



Menta (*Mentha arvensis* L.) micro and macropropagation

Micro y macropagación de menta (*Mentha arvensis* L.)

Vacca-Molina M.^{1*}, Velásques J.D.¹, Bonomo M.L.C.², Avilés Z.J.¹.

Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias Naturales ¹Cátedra de Fisiología Vegetal,
²Cátedra de Introducción a la Biología, Avda. Bolivia 5150 Salta, Argentina.

ABSTRACT

This work aims to develop two mint (*Mentha arvensis* L.) seedling production methodologies through micropropagation and macropropagation cuttings. In micropropagation the auxins naphthalene acetic acid (NAA), indole butyric (IBA) and indole acetic acids (IAA) at 0.01, 0.1 and 1 mg L⁻¹ were evaluated independently. Contamination of 8 % was recorded. The number of roots presented statistically significant differences amongst the treatments. A 1:8 rate of multiplication was reached. A 100 % of the explants survived along acclimation. In macropropagation NAA, IBA and Nafusaku, at 10, 25 and 50 mg L⁻¹ respectively, were evaluated. A 100% rooting was scored in all treatments. In the substrate perlite: sand: earthworm compost (1:1:1), a root system with more than 6 roots larger than 1 cm in length and larger total biomass was achieved.

KEY WORDS

Mint, propagation, rooting, vitroplants.

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: October 26th 2014.

Accepted/Aceptado: December 19th 2014.

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar dos metodologías de producción de plantines de menta (*Mentha arvensis* L.) a través de micropropagación y macropropagación por esquejes. En micropropagación, se evaluaron en forma independiente ácido naftalenacético (ANA), indolbutírico (AIB) e indolacético (AIA) a 0.01, 0.1 y 1 mg L⁻¹. Se registró una contaminación del 8 %. El número de raíces presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Se alcanzó una tasa de multiplicación de 1:8. Durante aclimatación el 100 % de los explantos sobrevivieron. En macropropagación, se evaluaron ANA, AIB y Nafusaku, a 10, 25 y 50 mg L⁻¹ respectivamente. Se logró el 100 % de enraizamiento en todos los tratamientos. En el sustrato perlita:arena:lombricompuesto (1:1:1), se logró un sistema radicular con más de 6 raíces mayores a 1 cm de longitud y mayor biomasa total.

PALABRAS CLAVE

Enraizamiento, menta, propagación, vitroplantas.

Introducción

Los cultivos de plantas aromáticas y medicinales han sido considerados de gran interés social, cultural, culinario y medicinal, pero de escaso o nulo

*Corresponding Author:

Vacca-Molina M. Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias Naturales, Cátedra de Fisiología Vegetal, Avda. Bolivia 5150 Salta – Argentina. Phone: +54(387) 425 5432. Fax: +54(387) 425 5455. E-mail: vaccam@unsa.edu.ar

Introduction

Aromatic and medicinal plant crops have been considered of great social, cultural, culinary and medicinal interest but in scarce or null economic value. They are crops of great capacity to generate labor, added value and to improve local and regional economies. Currently, in developed countries, production of aromatic and medicinal species has decreased and the consumption and commerce have increased. Its growth represents an alternative to traditional agricultural production, helping to stop migration from the fields to the city, and generating a new source of economic activity.

Mentha arvensis L., is a perennial plant that does not produce seeds; it reproduces through cuttings, it is industrially grown for the extracted oil from its leaves (menthol). At the moment of the harvest, plants are collected and then dried, the dried material is then put through a distillation process in order to recover the oil (Brown *et al.*, 2003). Natural menthol is extensively used in feeding and in the pharmaceutical and cosmetic industries (Suresh *et al.*, 2012). Worldwide production of menthol is estimated around 20 000 t. China, India, Brazil, Japan, France and the United States are the higher producers of essential oil of *Mentha arvensis* L. The most important importers are United States, Germany and Japan (Srivastava *et al.*, 2002).

Due to its wide territory of natural and human resources, Argentina is in condition to enable the production of a great variety of aromatic crops. In 2012, 230.3 t of mint were imported (Cameroni, 2012). In the province of Salta (Argentina), the growth of mint (*M. arvensis* L.) has potential to become in a feasible productive alternative for the region of Valle de Lerma and up to the Valles Calchaquíes (Arizio, 1999). Performance of normal quality oil of up to 90 Kg ha⁻¹ in two crop cuts has been reached in the zone (Camisa, 1990). Nevertheless, this activity is still far from reaching its potential development because it is performed by small producers, who lack information and technology, with low quality and performance. One of the main obstacles that the productive activity faces is the lack of reproductive material with genetic quality in order to guarantee yields and oil quality.

