliploides, en el rescate de embriones y en la formación de bancos de germoplasma¹.

Conseguir poblaciones uniformes de plantas, almacenar y conservar durante más tiempo el material vegetal para su cultivo e intercambiar material libre de enfermedades son algunas de las ventajas de la propagación *in vitro* de plantas del género *Mentha*². Como ocurre con otras plantas, el cultivo *in vitro* permite producir plantas sanas, en menor tiempo, en un menor espacio³; además se puede obtener mayor cantidad de aceite empleando técnicas de cultivo de tejidos a diferencia de la propagación convencional por esquejes, en la que se debe esperar a que los tallos sean leñosos o se haya realizado la cosecha del ciclo anterior para tomarlos⁴.

En México la producción de *Mentha* registrada en 2017 fue de 360 toneladas, el rendimiento en plantaciones con manejo convencional fue de 12 a 13 ton ha⁻¹ y con manejo orgánico se reduce hasta 3 ton ha⁻¹; los estados donde se cultiva son Baja California y Puebla⁵. En el país, esta planta tiene usos medicinales, herbolarios, alimenticios y en las industrias de la perfumería y cosmética. El uso de los aceites esenciales en la industria, se debe a su contenido en compuestos aromáticos, de los cuales el mentol es el más importante⁶.

¹ Lawrence, 2007.

² Lawrence, 2007.

³ Kitto, 2015.

⁴ Hlava *et al.*, 1990.

⁵ SIAP, 2017

⁶ Teixeira, 2015.

A fin de cumplir el objetivo del curso experimental de la asignatura micropropagación, que es familiarizar a los alumnos con las etapas que componen la micropropagación de especies de interés y la identificación de limitantes durante el desarrollo de esta técnica, desde el establecimiento hasta la aclimatación, se propone un protocolo de propagación *in vitro* a partir de segmentos nodales.

Uno de los problemas que se presentan durante el desarrollo de las prácticas en el laboratorio de cultivo de tejidos es que los alumnos no pueden concluir un protocolo de propagación, por el tiempo que se requiere para obtener una planta completa desde la siembra de un explante, pues este proceso excede la duración del semestre. De manera que, solo se lleva a cabo la selección de una planta madre, desinfección del material vegetal, preparación del medio de cultivo y el establecimiento de un cultivo estéril. Así, a las etapas de multiplicación, enraizamiento, y aclimatación no es posible dar seguimiento.

Las plantas del género *Menta* al ser cultivadas con técnicas *in vitro*, enraízan y se establecen con facilidad, sin ser necesaria la adición de compuestos para promoverlo, lo que reduce en una etapa la duración del protocolo, mientras que, utilizar segmentos nodales como explantes, contribuye a obtener mayores tasas de multiplicación⁷.

Como parte de los antecedentes del presente trabajo, se hace una descripción taxonómica y botánica de las plantas que pertenecen al género *Mentha*, se habla de la importancia económica que tiene la producción de éstas para la extracción de sus aceites esenciales y el uso que se le da en la industria.

Posteriormente se enlistan paso a paso los métodos que han sido empleados para propagar en campo y en laboratorio las plantas con fines comerciales. En los protocolos de propagación *in vitro*, se indica qué reguladores se utilizan para promover la formación de brotes y raíces. Así mismo, se incluye un apartado de las principales plagas y enfermedades que atacan al cultivo.

⁷ Kitto, 2015; Paudel y Pant, 2008; Rech y Pires, 1986.

En el apartado de metodología se indican los materiales utilizados y se describen los métodos a seguir en el protocolo de propagación *in vitro*, indicando los tratamientos empleados en cada etapa. En resultados y discusión se evaluó el comportamiento observado ante la aplicación de los tratamientos. En conclusiones se describe el protocolo propuesto ante los resultados obtenidos.

3. Objetivos

Objetivo general

- Obtener un protocolo de propagación *in vitro* de plantas del género *Mentha*, a partir de segmentos nodales, desde el establecimiento de un cultivo hasta la obtención de plantas aclimatadas, para que los alumnos de octavo semestre de la carrera de Ingeniería Agrícola, con orientación en Biotecnología, puedan desarrollar la metodología completa de micropropagación.

Objetivos específicos

- Evaluar dos concentraciones de hipoclorito de sodio y determinar cuál de estas reduce la contaminación y la oxidación en los explantes de la especie *Mentha* durante la fase de establecimiento *in vitro*.
- Evaluar dos concentraciones de ácido naftalenacético (NAA) combinadas con bencilaminopurina (BAP) durante la etapa de establecimiento de la propagación *in vitro* de *Mentha*, para seleccionar un tratamiento que en la etapa de multiplicación promueva la formación de nuevos brotes y formación de raíces.
- Evaluar el efecto de la remoción de ápices en la inhibición de la dominancia apical, para promover la formación de nuevos brotes en la etapa de multiplicación.
- Aclimatar plantas del género *Mentha* obtenidas *in vitro*, utilizando dos mezclas de sustratos con distintas proporciones de peat moss, agrolita y vermiculita, a fin de determinar con cuál de ellas produce un mayor porcentaje de supervivencia y sea empleado en el protocolo de propagación *in vitro* propuesto para plantas del género *Mentha*.

4. Antecedentes

4.1. Clasificación taxonómica

Las plantas del género *Mentha* pertenecen a la familia Lamiaceae o Labiatae (Cuadro 1). Son especies originarias del sur de Europa y norte de África (Pedraza y Henao, 2008), de manera específica, la especie *M. piperita* L. es nativa de la costa del mediterráneo, *Mentha arvensis* L. es nativa del este de Asia, y *M. spicata* L. es nativa de Europa (Paudel y Pant, 2008). En Australia, las Islas Galápagos, Nueva Zelanda y Estados Unidos, es una especie invasora (Rita y Animesh, 2011).

El uso que se le da a las plantas de esta familia es como especias o para la extracción de aceites esenciales; numerosos géneros de la familia Lamiaceae se consideran de importancia económica, entre ellos: *Mentha* (menta, menta verde y hierbabuena), *Lavandula* (lavanda), *Origanum* (orégano), *Rosmarinus* (romero), *Salvia* (salvia) y *Thymus* (tomillo) (Judd *et al.*, 2016).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica (Heike 2005; SIB, 2019)

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Mentha</i>

4.2. Descripción botánica

Los ejemplares de esta familia presentan pelos glandulares en hojas y tallos, los cuales son estructuras secretoras especializadas (Frank, 1999), en ellas se encuentran aceites etéreos como los terpenoides (Judd *et al.*, 2016). Los tallos poseen una forma cuadrangular que se observa al hacer un corte longitudinal en ellos (Judd *et al.*, 2016), alcanzan los 60 cm de largo (Hlava *et al.*, 1990). Sus hojas son pecioladas, ov lanceoladas, con nervadura prominente (Hlava *et al.*, 1990). Las flores son de color morado claro, están agrupadas en espigas densas, las cuales aparecen de julio a septiembre (Figura 1) (Hlava *et al.*, 1990). El polen que producen es tetracolpado⁸ (Judd *et al.*, 2016).



Figura 1. *Mentha x piperita* L. (Hlava *et al.*, 1990)

⁸ Un colpo es un surco germinal o abertura alargada en posición ecuatorial que presentan los granos de polen de las plantas dicotiledóneas (Valencia *et al.* 2012), el polen en las plantas de menta presenta cuatro surcos, por lo que se nombra tetracolpado.

Varias especies se hibridan naturalmente⁹, este es el caso de *Mentha x piperita* L., la cual es un híbrido de *Mentha aquatica* L. y *Mentha spicata* L. Se pueden encontrar especímenes no cultivados en el área mediterránea y en el este de Estados Unidos (Hlava *et al.*, 1990).

Así mismo se ha postulado que la especie *Mentha spicata* L. proviene de la hibridación natural entre las especies *M. aquatica* L., *M. sylvestris* y *M. rotundifolia* (L.) Huds (Ellis, 1960), mientras que la especie *Mentha piperita* L. proviene de la hibridación de *M. aquatica* x *M. spicata* (Rita y Animesh, 2011). Los genetistas no han logrado replicar el cruce del que se originó la especie *M. spicata* L., para obtener nuevas plantas con la misma calidad de aceites, sin embargo se han realizado con éxito estudios para mejorar la resistencia a enfermedades del cultivo (Ellis, 1960). Hasta ahora se han enlistado 38 especies del género *Mentha* (The Plant List, 2010).

⁹ Se conoce como hibridación natural a la cruce que ocurre entre dos especies, las cuales son diferentes en uno o más caracteres heredables (Dorado, 2009), también se ha nombrado como evolución reticulada o reticulación (Flores *et al.*, 2016); por definición, los descendientes de esta cruce son estériles o parcialmente fértiles, sin embargo, existen ejemplos en la naturaleza de híbridos fértiles (Dorado, 2009). Se considera que las características presentadas por los híbridos son intermedias, respecto a las especies progenitoras, pero, también se ha visto que los caracteres también pueden ser transgresivos o novedosos (Flores *et al.*, 2016).

4.3. Importancia económica

4.3.1. Producción

El cultivo de la menta japonesa (*Mentha x piperita* L.) se originó en China y Brasil, una vez que se extendió el cultivo a otros países India y China se posicionaron como los mayores productores (National Horticulture Board, 2019). India es el principal productor, consumidor y exportador de aceite de menta, seguido de China y Brasil (Rita y Animesh, 2011) generando el 75% de la producción mundial de mentol (National Horticulture Board, 2019).

La FAO (2019) reporta que Marruecos, es el principal país productor de menta, con poco más de 74 mil toneladas, seguido de Argentina, con una producción de 7 mil toneladas, posteriormente está Bulgaria, con 703 toneladas, mientras que la producción de México es de casi 360 toneladas (estos datos resultaron de promediar la producción registrada por la FAO del año 2000 a 2017).

El rendimiento en campo, que se ha obtenido en España, es de 10-12 ton ha⁻¹ de hoja fresca (Fernández, 2001), en Marruecos se registró un rendimiento de 25 ton ha⁻¹ en 2017 (FAO, 2019) y en México se obtuvieron rendimientos de 12 a 13 ton ha⁻¹ en manejo convencional y 3 ton ha⁻¹ con manejo orgánico, en 2017 (SIAP, 2017).

El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) en el 2017, reporta tres estados productores de menta (*Mentha sp.*) en México, que son Baja California, Baja California Sur y Puebla, que en conjunto generaron 270 toneladas del producto. El precio medio rural por tonelada es alrededor de 22 mil pesos, el cual puede incrementarse a 25 mil pesos si es producida bajo un sistema orgánico (SIAP, 2017). La mayor parte de las especies aromáticas y medicinales que son producidas en México están destinadas a Estados Unidos y Canadá, siendo migrantes mexicanos y asiáticos en estos países, los principales consumidores (Juárez *et al.*, 2013).

Dependiendo de las condiciones de suelo y clima podrían alcanzarse 20 ton ha⁻¹ (Mendoza *et al.* s/f) reduciéndose a 12 ton ha⁻¹ cuando se hace selección para

exportación (Pedraza y Henao, 2008). Una vez que la hoja se ha secado se obtiene del 12-15% del volumen cosechado y de ello 0.3-0.5% del peso representa el aceite extraído (Fernández, 2001). Por hectárea se pueden obtener 94 Kg ha⁻¹ de aceites de menta y 122 Kg ha⁻¹ de menta verde (Brown *et al.*, 2003).

En el estado de Puebla la producción de menta se concentra en el municipio Huehuetlán el Chico, en el ciclo primavera verano, bajo sistemas de riego. En este municipio se producen otras hierbas aromáticas (albahaca, tomillo y salvia), cuyo volumen de producción es mayor al de la menta (Tabla 1) (SIAP, 2017).

Tabla 1. Producción en toneladas de hierbas aromáticas, en Huehuetlán el Chico, Puebla.

Cultivos	2013	2014	2015	2016	2017
Menta	1.2	-	1.3	21.7	5
Salvia	10	-	10.2	18.9	8
Tomillo	9	-	9.09	21.14	15
Albahaca	480	-	420	800	50

Elaboración propia con datos de SIAP, 2017

Ensenada, Baja California, se ha caracterizado por la producción orgánica de hierbas medicinales y aromáticas (Juárez *et al.*, 2013), entre ellas la menta, que por volumen de producción y superficie sembrada ocupa el quinto lugar de este tipo de cultivos en el estado, después del apio, perejil, cilantro y eneldo (Tabla 2) (SIAP, 2017).

Tabla 2. Producción en toneladas de hierbas aromáticas, en Ensenada, Baja California.

Cultivos	2013	2014	2015	2016	2017
Albahaca	390.42	194.25	409.00	14	89.90
Menta	12.50	12.00	168.00	198.3	172.73
Eneldo	-	-	246.00	528	592.80
Cilantro	3463.00	2111.02	1261.68	2360.36	806.55
Perejil	144.15	896.56	2439.00	2661.6	2112.00
Apio	965.00	785.00	2518.50	2512	7792.70

Elaboración propia con datos de SIAP, 2017

Por otro lado, desde 1998 la empresa Especies Amacuzac S. P. R., produce en el estado de Morelos especias aromáticas de forma orgánica, siendo estas: albahaca, menta, salvia, cebollín, romero, orégano, estragón y tomillo. Los cultivos se manejan en invernaderos y en campo abierto y emplean sistemas de riego por goteo. Los productos son empacados en fresco para su comercialización en México y Estados Unidos (ESPECIAMA, 2019). En 2006 se reportó la exportación de menta, albahaca y tomillo orgánicos, a países europeos (Sánchez, 2006)

4.3.2. Aceites esenciales y su uso

En todas las especies del género *Mentha*, las sustancias activas son sus aceites esenciales (Hlava *et al.*, 1990). No obstante, su composición es variable de una especie a otra, por lo que su aroma y uso final también es distinto. Las especies que suelen cultivarse, para la extracción de aceites son: *M. arvensis* L. var *piperascens malinvaud*, *M. piperita* L. var. *piperita*, *M. spicata* L., siendo el de mejor calidad y eficacia el extraído de la especie *Mentha piperita* (Rita y Animesh, 2011).

La cantidad en la que cada componente está presente determina el sabor, olor y vida de anaquel del aceite extraído (Pihl, 2012), siendo el contenido de mentol y el de los ésteres de mentilo, los principales criterios para determinar la calidad de los aceites (Clark y Menary, 1981). Se ha encontrado que los cultivares del este de Asia y Japón contienen cantidades mayores de mentol (Hlava, *et al.*, 1990).

