

# UN MÉTODO PARA LA DESINFECCIÓN Y EL ESTABLECIMIENTO *In Vitro* DE LA MENTA JAPONESA (*Mentha arvensis* L.)

E. Héctor<sup>✉</sup>, Martha L. Barrón, Lianette Godoy, B. Díaz, María M. Hernández y A. Torres

**ABSTRACT.** The *Mentha* genus constitutes an important source of raw material for several industries as perfumery, cosmetics, distillery and pharmacy. In the state of Chihuahua, Mexico, several species from this genus have been recently introduced with commercial aims, and *in vitro* propagation has been used with relative success in the massive multiplication of one of them. The occurrence of endogenous contaminations has been a problem for *in vitro* establishment of these and some other commercial species. A method for disinfection and *in vitro* establishment of explants from *Mentha arvensis* L. is reported after a previous detection of two bacteria genera (*Streptobacillus* and *Enterobacter*) abundantly present in explants from this species. The method is based on the combination of employing of chloramphenicol in a treatment previous to implantation and as a constituent of the culture medium, which allowed to obtain 65 % microorganism-free explants. The causes for the presence of contamination in explants from *M. arvensis* L. are discussed, and the method for its application in other species of *Mentha* is recommended.

**Key words:** *Mentha*, tissue culture, antibiotics, micropropagation

**RESUMEN.** El género *Mentha* constituye una importante fuente de materia prima para varias industrias como la perfumería, cosmética, licorería y farmacéutica. En el estado de Chihuahua, México, se han introducido en los últimos años varias especies de este género con propósitos comerciales, y se ha empleado con relativo éxito la propagación *in vitro* en la multiplicación masiva de una de ellas. La ocurrencia de contaminaciones endógenas ha sido un problema para el establecimiento *in vitro* de esta y otras especies comerciales. En este trabajo se presenta un método para la desinfección y el establecimiento *in vitro* de explantes de *Mentha arvensis* L., después de una previa detección de dos géneros de bacterias (*Streptobacillus* y *Enterobacter*) presentes en abundancia en los explantes de esta especie. El método se basa en la combinación del empleo de cloranfenicol en un tratamiento previo a la implantación y como constituyente del medio de cultivo, y permitió la obtención de un 65 % de explantes libres de microorganismos. Se discuten las causas de la presencia de contaminación en los explantes de *M. arvensis* L. y se recomienda el método para su aplicación en otras especies de *Mentha*.

**Palabras clave:** *Mentha*, cultivo de tejidos, antibióticos, micropropagación

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de las mentas (*Mentha* spp.) es de gran importancia para la utilización de sus aceites esenciales como materia prima en diferentes industrias como la perfumería, cosmética, licorería y farmacéutica en el ámbito mundial (1). En el estado de Chihuahua, México, se han introducido en los últimos años varias especies del género *Mentha* con propósitos comerciales, y se ha empleado con relativo éxito la propagación *in vitro* en la multiplicación masiva de *Mentha x gracilis* var. Scotch (2).

Un obstáculo a la propagación de estas especies, sobre todo en la etapa de establecimiento *in vitro*, es la

aparición de abundantes contaminaciones causadas por hongos y bacterias, posiblemente por su hábito de crecimiento y escaso porte; esta situación ha motivado la puesta a punto de protocolos de desinfección y establecimiento particularizados para cada especie, y la prueba de productos fungicidas y bactericidas específicos para los microorganismos presentes en cada caso (3).

Este trabajo se propuso como objetivo el establecimiento de un método para la desinfección y el establecimiento *in vitro* de explantes de menta japonesa (*Mentha arvensis* L.), con vistas a su futura propagación comercial y extensión en las áreas agrícolas del estado de Chihuahua.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los explantes, consistentes en segmentos nodales de plantas de *M. arvensis* L. aparentemente sanas, procedían de una plantación comercial privada en Delicias, Chihuahua, establecida sobre suelos vertisoles pélicos. Los trabajos se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la UACH, en la misma localidad.