One of the possible technologies that can be applied to improve mint production is the obtaining of

valor económico. Son cultivos con capacidad para generar empleo, valor agregado y para mejorar la economía local y regional. Actualmente en los países desarrollados la producción de especies aromáticas y medicinales ha descendido y el consumo y comercio han aumentado. Su cultivo representa una alternativa a la producción agrícola tradicional, ayudaría a frenar la migración del campo a la ciudad y generaría una nueva fuente de actividad económica.

La *Mentha arvensis* L., es una planta perenne que no produce semillas, se reproduce por esquejes y es cultivada industrialmente por el aceite extraído de las hojas (mentol). Al momento de la cosecha se recolectan las plantas y se secan, luego el material seco pasa por un proceso de destilación para recuperar el aceite (Brown *et al.*, 2003). El mentol natural es extensamente utilizado en alimentación, en la industria farmacéutica y cosmética (Suresh *et al.*, 2012). La producción mundial de mentol se estima en alrededor de 20 000 t. China, India, Brasil, Japón, Francia y Estados Unidos son los mayores productores de aceite esencial de *Mentha arvensis* L. Los importadores de mayor envergadura son Estados Unidos, Alemania y Japón (Srivastava *et al.*, 2002).

Argentina, debido a su vasto territorio de recursos naturales y humanos, está en condiciones de posibilitar la producción de una amplia variedad de cultivos aromáticos. En el año 2012, se importaron en el país 230.3 t de menta (Cameroni, 2012). En la provincia de Salta (Argentina), el cultivo de menta (*M. arvensis* L.) tiene potencial para convertirse en una alternativa productiva viable para la región del Valle de Lerma y hasta de los Valles Calchaquíes (Arizio, 1999). En la zona se ha alcanzado rendimiento de aceite de calidad normal de hasta 90 Kg ha⁻¹ en dos cortes (Camisa, 1990). Sin embargo, esta actividad aún está lejos de alcanzar su desarrollo potencial, debido a que es realizada por pequeños productores con poca información y tecnología; con bajos rendimientos y calidad. Uno de los principales obstáculos que enfrenta la actividad productiva es la carencia de material reproductivo con calidad genética para garantizar rendimientos y calidad de aceite.

Una de las posibles tecnologías que se pueden emplear para mejorar la producción de menta, es la obtención de plantines por métodos de propagación por esquejes (macropropagación) y micropropagación. La propagación por esquejes permite obtener un clon con las mismas

seedlings through propagation methods by cuttings (macropropagation) and micropropagation. Propagation through cuttings enables to obtain a clone with the same genetic characteristics as the mother plant. In addition, it is a simple, fast and low cost technique, therefore, readily available, for both the small producer and the businessman. Micropropagation constitutes one of the technological methods that has provided greater achievements to the development of new agriculture. Within the uncountable advantages that micropropagation possesses in respect with conventional propagation, we can find: the reduced space needed to produce an important number of plant from an explant and assuring the production of plants with controlled sanity (mainly virus free) (Roca, 1991). Mint is an easy rooting species, with micropropagation it is feasible to reproduce it massively and more quickly than with conventional means. This work aims to develop two production methodologies of mint seedlings (*M. arvensis* L.) through micropropagation and macropropagation by cuttings, the latter representing an accessible technology to be implemented by small producers.

Materials and Methods

I. Obtaining of mother plants

Cuttings of *M. arvensis* L. (Japanese mint) of 10 cm length, selected by absence of necrotic leaves and no symptoms of water deficit were used, which were rooted during September 2012 in greenhouses from the Department of Vegetal Physiology of Natural Sciences School – National University of Salta – Argentina (24°47'18"S 65°24'38" W). 8 m² stonemasons were used, coated with black plastic of 100 microns thick and containing a substrate composed by organic soil, peat, perlite and sand, in a proportion 1:1:1:1. Manual watering were made every three days. Environmental conditions in this phase were 60 % relative humidity (RH) and an average temperature of 25°C. Obtained mother plants were treated with Carbendazim in 1mL L⁻¹ and Cypermethrin at 1.5mL L⁻¹ doses, in regular pulverizations every 15 days, in order to assure adequate sanitary conditions for posterior tests.