En la Norma ISO 856:2006 Oil of peppermint (*Mentha x piperita* L), se especifican las características con las que se determina la calidad del aceite esencial de *Mentha x piperita* L. (ISO, 2006), las cuales se enlistan a continuación:

- El aceite se extrae al destilar las partes aéreas de *Mentha x piperita* L.
- Es transparente y líquido.
- El color va de un amarillo claro verdoso a cristalino.
- El aroma es dulce, prevaleciendo el mentol (Anexo 2), varía por el origen de la planta.
- La densidad relativa, a 20 °C, va de 0.898 a 0.918 si no es originario de Estados Unidos y de 0.899 a 0.911 si proviene de dicho país.
- Índice de refracción, a 20 °C, de 1.459 a 1.465.
- Rotación óptica, de -30° a -14° o de -32° a -18° (USA).
- Miscibilidad en etanol (70%), a 20° C, 5:1 o 3:1
- Acidez máxima 2.

Los aceites esenciales de menta (*Mentha* spp.) son sustancias lipofílicas secretadas por tricomas glandulares que están en las células de la epidermis de las hojas y tallos de estas plantas (Lawrence, 2007; Tisserat y Vaughn, 2008); algunos de sus

componentes son: mentol (Figura 2), carvona, dihidrocarvona, mentona, pulegon, linalol, linanil acetato, limoneno, cineol, mentofuran y acetato de mentilo (Teixeira, 2015; Clark y Menary, 1981) siendo el mentol el más importante por sus propiedades anestésicas y antiinflamatorias (Teixeira, 2015).

El mentol puede definirse como un metabolito secundario de la familia de los terpenos, también conocido como metan-3-ol. Por su estructura química se reconoce como un monoterpenoide cíclico¹⁰, un alcohol (Figura 2) (Robbers *et al.*, 1996). Como un metabolito secundario, su función en la planta es de defensa ante mamíferos herbívoros, en algunos casos pueden ser usados con fines medicinales (Taiz, *et al.*, 2015). Cabe resaltar que en la especie *Mentha spicata* L. no está presente el mentol como en las especies *Mentha arvensis* L. y *Mentha piperita* L. (Romeu y Rubio, 2012).

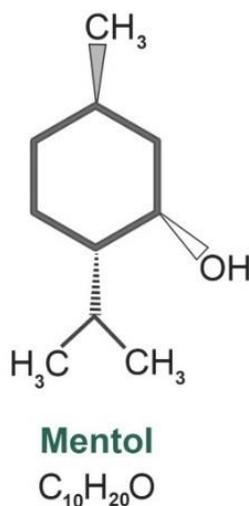


Figura 2. Estructura química del mentol

Al provocar efectos negativos en el crecimiento y desarrollo de otros organismos, los metabolitos secundarios son considerados sustancias tóxicas, si estos no se encontraran almacenados en compartimientos celulares como vacuolas, conductos

¹⁰ La mayor parte de metabolitos secundarios, también llamados especializados, se clasifican en tres clases químicas: Terpenos, fenoles y alcaloides (Taiz *et al.*, 2015). Los terpenos, terpenoides o isoterpenoides, son productos cuyas estructuras pueden estar divididas en unidades de isoprenos. La mayor parte de monoterpenoides han sido aislados de plantas superiores, se caracterizan por su volatilidad e intenso olor; estos componentes son los principales responsables de la fragancia y sabor de las plantas que los contienen, de ahí el interés comercial en ellos para la industria de la perfumería y de las especias (Robbers *et al.*, 1996).

resiníferos, lactíferos o tricomas glandulares, donde permanecen aislados de tejidos susceptibles, provocarían daño a las células (Taiz *et al.*, 2015).

Los aceites extraídos de la menta se utilizan en las industrias farmacéutica y de confitería en la elaboración de goma de mascar (Wang *et al.*, 2009), dulces, jaleas, cremas y licores (Pihl, 2012). También se usa como materia prima en la elaboración de pastas de dientes, enjuagues bucales, cremas refrescantes para masajes, aditivos para baño, geles y en perfumes (Hlava *et al.*, 1990).

El mentol tiene un efecto desinfectante, por ello puede emplearse en la elaboración de productos auxiliares en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y en ungüentos antirreumáticos, mientras que al entrar en contacto con la piel provoca una sensación refrescante (Hlava *et al.*, 1990). Al aplicarlo en la piel, en concentraciones de 0.1–1%, dilata los vasos sanguíneos generando una sensación fría seguida de una acción antiprurito, por ello se puede emplear en el tratamiento de pequeñas quemaduras por el sol, erupciones por intoxicación, en polvos de ducha y contra el pie de atleta. En concentraciones de 1-16% funciona como contrairritante (Robbers *et al.*, 1996).

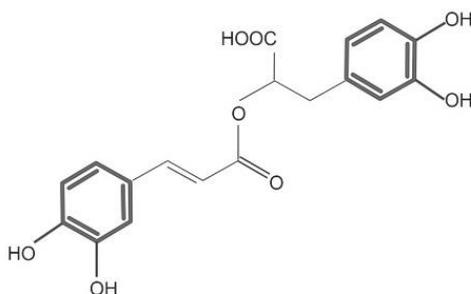
Si el mentol se combina con alcanfor y aceite de eucalipto pueden elaborarse ungüentos, medicinas para la tos, spray nasal e inhalantes para tratar los síntomas de la sinusitis, bronquitis y congestión nasal (Robbers *et al.*, 1996).

En el aceite extraído de la menta verde (*Mentha spicata* L.), el componente que se encuentra en mayor proporción es la carvona, representa más del 90% del total de aceites esenciales. La carvona es un ejemplo de metabolito secundario que no se puede obtener a partir de una suspensión celular o del cultivo de callo (Tisserat y Vaughn, 2008), por lo que se deben cultivar plantas completas para su extracción. Tisserat y Vaughn (2008) realizaron un análisis en el que identificaron que la porción apical de las plantas obtenidas *in vitro* contienen una mayor cantidad de carvona, en comparación a las partes del tallo más alejadas del ápice, de manera que en la porción que corresponde a las raíces no se encuentra este componente.

Recientemente, los aceites de la menta se han empleado en la elaboración de pesticidas para el control de áfidos, por su contenido de mentona, mentol, isomentona y carvona (Juárez *et al.*, 2013). Romeu y Rubio (2012) reportan un efecto repelente y antialimentario del aceite de *Mentha spicata* L., en larvas de *Spodoptera littoralis*, *S. exigua* y *S. frugiperda*, que se atribuye a la presencia de las cetonas: dihidrocarvona, pulegona, carvona y mentona; y un efecto repelente e inhibitorio de la alimentación de larvas y adultos del ácaro *Amblyomma hebraeum* en concentraciones 5, 10, 20 % v/v.

Normalmente los aceites extraídos de las distintas especies del género *Mentha* no se combinan entre sí en la elaboración de productos, como la goma de mascar, pero es posible encontrar aceites de menta (*Mentha piperita* L.) y menta verde (*Mentha spicata* L.) en un producto, siendo el sabor de la menta verde el más dulce (National Horticulture Board, 2019).

Otro componente de los aceites esenciales de la menta es el ácido rosmarínico (Figura 3), este es un metabolito secundario perteneciente a los estéres hidroxicinámicos, los cuales se encuentran en plantas de la familia Lamiaceae, Boraginaceae y Apiaceae (Ramawat, 2004). Este ácido es una sustancia bioactiva con aplicaciones como preservante de alimentos y medicinal por sus propiedades antioxidantes, antibacteriales, antiinflamatorias y anticancerígenas (Ramawat, 2004; Tsvetanova *et al.*, 2014).



Ácido rosmarínico

Figura 3. Estructura química del Ácido rosmarínico

4.3.3. Método de extracción de los aceites

El aceite de la menta japonesa (*Mentha arvensis* L. var. *piperacens*) se extrae por medio de la destilación con vapor de la punta de las flores (Robbers *et al.*, 1996). En fresco, el follaje contiene de 0.5 a 0.68% de aceites, que pueden destilarse luego de haberse deshidratado de 6 a 10 horas (National Horticulture Board, 2019).

Posterior a la destilación se lleva a cabo la cristalización de los aceites de la menta japonesa (*Mentha arvensis* L. var. *piperacens*) para ello es necesario refrigerar el aceite extraído a -22 °C. El mentol se cristaliza en forma hexagonal, los cristales son incoloros y se ven como agujas o polvo cristalino. Por último, se separan los cristales de mentol formados de la parte líquida, al presionarlo en papel filtro para su posterior purificación y recristalización (Robbers *et al.*, 1996).

La medición e identificación de aceites se hace por medio de una cromatografía de gases y espectrometría de masa (Clark y Menary, 1981).

Ante la alta demanda de este compuesto, también se produce de forma sintética (Hlava, *et al.*, 1990), se puede obtener a partir de la hidrogenización del thymol o del pineno (Robbers *et al.*, 1996). Por lo tanto, hay dos tipos de mentol, clasificados por la forma en que se obtienen, aquel extraído directamente del follaje deshidratado se nombra levoratorio, mientras que el obtenido de forma sintética, a partir de otros compuestos se denomina racémico (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación del mentol por su obtención (Robbers *et al.*, 1996)

Tipo	Origen
Levatorio	Natural o de fuentes sintéticas
Racémico	Obtenido sintéticamente

4.4. Requerimientos edafoclimáticos

Para su cultivo se establece en lugares con clima templado, en latitudes tropicales y subtropicales. La temperatura media que requiere va de los 20 a 40 °C durante el periodo de crecimiento (National Horticulture Board, 2019), pudiendo tolerar hasta 15 °C de temperatura mínima (Fernández, 2001). En México se ha cultivado en sitios de clima templado semiárido, donde la precipitación es menor o igual a 200 mm anuales (Mares y Guerrero, 1998).

No es considerada una planta resistente a periodos de sequía, tolera solo el 25 % de la reducción de la humedad disponible en el suelo (James, 1988), debido a que sus raíces son superficiales (Mares y Guerrero, 1998). Se necesita de riego para su cultivo (Mares y Guerrero, 1998), la lámina de riego aplicada es de 100 a 110 cm (Fernández, 2001). Existe un efecto de la latitud sobre el contenido de aceites: cuando se cultiva la menta a mayores altitudes la cantidad de mentol contenida en los aceites es mayor que aquellas obtenidas a bajas altitudes (Clark y Menary, 1981), sin embargo, el rendimiento de los aceites es menor (Fernández, 2001).

También se ha descrito el efecto del fotoperiodo sobre el rendimiento del aceite, éste se incrementa cuando los días son largos y la luminosidad es intensa (Fernández, 2001). Mientras que cuando los días son secos y calurosos el rendimiento tiende a disminuir (Fernández, 2001). Debido a que las condiciones ambientales también determinan la composición final de los aceites no es posible imponer un área geográfica específica para su cultivo basados en la latitud a la que el rendimiento es el mayor (Clark y Menary, 1981). En 1998, en el Centro de Investigación Regional del Norte Centro, Campo experimental Sierra de Chihuahua, se determinó que la zona norte del país, a partir de los 27° Norte, es viable el cultivo de menta y hierbabuena (Mares y Guerrero, 1998).

De manera ideal, el suelo para cultivarla debe ser limoso o arenoso, rico en materia orgánica (National Horticulture Board, 2019) y presentar altas cantidades de azufre, magnesio y manganeso (Fernández, 2001), con pH de 6 a 8.2, a un pH menor de 5.5 se recomienda encalar el suelo para lograr establecer el cultivo (National Horticulture Board, 2019).

Se recomienda que la conductividad eléctrica (CE) del sustrato sea baja, es decir menor a 1 dS m^{-1} , con ello el manejo de la fertilización se facilita y se evitan problemas de fitotoxicidad (Barbaro *et al.*, 2019). En el experimento realizado por García (2018) se indica que la CE de los fertilizantes o abonos que se van a aplicar debe ser menor a 4 dS m^{-1} , a este nivel las plantas de menta pueden desarrollarse.

El manejo de nutrientes es esencial en el balance entre el crecimiento en biomasa y la producción de aceite de alta calidad. A continuación, se indica la dosis de N, P, K requerida para alcanzar un rendimiento de 95 Kg ha^{-1} de aceite.

El nitrógeno suele aplicarse en la superficie del suelo, el cultivo requiere de 90 a 112 Kg ha^{-1} , para que el aporte sea continuo. Su aplicación se distribuye a lo largo del periodo de crecimiento de las plantas, si no se cubre el requerimiento de este nutriente la calidad del aceite y la biomasa obtenida se reduce. (Brown *et al.*, 2003).

El aporte de fósforo durante el crecimiento de las plantas, estimula el crecimiento de las raíces luego de la cosecha. Este nutriente se aplica antes del establecimiento en campo de las plantas y luego sobre el suelo, en la cantidad que se determine luego de realizar un estudio de suelo, por lo general se aplican de 49 a 98 Kg ha^{-1} en forma de P_2O_5 (Brown *et al.*, 2003).

De potasio se requieren 135 Kg ha^{-1} de K_2O ; se recomienda aplicarlo en el otoño o al inicio de la primavera de acuerdo a un estudio de suelo (Brown *et al.*, 2003).

La aplicación de azufre debe hacerse solo si la planta lo requiere, ya que no se observa algún efecto en la calidad del aceite cuando se aumenta la cantidad aplicada de este elemento. Sin embargo, su uso como fertilizante foliar puede provocar la formación de un sulfuro indeseable (Garmacreno-D) (Brown *et al.*, 2003).

Siempre es recomendable realizar un análisis foliar ya que es útil como indicador de la fertilidad del suelo en que se desarrollaron las plantas, pues se parte de la premisa de que la concentración del elemento en la planta es proporcional a la disponibilidad del nutriente en el suelo, por lo tanto, es un índice de fertilidad (Pedraza y Henao, 2008).

4.5. Métodos de propagación convencional y manejo de plantaciones

La propagación de la menta para el establecimiento de plantaciones comerciales es vegetativa, se utilizan brotes de tallos leñosos o los tallos que están en la base de la planta (Hlava *et al.*, 1990), los cuales pueden formar raíces al estar en contacto con el suelo, así al sembrarse directamente los esquejes o estolones se obtendrán plantas nuevas (Fernández, 2001; Pedraza y Henao, 2008).

En la selección de plantas madre y semillas, se busca que presenten un buen porte y desarrollo de las plantas, resistentes a condiciones edáficas y climáticas adversas, así como a plagas y enfermedades, y que además se obtenga un elevado rendimiento de principios activos (Muñoz, 2002).