Dr.C. E. Héctor, Profesor Auxiliar, Ms.C. Lianette Godoy y B. Díaz, Profesores Instructores y Dr. C. A. Torres, Profesor Titular del Grupo de Biotecnología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana; Ms.C. Martha L. Barrón, Profesor de la Brigada de Educación para el Desarrollo Rural No. 5, Rosales, Chihuahua, México; Dr.C. María M. Hernández, Investigador Titular del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP32700, Cuba

✉ efidel@isch.edu.cu

Se desarrolló un experimento inicial consistente en la desinfección e implantación, según el método recomendado (2).

La aparición de abundantes contaminaciones bacterianas en este experimento determinó la clasificación de estos microorganismos y la realización de antibiogramas, para lo cual se empleó la metodología de Barry y Thornsberry (4) con el sistema de Multidiscos® suministrado por *Sanofi Diagnostics Pasteur*, S.A. De acuerdo con esta misma metodología, para la interpretación de los resultados se clasificaron los microorganismos en resistentes (R), ligeramente sensibles (LS) o ampliamente sensibles (AS) a los antibióticos ensayados.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este ensayo, se probaron cuatro tratamientos desinfectantes:

- desinfección sucesiva de los explantes con alcohol 70 % (1 min) y solución de hipoclorito de sodio (base comercial 5.5 %) al 15 % (10 min), e implantación en medio de Murashige y Skoog (2, 5).
- desinfección similar a la anterior e implantación en medio de Murashige y Skoog (5) suplementado con cloranfenicol (30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de medio de cultivo)
- sumersión previa de los explantes en solución de cloranfenicol (2.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) durante cuatro horas, desinfección como se ha descrito e implantación en medio de Murashige y Skoog (5)
- sumersión previa de los explantes en solución de cloranfenicol (2.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) durante cuatro horas, desinfección como se ha descrito e implantación en medio de Murashige y Skoog (5) suplementado con cloranfenicol (30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de medio de cultivo).

Se utilizaron 20 explantes por tratamiento, y la presencia de microorganismos se evaluó visualmente a los siete días de la implantación en el medio de cultivo. Se determinaron los porcentajes de contaminación por bacterias y hongos, así como el porcentaje de explantes sanos en cada tratamiento.

En el mismo momento se evaluó la fitotoxicidad de los tratamientos. Para ello se tomó como base de cálculo (explantes al inicio) la cantidad de explantes efectivamente desinfectados en los tratamientos. Por esta razón, dicha evaluación se llevó a cabo solamente en los tratamientos B, C y D. Se determinaron visualmente las cantidades de explantes muertos por toxicidad y de explantes vivos, y se calcularon los porcentajes de toxicidad y de supervivencia en cada caso. Para el análisis estadístico de los datos se empleó la Q de Cochran.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método de desinfección e implantación recomendado (2) había permitido obtener un 60 % de desinfección en explantes de *Mentha x gracilis* var. Scotch. Sin embargo, una vez aplicada esta técnica, en los explantes de *M. arvensis* L. se observó la aparición persistente de colonias de bacterias de color amarillento-rosado en un 92 % de los casos.

El aislamiento y cultivo de los microorganismos observados en los medios de cultivo de explantes permitió determinar la presencia de bacterias de los géneros *Streptobacillus* y *Enterobacter*. Llama la atención que ambos tipos de bacterias son propios del tracto intestinal de animales, por lo que es posible que su presencia en el suelo se deba a la contaminación de este con aguas negras. Puesto que la colecta de explantes se realizó en la temporada lluviosa, la abundancia de estos microorganismos y su presencia en las plantas contaminadas pudiera tener su causa en las salpicaduras procedentes de las precipitaciones y en los escurrimientos superficiales. Se realizaron los experimentos en el período seco y posiblemente sea esa la causa de que hayan obtenido un 60 % de explantes sanos (2).

Por lo general, las plantaciones de menta en el estado de Chihuahua están en áreas de pequeños productores que combinan esta actividad con el cultivo de otras especies vegetales y la ganadería, por lo que es de esperar la aparición de microorganismos similares en explantes procedentes de otras áreas. De ser así, los procedimientos que a continuación se detallan podrían ser válidos para su empleo en otros casos.