II. Micropropagation tests

To obtain the explants in the greenhouse, mint stems were cut from five to six nodes. In the Laboratory

características genéticas que la planta madre. Además es una técnica sencilla, rápida y de bajo costo; por lo tanto de fácil acceso, tanto para el pequeño productor como para el empresario. La micropropagación constituye uno de los métodos tecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de una nueva agricultura. Dentro de las innumerables ventajas que posee la micropropagación con respecto a la propagación convencional, se encuentran: el reducido espacio que se necesita para producir un importante número de plantas a partir de un explanto y la de asegurar la producción de plantas con sanidad controlada (sobre todo libre de virus) (Roca, 1991). La menta es una especie de fácil enraizamiento, por lo que es factible reproducirla de manera masiva y más rápida a través de micropropagación que por medios convencionales. El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar dos metodologías de producción de plantines de menta (*M. arvensis* L.) a través de micropropagación y macropropagación por esquejes, representando esta última una tecnología accesible para implementar por pequeños productores.

Materiales y Métodos

I. Obtención de plantas madre

Se emplearon esquejes de *M. arvensis* L. (menta japonesa) de 10 cm de longitud, seleccionados por ausencia de hojas necrosadas y sin síntomas de déficit hídrico, los cuales se enraizaron durante el mes de septiembre del año 2012 en invernaderos de la Cátedra de Fisiología Vegetal, de la Facultad de Ciencias Naturales-Universidad Nacional de Salta-Argentina (24°47'18"S 65°24'38" O). Se utilizaron canteros de 8 m², revestidos con plástico negro de 100 micrones de espesor y conteniendo un sustrato compuesto por suelo orgánico, turba, perlita y arena, en una proporción 1:1:1:1. Se efectuaron riegos manuales cada tres días. Las condiciones ambientales en esta etapa fueron de 60 % de humedad relativa (HR) y una temperatura promedio de 25 °C. Las plantas madres así obtenidas se trataron con Carbendazim en dosis de 1mL L⁻¹ y Cipermetrina a 1.5 mL L⁻¹, en pulverizaciones regulares cada 15 días, a fin de asegurar adecuadas condiciones sanitarias para los ensayos posteriores.

II. Ensayos de Micropropagación

Para la obtención de los explantos en invernadero, se cortaron tallos de menta con cinco a seis

of Growth of Vegetal Tissue from the Natural Sciences School – National University of Salta – Argentina, nodal segments were selected one cm above and below the node. Two disinfections were made. The first one with distilled water plus four drops of Tween 20, under agitation during 10 minutes, followed by distilled water plus PURSUE® (quaternary ammonium) at 25 % (V/V) under agitation during 15 minutes followed by wash with tube water. Second disinfection was applied in laminar flow bench in aseptic conditions, which consisted of immersion in alcohol 70 % during one minute, followed by sodium hypochlorite (NaOCl) at 5 % (W/V) + 4 drops of Tween 20 during 15 minutes and repeated washing with sterile distilled water. Once the disinfection processes concluded, explant planting was performed. For the planting, the culture medium of Murashige and Skoog (MS, 1962) (Conger, 1987) was used. The mediums were gelled with 7 g L⁻¹ of agar – agar, adding 0.1 g L⁻¹ de myo-inositol and 30 g L⁻¹ of sugar. The pH of the mediums was adjusted at seven and sterilized by autoclaving during 20 minutes at 1.5 atmospheres of pressure. The effect of three auxins was analyzed independently: naphthalene acetic (NAA), indole butyric (IBA) and indole acetic acids (IAA), in three concentrations (0.01; 0.1 and 1 mg L⁻¹) each and a control treatment with no auxin was used. Once the culture mediums were sterilized, the planting of nodal explants followed. Bottles with 20 mL of culture medium containing an explant were placed in illuminated shelves (36.15 μmol m⁻² s⁻¹) with photoperiod of 16 h and temperature of 21°C ± 2 °C.