A fin de realizar la plantación en enero se debe preparar el suelo al comienzo del invierno. Se inicia con el barbecho, al roturar de 25 a 30 cm de la superficie del suelo, empleando arados de discos o de reja y vertedera. Se continúa con el rastreo, pasando la rastra de discos en forma cruzada, al menos dos veces, para dejar mullido el suelo. Sigue la nivelación para propiciar la distribución adecuada del agua y que la distribución de las plantas sea uniforme, para ello se emplean cuchillas niveladoras, un pedazo de riel o un cajón pesado de madera. Al final se lleva a cabo el trazo de riego, este dependerá de la textura del suelo y de la pendiente del terreno, la recomendación es que en suelos pesados la pendiente sea de 15 a 20 cm por cada 100 m y en suelos ligeros de 25 a 30 cm (Mares y Guerrero, 1998).

Se usan aproximadamente 400 a 450 Kg de estolones por hectárea, dejando un espacio de 40 a 60 cm entre plantas y lo mismo entre líneas; dependiendo de la variedad utilizada y el tamaño de los implementos con que se prepare el suelo (National Horticulture Board, 2019). A la distancia entre plantas y líneas sugerido en el enunciado anterior se obtendría una población de 27,500 a 62,500 plantas por hectárea, mientras que, en plantaciones donde el espacio entre hileras es de 90 cm y entre plantas es de 10 a 15 cm, colocando un estolón seguido de otro sobre una misma línea, como sugieren Mares y Guerrero (1998), la población que se obtendrá irá de 74 mil a 111 mil plantas por hectárea.

Los estolones se deben acomodar en surcos de 5 a 6 cm de profundidad, sobre camas, posteriormente se riega; los brotes se generan luego de 2 a 3 semanas. (National Horticulture Board, 2019). La plantación debe hacerse con el suelo húmedo, evitando que los estolones permanezcan expuestos al sol o al viento, ya que se marchitarían y perderían vigor (Mares y Guerrero, 1998).

La recolección de esquejes se hace de febrero a marzo pasado el reposo vegetativo de invierno; es recomendable que las ramas midan de 10 a 16 cm de largo (Muñoz, 2002) o de 8 a 10 cm si se utilizan estolones (National Horticulture Board, 2019), de 4-5 mm de diámetro de tallo y con una tercera parte de sus hojas (Muñoz, 2002) y que no presenten brotes de más de 5 cm ya que estarían desgastados por la brotación (Mares y Guerrero, 1998).

El control de maleza es importante a partir de la cuarta semana de haber sembrado los estolones, esta labor contribuye a la obtención de mayores rendimientos en el cultivo, usar métodos mecánicos, químicos y manuales para desmalezar dará mejores resultados que el uso de solo uno de ellos. La rotación de la menta con otros cultivos, como arroz, papa o leguminosas, también favorece el control de malezas (National Horticulture Board, 2019).

La cosecha se hace después de floración y se pueden hacer hasta tres cortes al año, los cortes se hacen a 10 cm sobre el suelo. Las hojas y tallos se dejan secar a la sombra a temperaturas menores a 35°C (Hlava *et al.*, 1990). Se ha visto que la cosecha realizada en días nublados reduce el contenido de mentol en los aceites obtenidos (National Horticulture Brand, 2019).

También es posible cosechar las hojas 6 semanas después de la siembra, luego se pueden hacer cortes cada 6 ó 7 semanas si se maneja en invernadero y cada 9 si el manejo se hace a cielo abierto (Pedraza y Henao, 2008). Al iniciar el cultivo en enero y febrero se pueden hacer dos cortes, la primera de 100 a 120 días luego de ser sembrada y la segunda 80 a 90 días después de la primer cosecha (National Horticulture Brand, 2019).

4.6. Plagas y enfermedades que afectan al cultivo

4.6.1. Plagas

Los principales insectos que afectan las plantaciones de menta se describen a continuación, así como algunas medidas de control.

Spodoptera albula pertenece al orden Lepidóptera, familia Noctuidae, subfamilia Noctuinae. En su estado larval provoca daños en las plantas herbáceas, por su voracidad y capacidad reproductiva; suele migrar hacia los cultivos desde las malezas que se encuentran alrededor de las parcelas, siendo estas plantas hospederas. En estado de huevo permanecen de 3 a 5 días, en su estado larval de 14 a 21 días, de pre pupa de 1 a 4 días y como pupa de 7 a 12 días (Montesano *et al.*, 2013). Se ha visto que presenta tolerancia a la aplicación de numerosos insecticidas químicos y a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac, por lo que se ha empleado hormonas para el manejo integrado de esta plaga en cultivos de algodón. Para estos insectos las plantas de menta representan un hospedero (Montesano *et al.*, 2013).

Para *Deroceras reticulatum*, del orden Mollusca y familia Limacidae, y *Sarasinula* cf. *plebeia*, del orden Soleolifera y familia Veronicellidae, se sugiere monitorear la presencia de huevos cerca de las plantas afectadas y colocar trampas físicas fuera del cultivo; estas se deben inspeccionar a diario por las mañanas, realizando control manual, eliminando refugios y aplicando los productos de síntesis química específicos permitidos (Villegas, 2016).

Heliothis armígera y *H. peltigera* son palomillas que pertenecen al orden lepidóptera, familia Noctuidae. Estas se controlan con hongos entomopatógenos de los géneros *Metarhizium* y *Beauveria* y Cypermctrina 0.5 cc/L, Lifenuron 0.8 cc/L (Guerrero, 2014). Para los áfidos *Aphis gossypii*, y *Myzus persicae*, ambos del orden Hemiptera y familia Aphididae, se recomienda monitoreo permanente, uso de hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii*; además de la aplicación de extracto de nicotina o insecticidas como Etofenprox (1 cc/L) y Tiametoxam (0.3 g/L) (Villegas, 2016).

Diacrisia obliqua del orden Lepidóptera, familia Arctiidae, se alimenta del envés de la hoja; *Agrotis flammatra* del orden Lepidóptera, familia Noctuidae, daña el cuello de las plantas jóvenes en primavera, se puede realizar su control aplicando Phorate en el suelo antes de realizar la plantación; *Aulocophora foevicollis* del orden Coleóptera, familia Chysomelidae, se alimenta de las hojas y brotes en crecimiento; *Syngamia abrupatalis* del orden Lepidóptera, familia Crambidae, la oruga enrolla la hoja y se alimenta del interior de su tejido, aparece de agosto a septiembre, los bordes de la hoja se observan unidos por filamentos con apariencia de seda (Rita y Animesh, 2011). En el cuadro 3 se enlistan estas y otras plagas, cuya incidencia es menor, indicando el orden y familia a la que pertenecen y su nombre científico.

Cuadro 3. Plagas en el cultivo de *Mentha*

Orden	Familia	Nombre científico
Acarina	Tetranychidae	<i>Tetranychus urticae</i>
Coleóptera	Chysomelidae	<i>Aulocophora foevicollis</i>
		<i>Diabrotica balteata</i>
Díptera	Agromyzidae	<i>Liriomyza huidobrensis</i>
		<i>L. trifolii</i>
Hemíptera	Aphididae	<i>Aphis gossypii</i>
		<i>Myzus persicae</i>
	Pseudococcidae	<i>Pseudococcus adonidum</i> L.
	Aleyrodidae	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>
Lepidóptera	Arctiidae	<i>Diacrisia obliqua</i>
		<i>Agrotis flammatra</i>
	Noctuidae	<i>Autographa gamma</i>
		<i>Chrysodeixis chalcites</i>
		<i>Copitarsia consueta</i>
		<i>Heliothis armigera</i>
		<i>Heliothis peltigera</i>
		<i>Spodoptera albula</i> , <i>S. frugipeda</i>
		<i>S. exigua</i> , <i>S. litorales</i>
	Crambidae	<i>Syngamia abrupatalis</i>

Mollusca	Limacidae	<i>Deroceras reticulatum</i>
Soleolifera	Veronicellidae	<i>Sarasinula cf plebeia</i>
Stylommatophora	Limacidae	<i>Milax gagatesy</i>

(Guerrero, 2014; Montesano *et al.*, 2013; Rita y Animesh, 2011; Villegas, 2016)

4.6.2. Enfermedades

Las plantas del género *Mentha* son atacadas por diversos hongos patógenos que se enlistan en el Cuadro 4. Es altamente susceptible a la marchitez de *Verticillium*, enfermedad provocada por *Verticillium dahliae* (Wang *et al.*, 2009). Este hongo puede permanecer en el suelo impidiendo que las parcelas contaminadas se utilicen para establecer el cultivo (Ellis, 1960).

El hongo *Macrophomina phaseolina* provoca lesiones color café que crecen y se tornan negras, provocando que el tejido se suavice. Suele presentarse en la temporada de lluvias. Seguir una rotación de tres cultivos (arroz, trigo y menta) y tratar los estolones antes de la siembra con una solución de Captan al 25% o Benlate al 0.1%, durante 2 a 3 minutos, funcionan como medidas preventivas (Wang *et al.*, 2009).

Al presentarse el hongo *Fusarium oxysporum*, las hojas afectadas se tornan amarillas, se enroscan y finalmente se secan. Puede controlarse con la aplicación de Benlate, Bavistin y Topsin. El hongo *Alternaria sp.* provoca la pérdida del follaje en el verano, para su control se aplica un fungicida con cobre (National Horticulture Board, 2019).

Cuadro 4. Hongos que provocan enfermedades en el cultivo de *Mentha*

<i>Alternaria sp.</i>	<i>Curvularia sp.</i>	<i>Puccinia menthae</i>	<i>Rhizoctonia sp.</i>
<i>Erysiphe biocellata</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Verticillium sp.</i>	<i>Sclerotium bataticola</i> Tabú
<i>Phytium sp.</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Sphaceloma menthae</i>	

Ellis, 1960; Wang *et al.*, 2009; National Horticulture Board, 2019

4.7. Etapas en la propagación *in vitro*

La demanda de aceites como materia prima hace necesaria la producción a gran escala de plántulas sanas de *Mentha* spp, conseguir poblaciones uniformes de plantas, almacenar y conservar durante más tiempo el material vegetal para su cultivo e intercambiar material libre de enfermedades son algunas de las ventajas de la propagación *in vitro* de plantas del género *Mentha* (Lawrence, 2007).

La propagación de líneas de plantas por medio del cultivo de tejidos es llamada micropropagación (Phillips et al., 1995). Se enfoca a la producción del mayor número de plantas clonales, de alta calidad en el menor tiempo posible (Kitto, 2015).

Phillips *et al.* (1995) señalan como primera etapa el establecimiento de un cultivo estéril, mientras que George *et al.* (2008) establecen una etapa cero, en la que se selecciona y prepara a la planta madre. Así, la micropropagación puede dividirse en cuatro o cinco etapas (Phillips *et al.*, 1995; George *et al.*, 2008; Bhojwani y Dantu, 2013) ver Cuadro 5.

Cuadro 5. Etapas en la propagación *in vitro*

Bhojwani y Dantu, 2013	George <i>et al.</i>, 2008	Phillips <i>et al.</i>, 1995	Descripción
Sin etapa cero	Etapa 0. Selección, cuidado y tratamiento de plantas madre	Sin etapa cero	Se eligen plantas sanas, las cuales permanecen bajo observación antes de tomar los explantes.
Etapa 1. Establecimiento del cultivo	Etapa 1. Establecimiento del cultivo	Paso 1. Cultivo estéril de un explante.	Se determina el tipo de explante ¹¹ a utilizar, el tratamiento de desinfección de acuerdo al explante elegido y la técnica de micropropagación; se hacen modificaciones en la siembra y, de ser necesario, se emplean soluciones para evitar la oxidación de los tejidos.
Etapa 2. Multiplicación	Etapa 2. Multiplicación	Paso 2. Multiplicación de brotes o propágulos del explante.	Se brindan las condiciones de crecimiento óptimas para maximizar las tasas de multiplicación. Se adicionan hormonas, se realiza la remoción de los ápices, repicados, incluso, se promueve o detecta la formación de plantas fuera de tipo. La especie puede o no requerir un medio específico. La adición de hormonas o nutrientes se hace para incrementar la tasa de multiplicación.
Etapa 3. Elongación y enraizamiento	Etapa 3. Desarrollo y elongación de brotes	Paso 3. Desarrollo de raíces en los brotes para producir plántulas	Se adicionan nutrientes y hormonas para inducir la formación de raíces, así como para el incremento del tamaño de las vitroplantas. De acuerdo a la especie, puede prescindirse de la formación de raíces <i>in vitro</i> .
Etapa 4. Trasplante y aclimatación	Etapa 4. Aclimatación	Paso 4. Producción de plantas autosuficientes	Las vitroplantas se extraen para crecer en condiciones <i>ex vitro</i> . Se establecen en mezclas de suelo o sustratos estériles, bajo condiciones de invernadero, riego controlado y bajo luminosidad, también se inicia la fertilización. El enraizamiento se induce con la aplicación de hormonas.

¹¹ Un explante es un órgano pequeño o la parte de tejido de una planta que se coloca en medio de cultivo, a partir del cual se induce la formación y crecimiento de nuevos órganos vegetales. La elección del explante dependerá de la edad y especie de la planta de donde se tomará, así como del tipo de cultivo que se iniciará y su propósito (George *et al.*, 2008; Saran y Kumar, 2013).

4.8. Reguladores empleados en la propagación *in vitro*

En teoría, todas las células poseen la capacidad genética de dirigir su desarrollo hacia la formación de una planta completa, a esto se conoce como totipotencia (Smith, 2013); sin embargo, en la mayoría de los casos, las células vegetales inicialmente se comportan como totipotenciales, esto se observa cuando al inicio de un cultivo de tejidos solo se produce un brote y posteriormente esta forma raíces, demostrando que la totipotencialidad de las células está presente todo el tiempo, pero no se expresa de inmediato (De Klerk, 2002).

Las heridas provocadas en los tejidos al tomar los explantes, desencadenan la desdiferenciación de las células (Smith, 2013), mientras que, el tipo y concentración de hormonas empleadas cuando se lleva a cabo una técnica de cultivo *in vitro*, determina el tejido que se formará, por ello, el medio de cultivo utilizado en cada etapa de la micropropagación puede ser distinto.

En las plantas superiores la regulación y coordinación del metabolismo, el crecimiento y la morfogénesis dependen de señales químicas, que van de una parte de la planta a otra. La formación y crecimiento de los órganos en las plantas dependen de mensajeros químicos, factores externos, como la gravedad, pueden afectar la distribución de estos en la planta (Taiz *et al.*, 2015).

Dichos mensajeros químicos se conocen como hormonas, las cuales se producen en una célula y regulan procesos en otra al interactuar con proteínas específicas, cuya función receptora las vincula a vías de transducción de señales celulares. La mayoría de las hormonas vegetales son capaces de generar una respuesta en las células objetivo, en concentraciones muy bajas. Aunque el control hormonal del desarrollo es variado, las vías de las hormonas básicas tienen características comunes (Taiz *et al.*, 2015). El desarrollo de las plantas está regulado por nueve tipos de hormonas: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico, brasinosteroides, jasmonatos, ácido salicílico y estrigolactones (Taiz *et al.*, 2015). A continuación se mencionan los principales efectos y funciones de las auxinas y citocininas, hormonas utilizadas en la técnica de cultivo de tejidos y en este experimento para promover la formación de brotes.