En las Tablas I y II se presentan los resultados de los antibiogramas realizados a los cultivos de *Streptobacillus* y *Enterobacter* aislados de los explantes. El hecho de que ambas bacterias aparecieran casi siempre juntas en los explantes contaminados condicionaba la necesidad de utilizar una estrategia de combate simultánea. Los resultados muestran que ambos microorganismos comparten una amplia sensibilidad solo a la amikacina y el cloranfenicol; el menor costo de adquisición de este último antibiótico determinó su empleo en el experimento de prueba de métodos de desinfección.

**Tabla I. Sensibilidad de *Streptobacillus* frente a los antibióticos ensayados**

Penicilina <b>R</b>	Cloranfenicol <b>AS</b>	Tetraciclina <b>R</b>	Ceftriaxona <b>LS</b>
Eritromicina <b>R</b>	Netilmicina <b>AS</b>	Gentamicina <b>LS</b>	Ampicilina <b>R</b>
Carbencilina <b>LS</b>	Amikacina <b>AS</b>	Cefotaxima <b>LS</b>	Nitrofuranos <b>R</b>
Pefloxacina <b>AS</b>	Sulfametoxazol <b>AS</b>	Cefalexina <b>R</b>	

**Tabla II. Sensibilidad de *Enterobacter* frente a los antibióticos ensayados**

Penicilina <b>R</b>	Cloranfenicol <b>AS</b>	Tetraciclina <b>R</b>	Ceftriaxona <b>R</b>
Eritromicina <b>R</b>	Netilmicina <b>LS</b>	Gentamicina <b>LS</b>	Ampicilina <b>LS</b>
Carbencilina <b>AS</b>	Amikacina <b>AS</b>	Cefotaxima <b>AS</b>	Nitrofuranos <b>R</b>
Pefloxacina <b>R</b>	Sulfametoxazol <b>R</b>	Cefalexina <b>LS</b>	

AS: Ampliamente sensible

LS: Ligeramente sensible

R: Resistente

De forma general (Tabla III), se observó que las mayores contaminaciones en todo el experimento se debieron a la presencia de bacterias, solas o en combinación con los hongos; menores porcentajes correspondieron a la contaminación causada solamente por hongos, posiblemente alojados en las yemas envueltas por primordios foliares, donde la desinfección es poco efectiva.

**Tabla III. Efecto de los tratamientos sobre la desinfección de explantes de *M. arvensis***

Tratamientos	PCB	PCH	PCBH	PES
A	95.00 a	0.00 b	5.00 b	0.00 c
B	60.00 b	0.00 b	25.00 a	15.00 bc
C	30.00 c	20.00 a	20.00 ab	30.00 b
D	5.00 d	25.00 a	5.00 b	65.00 a

PCB: Porcentaje de contaminación por bacterias

PCH: Porcentaje de contaminación por hongos

PCBH: Porcentaje de contaminación por bacterias y hongos

PES: Porcentaje de explantes sanos

La no utilización de cloranfenicol en ninguna de las fases del procedimiento (tratamiento A, control) impidió la obtención de explantes sanos. El tratamiento B (desinfección convencional y cloranfenicol en el medio de cultivo) permitió obtener un 15.0 % de explantes sanos. Una exposición previa al antibiótico (tratamientos C y D) condujo a resultados superiores. Finalmente, la combinación de la exposición previa al cloranfenicol y su presencia como constituyente en el medio de cultivo (tratamiento D) rindió un 65.0 % de explantes sanos, resultado similar o ligeramente superior al 60 % obtenido en *Mentha x gracilis* var. Scotch (2).

El análisis de la Tabla IV permite comprender que si bien el tratamiento B alcanzó un 100 % de supervivencia y no hubo diferencias significativas entre los dos restantes, estos datos están condicionados por la cantidad de explantes sanos en el momento de la evaluación, que depende de la eficiencia de la desinfección lograda por cada tratamiento.