4.8.1. Auxinas

Controlan la división y elongación celular. Al ser capaces de iniciar la división celular, participan en la formación de meristemos dando lugar a tejido desorganizado o a órganos definidos; mientras que en tejido organizado participan en el establecimiento y el mantenimiento de la polaridad en toda la planta, su efecto más marcado es la dominancia apical y su intervención en el tropismo (George *et al.*, 2008).

Son utilizadas como reguladores de crecimiento y herbicidas, provocan el elongamiento acelerado de células, cuando estas reciben menos luz (Taiz *et al.*, 2015). La primera auxina identificada fue el ácido indol-3-acético, como la auxina primaria en las plantas; ejemplos de auxinas utilizadas en cultivo de tejidos son ácido indolacético (IAA o AIA), ácido naftalenacético (NAA o ANA) y 2,4-D (Taiz *et al.*, 2015). En concentraciones relativamente altas las auxinas AIB (ácido indolbutírico), ANA y AIA promueven el enraizamiento y en interacción con citocininas se logra la proliferación de brotes (Saran y Kumar, 2013).

De acuerdo a George *et al.* (2008) el tipo de auxina y concentración que se aplica depende de:

- El tipo de crecimiento y/o desarrollo que se requiera.
- La tasa de consumo y de transporte hacia el tejido objetivo.
- La inactivación de la auxina en el medio y dentro del explante.
- Los niveles naturales y la síntesis endógena dentro del explante.
- La sensibilidad del tejido a la auxina.
- La interacción entre la auxina aplicada y las sustancias endógenas naturales.

4.8.2. Citocininas

Estas hormonas estimulan la síntesis de proteínas y participan en control del ciclo celular, por ello son capaces de promover la maduración de los cloroplastos y en consecuencia la senescencia de las hojas (George *et al.*, 2008), otro efecto que provocan es suprimir la dominancia apical y permitir la formación y actividad de meristemas apicales (Taiz *et al.*, 2015), los nuevos brotes desarrollados a partir de dichos meristemas son utilizados para llevar a cabo la multiplicación (Saran y Kumar, 2013).

El efecto de las citocininas interactúa con factores bióticos y abióticos como: la salinidad, sequía, macronutrientes, la fijación simbiótica de nitrógeno, los hongos micorrízicos, así como virus, bacterias, nemátodos y hongos patógenos (Taiz *et al.*, 2015). Las más utilizadas en el cultivo de tejidos son la kinetina o 6-furfurilaminopurina (de origen sintético), bencilaminopurina (BAP), 2-isopenteniladenina (2iP), γ,γ -dimetilalilaminopurina y zeatina o 6-(4-hidroxi-3-metil but-2-enil aminopurina) (Saran y Kumar, 2013).

Aunque de forma endógena las citocininas están presentes en una planta, ciertos tejidos o pequeños órganos no son capaces de sintetizar suficientes sustancias para mantener su crecimiento, esto suele ocurrir en los tejidos de dicotiledóneas, siendo necesaria la adición de estas en el medio de cultivo (George *et al.*, 2008).

En combinación con las citocininas, las auxinas promueven el crecimiento de callo, de suspensiones celulares y de órganos, también pueden regular la dirección de la morfogénesis (George *et al.*, 2008).

4.9. Protocolos de micropropagación de *Mentha* a partir de segmentos nodales.

Las técnicas de cultivo *in vitro* están basadas en la totipotencialidad de las células, aquellas que conservan mejor esta característica, principalmente meristemos, son las menos diferenciadas hacia una función específica. Estas se encuentran en las yemas y tejidos primarios de las plantas, los extremos de las raíces, los segmentos nodales, semillas, el parénquima del tejido vascular foliar, el cambium y algunas partes florales, (Vázquez *et al.*, 1997).

Uno de los métodos más utilizados en la micropropagación es el cultivo de segmentos nodales. Un segmento nodal consiste en una porción de tallo con una yema axilar (Vázquez *et al.*, 1997), la menta presenta hojas opuestas, por lo que se podrán generar dos brotes en cada segmento, uno por cada yema axilar, (Kitto, 2015) en la Figura 4 se señala la posición de estas yemas en una planta de menta.



Figura 4 . Posición de yemas (a), formación de nuevos brotes a partir de yemas axilares (b).

Al ser meristemas preformados, presentan poca variación genética y no se forma callo durante el cultivo (Vázquez *et al.*, 1997), a diferencia de la organogénesis por brotes adventicios y la regeneración a partir de callo (*de novo*), en los que la regeneración puede ocurrir en sitios donde los meristemas no se presentan de forma natural, como en entrenudos, lámina de las hojas, cotiledones o en la zona de elongación de las raíces (Phillips y Hubstenger, 1995).

Al estimular el desarrollo de los brotes axilares, se explota la capacidad que tiene el tejido meristemático de producir brotes para el desarrollo de ramas laterales (Phillips y Hubstenger, 1995). Cultivar segmentos nodales promueve que yemas crezcan y se alarguen, produciendo brotes axilares con nuevos segmentos nodales, los cuales podrán volver a ser cortados y cultivados (Vázquez *et al.*, 1997). Posteriormente, los segmentos darán origen a tallos o raíces al añadir las hormonas adecuadas al medio (Vázquez, *et al.*, 1997). Los segmentos nodales (desde un año de edad) se consideran la mejor fuente de explante para la micropropagación de la menta y pueden ser sembrados en medio MS (Lawrence, 2007).

La micropropagación de *Mentha spp.*, se puede desarrollar en cuatro etapas, descritas en el apartado de “Etapas de la propagación *in vitro*” de este trabajo; siendo estas:

1. Establecimiento de un cultivo estéril
2. Multiplicación
3. Elongación y enraizamiento
4. Trasplante y aclimatación

Debido a que durante la etapa de multiplicación se da la elongación y el enraizamiento de los brotes, se describirán en el mismo apartado.

4.9.1. Establecimiento de un cultivo estéril

El material con que se realice el cultivo pueden ser porciones de tallo o semillas, en el caso de los tallos deben elegirse aquellos aparentemente sanos, con crecimiento activo y que hayan crecido sobre el suelo (Kitto, 2015). Es más fácil establecer semillas en un ambiente aséptico, debido a la resistencia de los tejidos. Sin

embargo, el material obtenido puede ser menos vigoroso, mientras que al iniciar la propagación con material vegetativo se estarán produciendo clones que conservarán el vigor y las características de la planta madre (Kitto, 2015).

Algunos tratamientos de desinfección de los explantes son:

- Sumersión por 20 minutos en una solución de cloro (20%) y Tween 20 (0.1%), luego enjuagar tres veces con agua estéril, 5 minutos cada vez (Kitto, 2015).
- Sumersión por 10 minutos en una solución de cloro (10%) y Tween 20 (0.1%), luego enjuagar tres veces con agua estéril, 5 minutos cada vez (Kitto, 2015).
- Sumersión en Alcohol (70%) por un minuto, luego en hipoclorito de sodio (15%) por 10 minutos (Héctor *et al.*, 2005).
- Sumersión en solución de cloranfenicol (2.5 mg ml^{-1}) 4 horas (Héctor, *et al.*, 2005).
- Adición de Cloranfenicol¹² ($30 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) en el medio de cultivo (Héctor, *et al.*, 2005).
- Sumersión en solución de hipoclorito de sodio (1%) por 10 minutos, 75% etanol por un minuto y tres enjuagues con agua destilada (Paudel y Pant, 2008).

La evaluación de los tratamientos se realiza de forma visual siete días después de haber iniciado el cultivo, determinando el porcentaje de contaminación por bacterias y hongos, así como el porcentaje de explantes sanos en cada tratamiento. Además de evaluar la presencia de organismos se determina la fitotoxicidad de los tratamientos empleados, a partir de los explantes que no presentaron contaminación (Héctor *et al.*, 2005).

4.9.2. Multiplicación, elongación y enraizamiento

En la etapa de multiplicación se ha utilizado medio MS con agar y sacarosa, ajustando el pH a 5.8 antes de la esterilización. Se esteriliza en autoclave a 120 °C por 15 minutos, a 15 lb de presión y en cada tubo de ensayo (25 mm x 120 mm) colocando de 10 a 25 ml de medio (Paudel y Pant, 2008; Rech y Pires, 1986; Kitto, 2015; Texeira *et al.* 2015).

¹² Es un antibiótico efectivo contra bacterias gram positivas y gram negativas, así como bacterias anaerobias como las de los géneros *Mycoplasma*, *Rickettsias* y espiroquetas (Facultad de Medicina UNAM, 2019).

El tratamiento con hormonas de los brotes rompe su dormancia, lo que permite la formación de ramificaciones (Phillips y Hubstenger, 1995). La adición de hormonas dependerá del propósito del ensayo, por ejemplo: el uso, por separado, de NAA promueve la formación de raíces, mientras que adicionar BAP ayuda a la generación de brotes. Al variar la concentración de estas o utilizarlas de forma simultánea, puede promoverse:

- Formación de brotes y raíces con 0.5 ppm NAA + 0.5 ppm BAP, 0.5 ppm NAA + 0.1 ppm BAP o 0.5 ppm NAA + 2 ppm BAP (Paudel y Pant, 2008).
- Elongación del espacio entre nudos y formación de raíces con 1 ppm NAA + 0.5 ppm BAP (Paudel y Pant, 2008).
- Formación de callo en la base del explante y elongación de entrenudos añadiendo 1 ppm NAA + 1 ppm BAP (Paudel y Pant, 2008).
- Elongación de entrenudos, enraizamiento y formación de múltiples brotes añadiendo 1 ppm NAA + 2 ppm BAP (Paudel y Pant, 2008).

Mientras que, si se inicia el cultivo de ápices o nodos, en medio de cultivo MS sin hormonas, permitirá obtener numerosos brotes y a partir de ellos se tendrá material para las resiembras posteriores, en las cuales se emplearía medio con hormonas para llevar a cabo la multiplicación y luego la generación de raíces, bajo condiciones de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con 16 horas de luz al día (Paudel y Pant, 2008). En el trabajo realizado por Islam *et al.* (2003), se empleó medio sin hormonas, y se redujo la intensidad luminosa, para mantener una baja tasa de crecimiento en los brotes y estos se pudieran mantener como cultivos de reserva.

Las plántulas que se obtienen deben considerarse plantas miniatura, dado que poseen todas las características físicas y químicas de una planta que crece en el suelo (Tisserat y Vaughn, 2008). En la menta, las raíces suelen formarse al mismo tiempo que los brotes, ventaja que permite reducir el tiempo que transcurre desde la etapa de multiplicación hasta la de aclimatación (Rech y Pires, 1986), si en este periodo existiera un pobre desarrollo vascular entre el brote y las raíces, la sobrevivencia durante la aclimatación se reduciría (George *et al.*, 2008).

Se ha observado que en los subcultivos *in vitro* o repicados, aumenta la tasa de multiplicación (Rech y Pires, 1986). Al ser posible que los brotes obtenidos a partir de segmentos nodales sean separados y enraicen para obtener plantas nuevas (Phillips y Hubstenger, 1995), sin que sea necesario añadir reguladores de crecimiento (Tisserat y Vaughn, 2008) se lograría incrementar en diez veces el número de brotes por mes; estos brotes también son usados como propágulos; empleando brotes axilares en la etapa de multiplicación se podría obtener hasta 1 millón de propágulos en 6 meses, a partir de un solo explante (Phillips y Hubstenger, 1995).

4.9.3. Trasplante y aclimatación

La última etapa del proceso de micropropagación es el establecimiento de las plantas en suelo o en una mezcla de sustrato. Al haberse desarrollado en un ambiente artificial, rico en nutrientes, sacarosa y reguladores de crecimiento, con alta humedad, baja intensidad de luz y un escaso intercambio gaseoso, las plantas sufren cambios morfológicos, anatómicos, citológicos y fisiológicos (Bhojwani y Dantu, 2013).

Las principales anomalías de estas plantas son que se comportan como heterotróficas y presentan un pobre control ante la pérdida de agua. En la aclimatación se exponen, gradualmente, a condiciones de baja humedad y mayor intensidad de luz, a fin de que sobrevivan una vez que se establecen en campo, este proceso puede durar de 4 a 6 semanas (Bhojwani y Dantu, 2013).

El retraso en el desarrollo de la cutícula y la escasa funcionalidad de los estomas, son alteraciones que se presentan en las hojas, las cuales provocan que la tasa de transpiración sea alta; una vez que en las plantas se desarrolla el control de la transpiración se dice que hubo endurecimiento de tejidos (Cruz, 2012). Por la facilidad con la que los tejidos de la menta se deshidratan el trasplante debe ser rápido, asperjando continuamente las plantas para que durante todo el proceso el ambiente permanezca húmedo (Kitto, 2015).

Utilizar bolsas de plástico con pequeñas perforaciones sobre los contenedores, es un método simple para conservar un ambiente húmedo alrededor de las plantas mientras estas son capaces de absorber agua por medio de las raíces; se descubren durante algunas horas al día, aumentando el tiempo de exposición hasta remover la bolsa, o la tapa del recipiente, por completo (Bhojwani y Dantu, 2013). Durante 15 a 20 días después de haber realizado el trasplante, no deben mantenerse a luz directa, sino que deben permanecer en la sombra (Bhojwani y Dantu, 2013). Una vez pasado este tiempo el fotoperiodo recomendado va de 12 a 16 horas (Rech y Pires, 1986; Islam *et al.* 2005).

Primero se debe remover el agar de las raíces, de cada una de las plantas, realizando un lavado con agua corriente, luego se podrán colocar en una maceta o contenedor con sustrato y de tamaño apropiado a la planta (Bhojwani y Dantu, 2013). La mezcla sugerida de sustrato es: 2 partes de peat moss, 1 de perlita y 1 de vermiculita (Kitto, 2015).

En el trabajo realizado por Zapata y Fernández (1999) se añadieron los elementos nutritivos al sustrato en una proporción de 15 Kg ha⁻¹ de nitrógeno, 30 Kg ha⁻¹ de fósforo y 25 Kg ha⁻¹ de potasio, observando una rápida adaptación al suelo y vigor en las plantas.

Rech y Pires (1986) indican que luego de 30 días de haber realizado la siembra para la multiplicación se podrán trasplantar las plantas generadas. Luego de 22 días en condiciones de aclimatación Zapata y Fernández (1999) sugieren llevar a invernadero las plantas.

5. Metodología

La propagación se realizó en las siguientes etapas: selección de la planta madre, desinfección del material vegetal, preparación del medio de cultivo, establecimiento de un cultivo estéril, multiplicación y enraizamiento, y aclimatación; en la Figura 5 se representa este proceso. En el apartado de Métodos de esta sección se explican a detalle las actividades realizadas en cada una de las etapas.

En la Figura 6 se observa un diagrama de la distribución de las etapas seguidas en este protocolo de micropropagación, cuya duración fue de 21 semanas, desde el establecimiento del cultivo hasta la primera fertilización de los brotes trasplantados a sustrato.

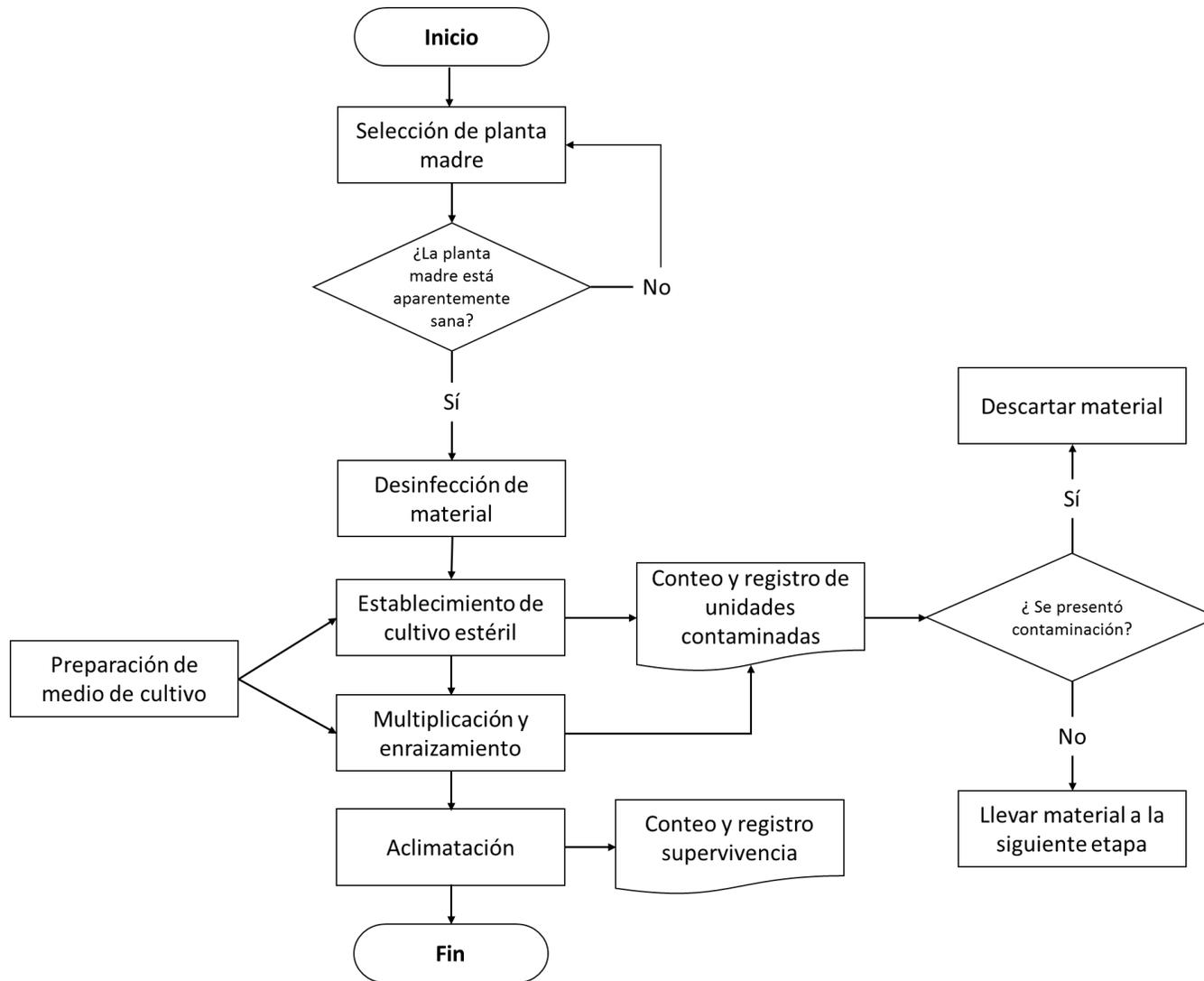


Figura 5. Diagrama de flujo del proceso de micropropagación propuesto para plantas del género *Mentha*.

Semanas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Selección de planta madre	█																				
Desinfección de explantes					█																
Preparación de medio de cultivo					█																
Siembra de establecimiento					█																
Desarrollo de nuevos brotes					█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Siembra de multiplicación									█												
Elongación y enraizamiento									█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Remoción de ápices												█									
Trasplante a sustrato																	█				
Aclimatación																	█	█	█	█	█
Fertilización																					█

Figura 6 . Distribución de actividades en un protocolo de propagación in vitro para plantas del género *Mentha*

5.1. Materiales

Se empleó material del laboratorio de Cultivos Vegetales L101, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Los materiales necesarios para la desinfección fueron: vasos de precipitados de plástico de 500 ml, cloro comercial, agua corriente, agitador y los tallos a desinfectar. En la preparación de medio de cultivo se requirieron: Tubos de ensayo de 25x150 mm con tapas (50 a 60 por litro de medio preparado) o frascos de 120 ml (40 por litro de medio preparado), vasos de precipitados de plástico de 500 ml, vaso de precipitados de vidrio de 1 L, matraz Erlenmeyer 500 ml, probeta de 10 y 5 ml, pipeta y propipeta, espátula, agitador, mosca, báscula granataria y báscula digital, potenciómetro, microondas, autoclave, agua destilada, agua desionizada estéril, soluciones madre, agar y sacarosa.

Para llevar a cabo la siembra de explantes se utilizaron: Tubos de ensayo (en la multiplicación) y frascos (en el establecimiento), con tapas medio estéril, caja Petri, pinzas, bisturí con navaja, lámpara de alcohol, atomizador con alcohol, sanitas, un frasco con alcohol para flamear el instrumental, el proceso se realizó dentro de una campana de flujo laminar. Es imprescindible que el instrumental con el que se realiza la siembra haya sido esterilizado.

En la aclimatación se utilizaron cajas Petri, vasos de precipitados de 250 o 500 ml, pinzas, aguja de disección, bisturí con navaja, lámpara de alcohol, atomizador con agua corriente, charolas o recipientes de plástico con tapa, agua destilada, mezclas de sustrato, enraizador y fungicida.

5.2 Métodos

5.2.1. Selección de planta madre

En la primera etapa se eligió una planta sana, que se adquirió en la tienda del Jardín Botánico de la FES Cuautitlán, ubicada en el Estado de México. En apariencia no presentaba síntomas de enfermedad, signos de infección o la presencia de insectos plaga; permaneció en observación durante un mes; esta fue la planta madre. De ella se tomaron tallos con hojas de 2 a 3 cm de longitud; cada tallo fue lavado con agua corriente y jabón.

De los tallos se cortaron 40 segmentos nodales; a cada segmento se le retiraron las hojas dejando el peciolo; sobre y debajo del sitio donde nacen las hojas (nodos) se dejaron de 1 a 2 cm de tallo, lo suficiente para que el tejido no se dañara durante la desinfección; así los segmentos obtenidos midieron de 2.5 a 4.0 cm de largo.

5.2.2. Desinfección

En la desinfección se utilizaron dos tratamientos de desinfección, los que se manejarán a lo largo de este trabajo como T10: cloro comercial 10% + Tween 0.1% y T20: cloro comercial 20% + Tween 0.1%. Los explantes se sumergieron por 20 minutos, en agitación en cada tratamiento. Posteriormente se enjuagaron con agua estéril, tres veces durante 5 minutos cada vez. En esta etapa se registró y evaluó la cantidad de unidades en las que se presentó contaminación y oxidación de cada tratamiento.

Al finalizar la desinfección los explantes permanecieron sumergidos en agua estéril, dentro de un vaso de precipitados de plástico cubierto con aluminio, este recipiente se llevó a una campana de flujo laminar para ahí realizar la siembra *in vitro* de los segmentos. En la desinfección no se utilizó alcohol por la facilidad con que las hojas se deshidratan y se promueve su oxidación una vez establecido el tejido en el medio de cultivo.

5.2.3. Preparación de medio de Cultivo y establecimiento *in vitro*

El medio de cultivo que se empleó en la etapa de establecimiento fue el medio Cruz-Pizarro (Cruz, 2000)¹³ al 100%, ver Anexo 1, con 6 % de agar, 30 % azúcar y bencilaminopurina (BAP) 4.4 μM . Para la etapa de establecimiento se evaluaron dos tratamientos, en los que se agregó ácido naftalenacético (NAA) al medio de cultivo para promover la formación de nuevos brotes, en dos concentraciones: 0.05 (TE5) y 0.0 (TE0) μM (ver Tabla 3). Por cada uno se realizaron 16 repeticiones, dando un total de 32 unidades experimentales, estas se etiquetaron con el número de tratamiento y fecha de siembra. Ambos medios de cultivo se ajustaron a un pH de 5.7 ± 0.1 y fueron esterilizados en autoclave a 120 °C y 1.34 Kg cm^2 de presión, durante 20 min.

La siembra consistió en colocar segmentos nodales desinfectados de 1 cm de largo, sin las hojas, en frascos de vidrio de 120 ml de capacidad, con 20 ml de medio de cultivo Cruz-Pizarro (Cruz, 2000), adicionado con BAP 4.4 μM y NAA en dos concentraciones 0.05 y 0.0 μM , para promover la formación de nuevos brotes y raíces. Luego se llevaron a la cámara de incubación a una temperatura de 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 horas y radiación de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Durante esta etapa se registró y evaluó el número de brotes desarrollados. Los datos se tomaron de los cultivos limpios, es decir sin contaminación ni oxidación, cada semana hasta un mes después de la siembra.

Tabla 3. Tratamientos para la etapa de establecimiento

Tratamientos	NAA	BAP
TE5	0.05	4.4
TE0	0.0	

¹³ Durante la preparación del medio se añadieron 5 ml de Ácido Nicotínico en lugar de 2.5 ml.

5.2.4. Multiplicación y enraizamiento

Empleando el material que no presentó contaminación durante la etapa de establecimiento, se cortaron segmentos de tallo con 2 hojas (segmentos nodales), las cuales se repicaron. En tubos de ensayo de 25x150 mm con 10 a 15 ml de medio de cultivo Cruz-Pizarro (Cruz, 2000) adicionado con 4.4 μM de BAP y 0.5 μM , se colocaron en posición vertical de 1 a 2 segmentos por tubo, evitando que la zona donde se encontraban las yemas quedara sumergida en el medio. A cada tubo se le colocó un tapón y se selló con plástico adherible; posteriormente se llevaron a la cámara de incubación a 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 horas y radiación de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Se realizaron observaciones semanales durante las tres semanas posteriores a la siembra, en las que se registró y se evaluó: número de nuevos brotes generados, longitud de brote y cantidad de raíces formadas; este último dato se utilizó para determinar el índice de enraizamiento *in vitro*.

5.2.4.1. Remoción de ápices

A fin de romper la dominancia apical de los brotes obtenidos en el medio de cultivo elegido para la multiplicación y promover la formación de una mayor cantidad de brotes, se removieron los ápices apicales de los tallos. A partir de las puntas se contaron dos nudos y por debajo de estos se realizó el corte. Una semana después de haber removido los ápices se cuantificaron los brotes formados.

5.2.4.2. Índice de enraizamiento

El enraizamiento se determinó con la metodología empleada por Criley (2008) en la que se obtiene un índice. A partir de la cantidad de raíces formadas en cada explante se establecieron rangos para cada tipo de enraizamiento y se les dio un valor ponderado (Cuadro 6).

Cuadro 6. Valores para el cálculo del índice de enraizamiento *in vitro* en *Menta spp.*

Valor ponderado	Enraizamiento	Rango (Número de raíces por brote)
5	Denso	9 a 7
4	Medio	6 a 4
3	Ligero	3 a 1
2	Sin raíces	0
1	Muerto	-

Luego se contaron y clasificaron las unidades en las categorías definidas. Lo siguiente fue multiplicar el número de brotes de cada categoría por el valor ponderado, según correspondía, por ejemplo: existieron 17 unidades en la categoría de enraizamiento ligero, el valor ponderado que corresponde es 3, por lo que se multiplicó 17 por 3. El siguiente paso fue sumar los valores obtenidos en cada categoría; el resultado de la suma se dividió entre el número de brotes sembrados para obtener el índice de enraizamiento (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del conteo para determinar el índice de enraizamiento *in vitro*

Tratamiento	Número de brotes sembrados	x 5	x 4	x 3	x 2	x 1	Total	Índice de enraizamiento
Único	41	10	24	51	28	2	115	2.8

5.2.5. Aclimatación

En la fase de aclimatación se prepararon dos mezclas de sustrato, utilizando peat moss, agrolita y vermiculita en las proporciones 1:1:1 (TA1) y 2:2:1 (TA2), con tres repeticiones de cada una. Estas mezclas de sustrato se esterilizaron en autoclave, a 120 °C, 1.3 atm., durante 20 min., dentro de bolsas de polipapel. Para deshacer los terrones en el peat moss se tamizó el sustrato antes de colocarlo en las bolsas.

Como parte de la preparación para extraer las plántulas de los tubos de ensayo, se colocaron las mezclas de sustrato esterilizado y humedecido en charolas de plástico con tapa. Se elaboró una solución fungicida con Captan, la cual contenía 1.5 g l⁻¹ del producto y en una caja Petri se colocó Radix 1500 ppm. Una semana antes de realizar la aclimatación se retiró el plástico adherible con el que estaban sellados los tubos de ensayo, para que comenzara el endurecimiento de los tejidos.

Es crítico que en la etapa de aclimatación los tejidos no se deshidraten, por lo que es necesario mantenerlos en un ambiente muy húmedo, al menos hasta que comience la formación de raíces (Kitto, 2015). Se debe trabajar con rapidez y asperjar/rociar los tejidos con frecuencia, durante todo el proceso. A continuación, se describe el procedimiento que se siguió para llevar los brotes del tubo de ensayo a las charolas con sustrato (Figura 7).