**Tabla IV. Efecto de los tratamientos sobre la supervivencia de los explantes**

Tratamiento	Explantes al inicio	Explantes muertos	Toxicidad (%)	Explantes vivos	Supervivencia (%)
B	3	0	0	3	100.0 a
C	6	1	16.7	5	83.3 b
D	13	2	15.4	11	84.6 b

Sobre esta base, el método de desinfección que combina la aplicación del cloranfenicol en tratamiento previo y en el medio de cultivo (tratamiento D) es el más recomendable por su elevada eficiencia de desinfección con respecto a los restantes y por la baja fitotoxicidad (15.4 %) causada por el antibiótico en la concentración empleada.

En otras especies de bajo porte como *Petunia hybrida* (6) y *Allium sativum* L. (7), no ha sido necesaria la aplicación de antibióticos; sin embargo se ha precisado la desinfección de los explantes con fungicidas como el Agrimicin, Bavistin y Cupravit. En cambio, en el género *Mentha*, la aplicación de antibióticos parece ser una condición esencial (3, 8) para la obtención de material libre de

microorganismos, y en ocasiones llega a ser necesario aplicar un doble tratamiento a tejidos ya establecidos *in vitro* hasta en un 40 % de los casos (3). Experiencias obtenidas por los propios autores de este trabajo (n.p.) confirmaron la presencia de los mismos géneros de microorganismos en explantes de *Mentha x gracilis* var. Scotch, *M. piperita* L. y *Mentha arvensis* L. procedentes de tres localidades diferentes aunque relativamente cercanas, lo que puede deberse a contaminaciones por las precipitaciones, el agua de riego, la diseminación de estas bacterias por el material de propagación, u otras posibles causas aún por investigar. Sobre esta base, el método propuesto puede ser útil también en la desinfección y el establecimiento *in vitro* de explantes de otras especies de *Mentha*, ya sea con el empleo del cloranfenicol o de otros antibióticos, en dependencia de la detección de otros microorganismos contaminantes.

## CONCLUSIONES

- \* En los explantes de *Mentha arvensis* L. desinfectados con etanol e hipoclorito de sodio, aparecieron abundantes contaminaciones con bacterias de los géneros *Streptobacillus* y *Enterobacter*.
- \* El empleo combinado del cloranfenicol en un tratamiento previo a los explantes y como constituyente del medio de cultivo permitió obtener un 65.0 % de explantes sanos, con baja fitotoxicidad (15.4 %).

## REFERENCIAS

1. Gutiérrez, R.; Avila, M. R. y Jacobo, J. L. Avances de la producción del aceite de menta en el noroeste de Chihuahua. INIFAP. *Folleto Técnico*, 1999, no. 11, p. 18.
2. Barrón, M. L. y Héctor, E. Propagación *in vitro* de *Mentha x gracilis* var. Scotch. Resúmenes del Congreso Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico Agropecuario DGTA (11:2000:Tabasco), 2000. p. 39.
3. Reed, B. M.; Buckley, P. M. y Dewilde, T. N. Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 1995, vol. 31, no. 1, p. 53-57.
4. Barry, A. y Thornsberry, C. Susceptibility diffusion test procedures. En: *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology. 1985. p. 978-987.
5. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, p. 431-497.
6. Zavala, M. J.; Amescua, J. M.; Villanueva, E. y Pinzón, L. L. Establecimiento *in vitro* de *Petunia (Petunia hybrida)* a partir de segmentos nodales. En: Resúmenes del Congreso Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico Agropecuario DGTA (11:2000:Tabasco), 2000, p. 38.
7. Chablé, F.; Reyes, H.; Martínez, J. M.; González, J. R.; Laborde, J. A. y Escobedo, L. Formación de callo para embriogénesis a partir de ápices vegetativos de ajo (*Allium sativum* L.). En: Resúmenes del Congreso Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico Agropecuario DGTA (11:2000:Tabasco), 2000. p. 54.
8. Reed, B. M. *In vitro* storage conditions for mint germplasm. *Hort. Sci.*, 1999, vol. 34, no. 2, p. 350-352.

Recibido: 18 de marzo de 2004

Aceptado: 18 de noviembre de 2004