1. Se colocaron 3 cajas Petri en fila, estas se llenaron con agua corriente; para retirar los restos de medio de cultivo de las raíces se hizo un enjuague en cada caja Petri, así al realizarse tres enjuagues se asegura la limpieza de las raíces.
2. Una vez enjuagadas se removi6 el tejido oxidado o dañado que existía y se cortaron las puntas para promover la formación de nuevos brotes.
3. La plántula limpia se sumergió en la solución de Captan por uno o dos segundos, y se sacude ligeramente para retirar el exceso de agua, no es necesario dejar reposar.
4. Antes de colocar en las charolas con sustrato, se impregnó la base de las plántulas con Radix 1500 ppm.
5. Por último se hicieron cavidades en el sustrato para introducir las plántulas, presionando a los lados para llenar nuevamente la cavidad. Se aplicó un riego ligero utilizando un atomizador, para conservar el ambiente húmedo y evitar la deshidratación de los tejidos.

Una vez en las charolas se realizaron aspersiones diarias con agua corriente para mantener el ambiente húmedo. Gradualmente se permitió la entrada de aire realizando perforaciones en la tapa de las charolas hasta destaparlas. El conteo de plantas que sobrevivieron se hizo una semana después del trasplante.

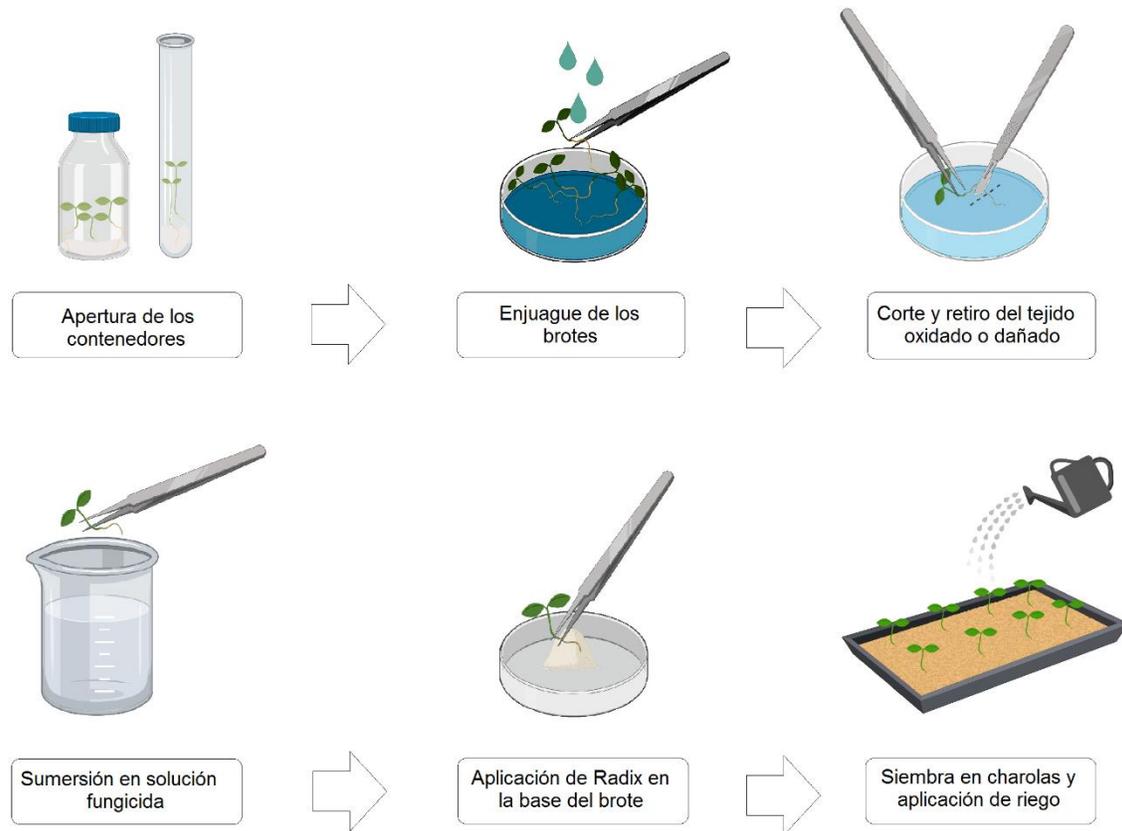


Figura 7 . Procedimiento de aclimatación

Después de 15 días del trasplante se comenzó la fertilización de las plantas con medio de cultivo Cruz Pizarro al 50% (Anexo 1), sin hormonas, sin sacarosa y sin agar; la aplicación fue foliar, cada tercer día por 2 semanas.

Se utilizó una segunda solución fertilizante con: nitrógeno (N) 3.0, fósforo (P) 0.6 y magnesio (Mg) 0.8 y potasio (K) 2.25 g planta⁻¹, por cada kilogramo de sustrato empleado (Jiménez *et al.*2012; Pedraza y Henao, 2008). Se distribuyó en 12 semanas, el 25% de la dosis se aplicó en las 2 primeras semanas, el 75% restante en las 10 semanas posteriores, de forma foliar (Jiménez *et al.*2012).

En esta etapa se evaluó el efecto de la densidad aparente y del porcentaje de humedad disponible en cada mezcla de sustrato, en la supervivencia de las plantas aclimatadas.

5.2.5.1. Determinación de las características físicas de los sustratos empleados en la aclimatación

Las características que se determinaron fueron: densidad aparente y humedad disponible siguiendo el procedimiento indicado por Cruz (2012), que se describe a continuación:

1. Pesar un cono de papel y registrar el peso.
2. Verter agua en el cono, anotar el volumen alcanzado.
3. Marcar en el cono el nivel de agua y retirarla.
4. Llenar el cono con la mezcla de sustrato hasta la marca realizada y apretarlo suavemente.
5. Pesar el cono con el medio y registrar el dato.
6. Obtener el peso del sustrato al restar el peso del cono al registrado en el paso 5.
7. Dividir el peso del sustrato y dividir entre el volumen alcanzado en el paso 2, para obtener la densidad.
8. Con una probeta graduada se vierte agua en el cono con el sustrato a fin de llenar los espacios porosos. El volumen de agua requerido equivale al espacio poroso total del sustrato.
9. Sobre papel absorbente voltear el cono para filtrar el agua.
10. Una vez filtrado, pesar el cono con el sustrato y registrar el peso.
11. Al peso obtenido en el paso 10 se restará el peso del cono con el sustrato seco. Este resultado es la humedad disponible en el sustrato.

Se espera que el tratamiento TA2 presente un menor porcentaje de humedad disponible, ya que de los componentes de la mezcla peat moss y agrolita están en mayor proporción y estos, en comparación a la vermiculita, presentan un mayor porcentaje de retención de humedad (Cuadro 7). Respecto a la densidad de las mezclas es posible que el tratamiento TA2 que contiene una mayor proporción de agrolita, permita una mejor circulación del aire y agua, al ser menos compacto.

Cuadro 7 . Características físicas de los componentes de las mezclas de sustrato utilizadas en la aclimatación

Característica	Perlita/ agrolita	Tezontle	Peat moss	Vermiculita	Arena	Fibra de coco
Densidad aparente (g L⁻¹)	135	1 500-1 800	60-300	120	1 700	200
Retención de humedad (%)	45	25	48	35	15	40
Aire (%)	35	25	20	25	35	16
Materia sólida (%)	20	50	32	40	50	40
Esterilidad	Muy alta	Media	Media	Alta	Media	Alta
Durabilidad (años)	3	2	1	1	Indeterminada	1
Composición	Silicatos	Mineral no metálico	Fibra vegetal	Mineral	Mineral	Fibra vegetal
pH	Neutro	Neutro	Ácido	Neutro	Neutro	6.8–7.0
CIC	Baja	Muy ligera	Baja	Alta	Baja	Alta

(Burés, 1997; Delgado *et al.*, 2016; Hidro *enviroment*, 2019)

5.3. Análisis estadístico

Para evaluar los resultados obtenidos en cada etapa se realizó una prueba de medias de Fisher ($P < 0.05$). En el Cuadro 8 se enlistan los tratamientos empleados en cada etapa del protocolo.

Cuadro 8. Tratamientos y variables a evaluar en cada etapa del protocolo de propagación *in vitro* para *Mentha*.

Etapa	Tratamientos		Variables evaluadas
Desinfección	T10	T20	Oxidación y contaminación
	Cloro 10% + Tween 0.1%	Cloro 20% + Tween 0.1%	
Establecimiento	TE0	TE5	Número de brotes con respuesta
	NAA 0.0 μ M BAP 4.4 μ M	NAA 0.05 μ M BAP 4.4 μ M	
Multiplicación y enraizamiento	NAA 0.05 μ M BAP 4.4 μ M	Remoción de ápices	Incremento del número de brotes y altura Índice de enraizamiento
Aclimatación	TA1	TA2	Supervivencia
	Peat moss, agrolita y vermiculita 1:1:1	Peat moss, agrolita y vermiculita 2:2:1	

6. Resultados y discusión

6.1. Evaluación del tratamiento de desinfección y evaluación del medio de cultivo para establecimiento

Se presentó 12.8% de contaminación por bacterias (Figura 9) en el tratamiento T10 y oxidación del 6.25%, mientras que en el tratamiento T20 la contaminación fue de 18.75% y no se registró oxidación; entre los tratamientos de desinfección no hubo diferencia estadística (Figura 8). Dado que uno de los propósitos de la propagación *in vitro* es la obtención de plantas sanas y libres de enfermedades (Lawrence, 2007), se recomienda utilizar el tratamiento T10 en el que el porcentaje de contaminación fue menor.

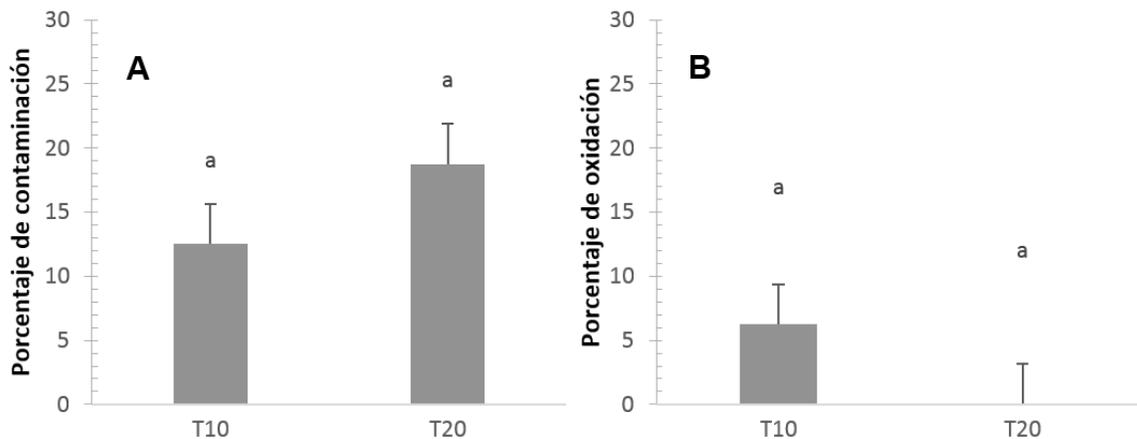


Figura 8. Porcentaje de contaminación (A) y oxidación (B) observado con los tratamientos T10 y T20 para desinfección de explantes de *Mentha* spp.



Figura 9 . Unidades contaminadas por bacterias

En cuanto al medio de cultivo durante la etapa de establecimiento, se ha reportado que con el medio MS se producen brotes y raíces a partir de brotes axilares; cuando reguladores como BAP se añaden al medio hay proliferación de brotes axilares (Teixeira, 2015). Sin embargo, en esta etapa con ningún tratamiento se formaron raíces aun cuando el medio para ambos tratamientos contenía dicho regulador, lo que podría entonces atribuirse a la composición del medio de cultivo empleado en el cual se aumenta la concentración de NH_4NO_3 , se reduce el contenido de KNO_3 y se sustituye $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ por CaCl_2 . Desde la primera semana después de la siembra se pudo observar desarrollo de brotes en todos los tratamientos, los tratamientos fueron estadísticamente iguales (Figura 10).

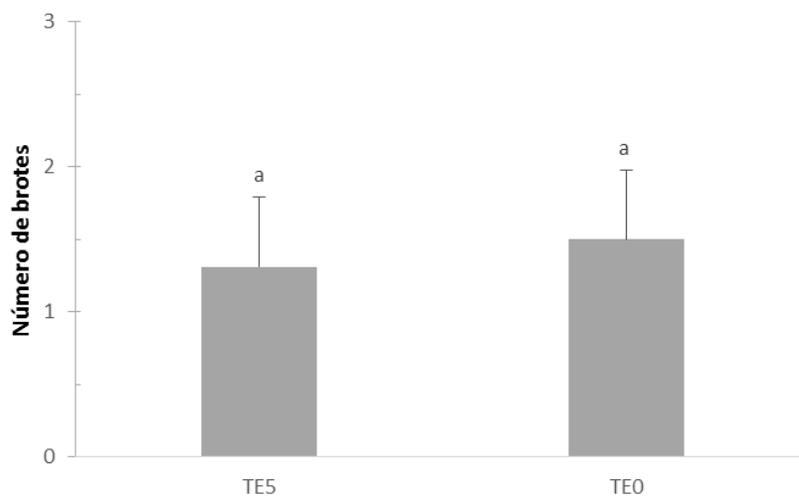


Figura 10. Brotes formados al usar dos concentraciones de NAA en medio de cultivo Cruz Pizarro

6.2. Evaluación de la multiplicación

A partir de los resultados obtenidos en el establecimiento del cultivo, se eligió el tratamiento TE5: Cruz Pizarro al 100%, adicionado con 4.4 μM de BAP y 0.05 μM de NAA, agar al 6% y 30% de sacarosa. En dicho medio se sembraron 41 segmentos, de los cuales el 7% presentó oxidación; en ninguna unidad hubo contaminación. A partir de las 38 unidades que no presentaron oxidación ni contaminación, se cuantificó el número de brotes generados en cada explante, su longitud y se determinó el índice de enraizamiento.

6.2.1. Número y longitud de brotes

En general el 68.4% de las unidades experimentales sembradas sin contaminación generaron dos brotes (Figura 11A), una respuesta esperada por la presencia de dos yemas axilares en cada segmento nodal, utilizado como explante (Kitto, 2015). La altura promedio de los brotes observada fue de 1.18 cm en la primer semana, 3.1 cm en la segunda y 5.05 cm en la tercera, habiendo una elongación de casi 2 cm por semana (Figura 11B). La tasa de multiplicación alcanzada fue 1.85, a partir de 41 explantes sembrados, al paso de tres semanas en incubación (Figura 12).

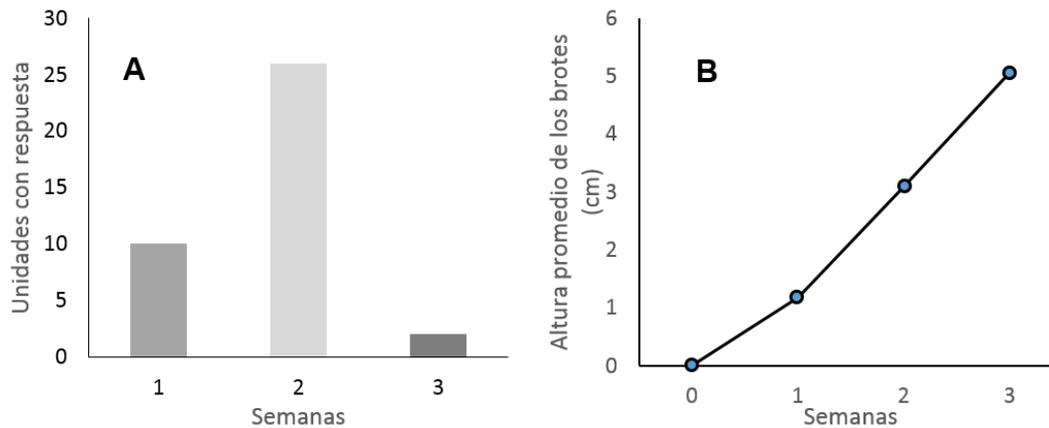


Figura 11. Unidades con respuesta al tratamiento respecto al número de brotes formados (A); altura promedio de los brotes (B) al paso de 1,2, y 3 semanas

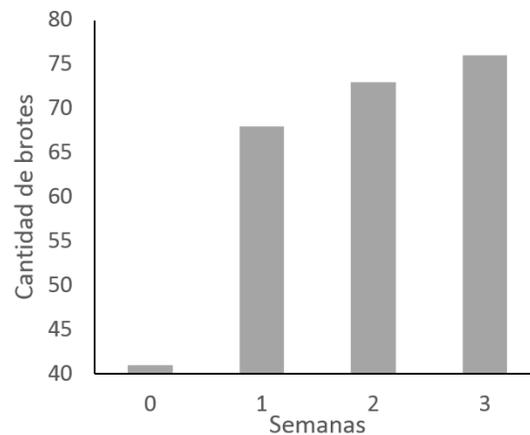


Figura 12 . Cantidad de brotes obtenidos al paso de 1,2, y 3 semanas

6.2.2. Remoción de ápices

Llevar a cabo la remoción de ápices en subcultivos, como los realizados para la etapa de multiplicación, aumenta la ramificación de los brotes, ya que se elimina la dominancia apical (George *et al.*, 2008). De las 55 unidades tratadas, en 3 se presentó contaminación, lo que representó el 5.5% de ellas. Del resto de unidades sin contaminación, el 2% no mostró respuesta a la remoción del ápice; en 94% se formaron 2 brotes nuevos y en 3% solo se formó un brote nuevo (Figura 13). Así, la tasa de multiplicación alcanzada fue de 1.8.



Figura 13 . Respuesta de unidades en las que se removieron los ápices

6.2.3. Índice de enraizamiento

Para Paudel y Pant (2008), fue necesario llevar a cabo la transferencia de los brotes a un medio *in vitro* con NAA y BAP para promover el enraizamiento, mientras que en el mismo medio de cultivo de la etapa de multiplicación (Cruz Pizarro al 100%, adicionado con 4.4 μM de BAP y 0.05 μM de NAA, agar al 6% y 30% de sacarosa) el 63% de explantes desarrolló raíces siete días después de la siembra.

El resultado obtenido del índice de enraizamiento fue 2.8, cuyo valor se acerca a la categoría de enraizamiento ligero, que tiene un valor de 3 (Cuadro 6). Aun cuando se obtuvo un índice de enraizamiento ligero, las plantas formadas mostraron un alto porcentaje de supervivencia durante la aclimatación.

Coincidiendo con Kitto (2015) y Paudel y Pant (2008) los explantes de *Mentha* enraizan rápida y fácilmente, el uso de BAP y NAA para estimular la formación de raíces y brotes en plantas de la especie *Mentha*, es efectivo en la etapa de multiplicación, ya que en todos los explantes hubo respuesta y se pudo pasar a la etapa de aclimatación sin que fuera necesario el traslado de los brotes obtenidos a un medio de cultivo para enraizar, además se observa la elongación de los entrenudos. La formación simultánea de raíces y brotes reduce el tiempo en que se llevarán los brotes a sustrato (Rech y Pires, 1986).

6.3. Evaluación del sustrato para aclimatación

En la sobrevivencia al trasplante de los brotes, el 100% de los colocados en el tratamiento TA2 (2:2:1) permanecieron vivos, comenzando su crecimiento y el desarrollo de las yemas axilares una semana después del trasplante, mientras que, de aquellos sembrados en la mezcla TA1 (1:1:1) solo el 73% sobrevivieron.

Al evaluar las mezclas de sustrato se encontró que eran estadísticamente iguales en densidad, pero respecto a la humedad disponible en el tratamiento TA1, esta fue mayor (Figura 14), lo que pudo haber provocado la pudrición en los tejidos de los brotes por un exceso de humedad en el ambiente.

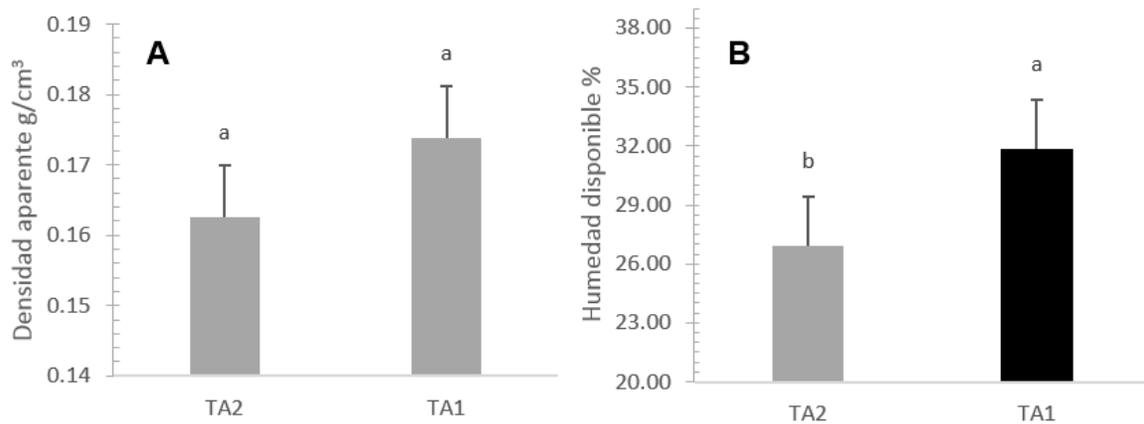


Figura 14 . Comparación de la densidad aparente (A) y humedad disponible (B) en las mezclas de sustrato: Peat moss, agrolita y vermiculita en las proporciones 1:1:1 (TA1) y 2:2:1 (TA2)

Los siguientes factores deberán observarse en el desarrollo del protocolo para evitar problemas futuros:

- Dureza del medio de cultivo: un medio de cultivo semilíquido provocará que los explantes se sumerjan en él y dificultará el desarrollo de las yemas axilares para la obtención de brotes. De acuerdo a la calidad del agar utilizado, se pueden incrementar la cantidad por litro para incrementar la dureza del medio.
- La limpieza de superficies, esterilización de instrumental e insumos: para reducir el porcentaje de unidades que presenten contaminación. Todo el

instrumental a utilizar debe esterilizarse en autoclave, las superficies deben limpiarse con soluciones desinfectantes; insumos como el sustrato, también se esterilizan en auto clave, mientras que las charolas deben lavarse utilizando jabón y cloro.

- Elección de contenedores: dado que los brotes crecen rápidamente y se forman raíces en la base y en los nodos de los brotes, se recomienda elegir frascos tipo Gerber, en lugar de tubos de ensayo para realizar la siembra, colocando de 1 a 2 explantes por contenedor.

7. Conclusiones

El protocolo de propagación *in vitro* obtenido para plantas del género *Mentha* que se propone tiene una duración de 20 semanas y consiste de seis etapas:

- Selección de la planta madre
- Desinfección del material vegetal
- Preparación del medio de cultivo
- Establecimiento de un cultivo estéril
- Multiplicación y enraizamiento
- Aclimatación

Para lograr completar este protocolo durante un semestre, es necesario que, la selección de la planta madre se realice cuatro semanas antes del inicio de clases, ya que el semestre tiene una duración de 16 semanas. Permitiendo así, que el seguimiento y toma de datos de la última etapa, se realice antes del inicio del período vacacional.

Para reducir la contaminación y oxidación de los explantes de plantas del género *Mentha* durante la fase de establecimiento *in vitro*, se recomienda utilizar una solución de cloro al 10% con Tween 0.1% (T10), sumergir en ella el material vegetal por 20 minutos en agitación y enjuagar tres veces con agua desionizada estéril, durante cinco minutos cada vez.

El medio sugerido para promover la formación de nuevos brotes y raíces en la etapa de establecimiento *in vitro* a partir de segmentos nodales es: Cruz-Pizarro (Cruz, 2000), adicionado con BAP 4.4 μM y NAA 0.05 μM (TE5), con un periodo de incubación de cuatro semanas, a una temperatura de 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 horas y radiación de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Se recomienda llevar a cabo la remoción de ápices en subcultivos, ya que esto aumenta la ramificación de los brotes al eliminar la dominancia apical, formándose 2 brotes nuevos. Siendo posible alcanzar una tasa de multiplicación de 1.8.

Se determinó que la mezcla de sustrato adecuada para obtener un mayor porcentaje de supervivencia es peat moss, agrolita y vermiculita en la proporción 2:2:1 (TA2), con la cual se mantiene la humedad adecuada para que no se presente pudrición en los brotes y estos comiencen su crecimiento y posterior desarrollo de las yemas axilares.

La mezcla debe ser esterilizada antes de utilizarla, así mismo, se deben sumergir los brotes en una solución fungicida (Captan 1.5 g l⁻¹) y colocar Radix 1500 ppm en la base de estos, luego que haber sido retirados los restos de medio de cultivo y cortados de 2 cm de longitud para su trasplante al sustrato humedecido.

9. Bibliografía

- Barbaro, L., Karlanian, M. y Mata, D. 2019. Importancia del pH y la Conductividad Eléctrica (CE) en los sustratos para plantas. INTA y CIRN. Argentina. En línea: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta - importancia del ph y la conductividad elctrica.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_-_importancia_del_ph_y_la_conductividad_elctrica.pdf) (Consultado 24 de mayo, 2019).
- Bhojwani, S. y Dantu, P. 2013. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer. India.
- Brown, B., Hart, J.M., Wescott, M.P. y Christensen, N.W. 2003. The critical role of nutrient management in Mint production. *Better Crops*. 87 (4), pp. 9-11.
- Burés, S. 1997. Sustratos. España: Ed. Ediciones Agrotécnicas. Pág. 49-258.
- Clark, R.J. y Menary, R.C. 1981. Variation in Composition of Peppermint Oil in Relation to Production Areas. *Economy Botany*. 35 (1), pp 59-69.
- Criley, R.A. 2008. Chapter 21. Rooting Cuttings of Tropical Plants. Plant propagation concepts and laboratory excercises ed. Beyl, A.C., Trigiano, R.N. CRC Press. Pp. 213-224.
- Cruz P., F. 2012. Micropropagación (Manual de prácticas). UNAM. Pág. 34.
- Cruz P., F. 2000. Niveles de sacarosa y relación $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ en el cultivo in vitro de vid (*Vitis vinifera*) 'Málaga Roja'. Tesis Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. de México, 78p.
- De Klerk, 2002. Rooting of microcuttings: Theory and practice. *In vitro cell*. 38, pp. 415-422.
- Delgado Arrollo, M.M., Miralles de Imperial Hornedo, R., Masaguer Rodriguez, A., Martín Sánchez, J.V. 2016. Estudio de turbas y residuos agrícolas procedentes de pollo de engorde como componente de sustratos de cultivo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 32 (4), 455-462.

- Dorado R., O. 2009. Cruza entre plantas: Hibridación. HYPATIA. Revista de Divulgación Científico Tecnológica del Gobierno del Estado de Morelos. 30 (9), En línea: https://www.revistahypatia.org/~revistah/index.php?option=com_content&view=article&id=301&Itemid=427 (Consultado 15 de mayo de 2019).
- Ellis, N.K. 1960. Peppermint and Spearmint Production. Economic Botany. 14 (4), pp. 280-285.
- ESPECIAMA (Especias de Amacuzac). 2019. Página principal. En línea: <http://www.especiama.com/> (Consultado 18 de abril de 2019).
- Facultad de Medicina UNAM. 2019. Cloranfenicol. Biblioteca Médica Digital. En línea: http://www.facmed.unam.mx/bmd/gi_2k8/prods/PRODS/Cloranfenicol%20Ung.htm (Consultado 18 de junio, 2019).
- FAO. 2019. FAOSTAT. En línea: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (Consultado 18 de abril de 2018).
- Fernández, J. 2001. Cultivo de plantas medicinales aromáticas y condimenticias. Ed. Omega. España. Pp. 190-194
- Flores F., G., Vega F., K. Aguirre L., R. y Valencia A., S. 2016. Hibridación y poliploidía en plantas. Ciencias. 120-121, pp. 76-85. En línea: <https://www.revistaciencias.unam.mx/es/202-revistas/revista-ciencias-120-121/1999-hibridaci%C3%B3n-y-poliploid%C3%ADa-en-plantas.html> (Consultado 15 de mayo, 2019).
- Frank, S.D. 1999. Botanicals: A phytocosmetic Desk Reference. USA: CRC Press. Pág. 361.
- García G., E. 2018. Mitigación del déficit hídrico en *Mentha spicata* L. con fertilizantes orgánicos, expresado en variables fisiológicas y de producción (tesis). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur.

- George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. (ed.). 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. 3a edición. Países bajos: Springer. pp. 29-64, 175-204.
- Guerrero, A. 2014. Organic production regulation. Recommendations for pest and disease management in vegetables in greenhouse. En Tello, J. y Camacho, F. (ed.) Organisms for the Control of Pathogens in Protected Crops. (pp. 43-76). En línea: https://www.researchgate.net/profile/Jeronimo_Perez-Parra/publication/236178464_TECNOLOGIA_DE_INVERNADEROS_Y_CONTROL_BIOLOGICO_TECNICAS_DE_CULTIVO_QUE_AFECTAN_A_LA_VIABILIDAD_DEL_CONTROL_BIOLOGICO_EN_LOS_INVERNADEROS_DE_ALMERIA/links/57dacd8508ae4e6f18437d61.pdf?origin=publication_list (Consultado 1 de junio, 2019).
- Héctor, E., Barrón, M., Godoy, L., Díaz, B., Hernández, M. y Torres, A. 2005. Un método para la desinfección y el establecimiento in vitro de la menta japonesa (*Mentha arvensis* L.). Cultivos Tropicales, 26(1), pp.69-71. En línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215916011> (Consultado 18 de junio, 2019).
- Heike, V. 2005. *Mentha x rotundifolia* L. (Huds). En línea: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiaceae/mentha-rotundifolia/fichas/ficha.htm> (Consultado 17 de febrero, 2019).
- Hidro enviroment. 2019. Peat moss. En línea https://hydroenv.com.mx/catalogo/index.php?main_page=product_info&cPath=80&products_id=1271&zenid=cdbc24c6b4837e8a68a98c9dbb12cdb (Consultado 13 de febrero, 2019).
- Hlava, B., Starý, F., Pospíšil, F. 1990. Natural beauty care with flowers and plants. Praga, Eslovaquia: Magna Books. Pág. 231.
- Islam, T., Dembele, P. y Keller, J. 2005. Influence of explant, temperature and different culture vessels on in vitro culture for germplasm maintenance of four mint accessions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (81), pp. 123-130.

- Islam, T., Leunufna, S., Dembele, P. y Keller, J. 2003. In vitro Conservation of Four Mint (*Mentha spp.*) Accessions. *Plant Tissue Culture* 13 (1), pp. 37-46. En línea: <https://www.researchgate.net/publication/228585965> In vitro Conservation of Four Mint Mentha spp Accessions (Consultado 20 de junio, 2019).
- ISO. (2006). International Standard ISO 856:2006 Oil of peppermint (*Mentha x piperita* L.). International Organization for Standardization. 15 de marzo de 2006.
- James, L. G. 1988. Principles of farm irrigation system design. USA: John Wiley.
- Jiménez, A. A.E., Rodríguez, M. M.A., López, A. P.L., López, M. L., Gutierrez, M. F.A. y Arias, C. C. 2012. Efecto de macronutrientes en la acumulación de (-) Mentol en el aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.) cultivado *in vitro* e invernadero. *Gayana Botanica* 69, pp. 101-108.
- Juárez R., C.R, Aguilar C., J.A., Juárez R., M.E., Bugarín M., R., Juárez L., P. Cruz C., E. 2013. Hierbas aromáticas y medicinales en México: Tradición e Innovación. *Revista Bio Ciencias*. 2 (3), pp. 119-129.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellog, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J. 2015. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. 4ª edición. USA: Sinauer Associates. Pág. 677.
- Kitto, S.L. 2015. Chapter 33. Micropropagation of Mint (*Mentha spp.*). En Beyl, C.A y Trigiano, R.N. (Ed.). *Plant Propagation Concepts and Laboratory Excercises*. (pp. 347-354). 5ª edición. USA: CRC Press.
- Lawrence, B. 2007. Mint. The genus *Mentha*. USA: CRC Press. Pág. 556.
- López, C. 1996. Vitrificación de plantas cultivadas *in vitro*. *Encuentros en la biología*. 1 (28). En línea: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros28/28vitrificacion.html> (Consultado 30 de julio, 2019).
- Mares, M. y Guerrero, V. 1998. Menta y Hierbabuena. Centro de Investigación Regional del Norte Centro, Campo Experimental Sierra de Chihuahua.

Desplegable para Productores Núm. 6. En línea: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/2279/Menta%20y%20hierbabuena.pdf?sequence=1> (Consultado 27 de mayo, 2019).

Mendoza, A. Vega, G. Soto, R. y Escandón, M. 2019. Recomendaciones técnicas para el cultivo de *Mentha arvensis* L. var *piperacens* Malinvaud. FAO. En línea: <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/5179/Recomendaciones%20t%C9cnicas%20%20para%20el%20cultivo%20de%20Mentha%20arvensis%20L.pdf> (Consultado 4 de junio, 2019).

Mendoza, A., Vega, G. y Escandón, R. 2011. Recomendaciones técnicas para el cultivo de *Mentha arvensis* L. var. *piperacens* Malinvaud (*Mentha* japonesa) en Cuba. FAO. En línea: <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/5179/Recomendaciones%20t%C9cnicas%20%20para%20el%20cultivo%20de%20Mentha%20arvensis%20L.pdf> (Consultado 24 de mayo, 2019).

Mendoza, A., Vega, G., Soto, R., Escandón, M.C. s/f. Recomendaciones técnicas para el cultivo de *Mentha arvensis* L. var *piperacens* Malinvaud. (*Mentha* japonesa) en Cuba. Estación Experimental de Aceites Esenciales. FAO.

Montezano, D., Specht, A., Bortolin, T., Fronza, E., Sosa, D., Roque, V., Pezzi, P., Luz, P. y Barros, N. 2013. Immature stages of *Spodoptera albula* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae): Developmental parameters and host plants. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 85 (1), pp. 271-284. En línea: <http://www.scielo.br/pdf/aabc/v85n1/0001-3765-aabc-85-01-271.pdf> (Consultado 23 de mayo, 2019).

Muñoz, F. 2002. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. España: Ediciones Mundi-Prensa.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia plantarum*, (15), pp. 473-497

- National Horticulture Board. 2019. Mint. India. En línea: <http://www.nhb.gov.in/Horticulture%20Crops/Mint/Mint1.htm> (Consultado 13 de marzo, 2019).
- Paudel, B. y Pant, B. 2008. Micropropagation of *Mentha spicata* L. Medicinal plants in Nepal: An Anthology of Contemporary Research. Pp. 101-106. En línea: https://www.researchgate.net/publication/259990847_MICROPROPAGATION_OF_MENTHA_SPICATA_L (Consultado 19 de junio, 2019).
- Pedraza, R. y Henao, M. 2008. Composición del tejido vegetal y su relación con variables de crecimiento y niveles de nutrientes en el suelo en cultivos comerciales de menta (*Mentha spicata* L.). Agronomía Colombiana. 26 (2), pp. 186-196.
- Phillips, G.C. y Hubstenger, J.F. 1995. Chapter 4. Micropropagation by Proliferation of Axillary Buds. En Gamborg, O.L., Philips y G.C. Plant cell, tissue and organ culture, fundamental methods. (pp. 45-54). Alemania: Springer.
- Phillips, G.C., Hubstenger, J.F., Hansen, E. 1995. Chapter 5. Adventitious shoot proliferation. En Gamborg, O.L., Philips y G.C. Plant cell, tissue and organ culture, fundamental methods. (pp. 55-65). Alemania: Springer.
- Pihl, K. 2012 (Sept. 24). Washington is No. 1 mint oil producer in U.S. Tri-City Herald. Local. En línea: <https://www.tri-cityherald.com/news/local/article32084385.html> (Consultado 19 de marzo, 2019).
- Ramawat, K.G. 2004. Biotechnology of medicinal plants: Vitalizer and therapeutic. USA: Science publishers. (Makri, O., Kintzios, S. (2004). Chapter 2. *In vitro* Rosmarinic Acid Production: An Update.
- Rech, E. y Pires, M. 1986. Tissue culture propagation of *Mentha* spp. by the use of axillary buds. Plant Cell Reports (5), pp. 17-18.
- Rita, P. y Animesh, D. 2011. An update overview on peppermint (*Mentha piperita* L.). International Research Journal of Pharmacy. 2 (8), pp. 1-10. En línea:

- https://irjponline.com/admin/php/uploads/vol-2_issue-8/1.pdf (Consultado 4 de junio, 2019).
- Robbers, J.E., Speedie, M.K., Tyler, V.E. 1996. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. USA: Williams & Wilkins.
- Romeu, C. y Rubio, M. 2012. Efecto antialimentario de aceites esenciales de plantas aromáticas sobre *Heliothis virescens* y *Spodoptera frugiperda*. Fitosanidad. 16 (3) pp. 155-159.
- Sánchez, J.L. 2006. México exporta su aroma a mercados de Asia y Europa. En línea: <http://fox.presidencia.gob.mx/buenasnoticias/?contenido=24299&pagina=104> (Consultado 15 de abril, 2019).
- Saran, B. S. y Kumar, D. P. 2013. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. India: Springer.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2017. Anuario Estadístico de la producción agrícola. En línea: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Consultado 19 de septiembre, 2018).
- Sistema de Información de Biodiversidad (SIB). 2019. *Mentha piperita*. En línea: https://sib.gob.ar/ficha/PLANTAE*mentha*piperita (Consultado 4 de Abril, 2019)
- Smith, R. 2013. Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. Elsevier. USA. Pp. 81-92.
- Taiz, L., Zeiguer, E., Moller, I.M., Murphy, A. 2015. Plant physiology and development. 6ta edición. USA, Sinauer Associates.
- Teixeira, H. 2015. Assessment of mint (*Mentha* spp.) species for large-scale production of plantlets by micropropagation. Acta Scientiarum. Biological Sciences, 37 (4), pp. 405-410.

- The plant List. 2010. Versión 1. En línea: <http://www.theplantlist.org/browse/A/Lamiaceae/Mentha/> (Consultado 17 de febrero, 2019).
- Tisserat, B. y Vaughn, S.F. 2008. Growth, Morphogenesis, and Essential Oil Production in *Mentha spicata* L. Plantlets in vitro. In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant. 37 (1), pp. 50-40.
- Tsvetanova, F. Vicente, G. Fornari, T. 2014. Recuperación de ácido rosmarínico a partir de plantas de la familia Lamiaceae. En línea: <http://hdl.handle.net/10261/115431> (Consultado 16 de mayo, 2019).
- Valencia, S., Martínez, M, Cruz, R., Jiménez, J. y Rodríguez, E. 2012. Glosario ilustrado de embriofitas. UNAM, México. Pp. 37.
- Vázquez, C., Orozco, A., Rojas, M., Sánchez, M. y Cervantes, V. 1997. La reproducción de las plantas: Semillas y meristemas. Fondo de Cultura económica. México. En línea: http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/157/htm/sec_6.htm (Consultado 18 de junio, 2019).
- Villegas, L. 2016. Componentes para el manejo integrado de plagas de *Mentha spicata* en cultivos del oriente Antioqueño (Tesis). Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. En línea: http://bdigital.unal.edu.co/55147/1/102040_4894.2016.pdf (Consultado 3 de Junio, 2019).
- Wang, X., Gao, Z. Wang, Y., Bressan, R.A., Weller, S.C. Y Li, X. 2009. Highly efficient *in vitro* adventitious shoot regeneration of peppermint (*Mentha x piperita* L.) using internodal explants. In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant. 45 (4), pp. 435-440.
- Zapata, J. y Fernández, G. 1999. Micropropagación de plantas de *Mentha piperita* y evaluación de sus constituyentes volátiles. Revista Colombiana de Biotecnología, 2 (1), pp. 16-22.

ANEXOS

Anexo 1 . Composición del medio de cultivo Cruz Pizarro

Medio de cultivo Cruz-Pizarro (2000)				
Compuesto	Cantidad en solución concentrada	mL de solución concentrada	50% alícuota	100% alícuota
NH ₄ NO ₃ Nitrato de amonio	9 g*	50 ml	2.5	5
KNO ₃ Nitrato de potasio	13 g*	50 ml	2.5	5
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O Nitrato de calcio	6 g*	50 ml	2.5	5
MgSO ₄ *7H ₂ O Sulfato de magnesio heptahidratado	3.7 g	50 ml	2.5	5
KH ₂ PO ₄ Fosfato diácido de potasio	1.7 g	50 ml	2.5	5
KI Ioduro de Potasio	8.3 mg	50 ml	2.5	5
H ₃ BO ₃ Ácido bórico	62 mg	50 ml	2.5	5
MnSO ₄ *4H ₂ O Sulfato de manganeso tetrahidratado	223 mg	50 ml	2.5	5
ZnSO ₄ *7H ₂ O Sulfato de zinc heptahidratado	86 mg	50 ml	2.5	5
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O Molibdato de sodio dihidratado	2.5 mg	50 ml	2.5	5
CuSO ₅ *5H ₂ O Sulfato de cobre pentahidratado	0.25 mg	50 ml	2.5	5
CoCl ₂ *6H ₂ O Cloruro de cobalto hexahidratado	0.25 mg	50 ml	2.5	5
FeSO ₄ *7H ₂ O Sulfato de hierro septahidratado	278 mg	50 ml	2.5	5
Na ₂ EDTA*2H ₂ O Sodio EDTA dihidratado	373 mg	50 ml	2.5	5
Mioinositol	1 mg*	100 ml	10	10
Ácido nicotínico	10 mg*	50 ml	2.5	2.5
Piridoxina HCl	10 mg*	50 ml	2.5	2.5
Tiamina	2 mg*	50 ml	2.5	2.5

* Las modificaciones hechas al medio Murashige Skoog son en la cantidad añadida al medio por cada litro de: NH₄NO₃ 9 g en lugar de 1.65 g, KNO₃ 13 g en lugar de 19 g, 6 g de Ca(NO₃)₂*4H₂O en lugar de 3.3 g de CaCl₂, ácido nicotínico 10 mg en lugar de 5 mg, piridoxina 10 mg en lugar de 5 mg, tiamina 2 mg en lugar de 1, se omite la glicina, el inositol cambia por 1 mg de mioinositol.

(Cruz, 2012)

Anexo 2. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *Mentha x piperita* L.

Componentes	Origen distinto a Estados Unidos		Procedente de Estados Unidos	
	Min. (%)	Máx. (%)	Min. (%)	Máx. (%)
3-Octanol	0.1	0.5	0.1	0.4
1, 8-Cineol	3.0	8.0	4.0	6.0
Limoneno*	1.0	3.0	1.0	2.5
Trans-Sabineno	0.5	2.0	0.5	2.3
Mentona	13.0	28.0	15.0	25.0
Isomentona	2.0	8.0	2.0	4.5
Mentofuran	1.0	8.0	1.5	6.0
Neomentol	2.0	6.0	2.5	4.5
Mentol	32.0	49.0	36.0	46.0
Pulegon	0.5	3.0	0.5	2.5
Mentil acetato**	2.0	8.0	3.0	6.5
β -Cariofileno	1.0	3.5	1.0	2.5

* El limoneno considerado como predominante es L-limoneno de acuerdo a pruebas físicas. Se cree que podría hacer una pequeña cantidad de D-mentil acetato presente pero la cantidad exacta es desconocida.

** El mentil acetato considerado como predominante es L-mentil acetato de acuerdo a pruebas físicas. . Se cree que podría hacer una pequeña cantidad de D-Limoneno presente pero la cantidad exacta es desconocida.

(ISO, 2006)