After two weeks, the following was evaluated: contamination percentage, number of nodes, number of branches, number of roots and multiplication rate (n° of initial nodes/n° of final nodes) (Chamorro *et al.*, 2007). In order to characterize the rooting system, a qualitative classification of it was made by applying the next classification criteria: scarce Roots = 1-3 roots larger than a cm of length; medium Roots = 4-6 roots larger than a cm length and abundant Roots = more than 6 roots larger than a cm length. A Completely Randomized Design (CRD) was applied with 12 repetitions per treatment, considering one bottles of explant as experimental unit. Tukey test was used to compare measures. The acclimation of vitroplants was performed under humid chamber at room temperature in trays containing perlite. The percentage of survival was evaluated in this phase.

nudos. En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Naturales-Universidad Nacional de Salta-Argentina, se seccionaron los segmentos nodales, un cm por encima y por debajo del nudo. Se realizaron dos desinfecciones. La primera con agua destilada mas cuatro gotas de Tween 20, bajo agitación durante 10 minutos, seguida por agua destilada mas PURSUE® (amonio cuaternario) al 25 % (V/V) bajo agitación durante 15 minutos y posterior lavado con agua corriente. La segunda desinfección se aplicó en cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, la cual consistió en inmersión en alcohol 70 % durante un minuto, seguida por hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5 % (P/V) + 4 gotas de Tween 20, durante 15 minutos y lavado reiterado con agua destilada estéril. Una vez concluido con los procesos de desinfección se llevó a cabo la siembra de los explantos. Para la siembra se empleó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS, 1962) (Conger, 1987). Los medios fueron gelificados con 7 g L⁻¹ de agar – agar, adicionando 0.1 g L⁻¹ de myo-inositol y 30 g L⁻¹ de azúcar. El pH de los medios se ajustó a siete y se esterilizaron en autoclave, durante 20 minutos a 1.5 atmósferas de presión. Se analizó en forma independiente el efecto de tres auxinas: ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) y ácido indolacético (AIA), en tres concentraciones (0.01; 0.1 y 1 mg L⁻¹) cada uno y se empleó un tratamiento testigo sin auxina. Una vez esterilizados los medios de cultivo, se procedió a la siembra de los explantos nodales. Los frascos con 20 mL de medio de cultivo conteniendo un explanto se dispusieron en estantes iluminados (36.15 μmol m⁻² s⁻¹) con fotoperíodo de 16 h y temperatura de 21 °C ± 2 °C.

Después de dos semanas, se evaluó: porcentaje de contaminación, número de nudos, número de ramas, número de raíces y tasa de multiplicación (n° de nudos iniciales/n° de nudos finales) (Chamorro *et al.*, 2007). A fin de caracterizar el sistema radicular, se procedió a realizar una clasificación cualitativa del mismo aplicándose el siguiente criterio de clasificación: Raíces escasas = 1-3 raíces mayores a un cm de longitud; Raíces medias = 4-6 raíces mayores a un cm de longitud y Raíces abundantes = mas de 6 raíces mayores a un cm de longitud. Se aplicó un diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con 12 repeticiones por tratamiento, considerándose como unidad experimental un frasco con un explanto. Se utilizó el test de Tukey para la comparación de medias. La aclimatación de las vitroplantas se realizó bajo cámara húmeda a temperatura ambiente en bandejas

III. Macropropagation test of cuttings

From the mother plants with controlled sanity, cuttings of approximately 15cm length were selected and disinfected with Carbendazim at 1 ml L⁻¹ during five minutes. Once disinfected, to induce rooting, NAA, IBA and a commercial product containing 4 g of NAA per 100 g of formula named Nafusaku ® were applied. For each phytohormone, three different concentrations were used (10, 25 and 50 mg L⁻¹), in all cases a control treatment was used with no growth regulator. Each treatment with 50 experimental units was replicated three times. Posteriorly, the cuttings were planted in an elevated microtunnel using perlite as substrate, under 80 % of RH and an average temperature of 25 °C. After two weeks from the planting, rooting percentage was evaluated by applying the same classification criteria of roots used in the micropropagation phase. Once the treatment in which the higher rates of abundant roots category was defined, the effect of four substrates in the rhizogenesis was analyzed: a) P = perlite, b) perlite + sand (proportion 1:1), c) perlite + earthworm compost (1:1) and perlite + sand + earthworm compost (1:1:1). The cuttings were distributed in trays of 288 cells, containing the different substrates. Rooting percentage and total biomass were analyzed. Tests were carried in a completely randomized block design (CRD). In the statistical analysis of biomass, Tukey test was used for the comparing of means.

Results and Discussion

I. Preparation of mother plants

Within 45 days, the establishment of cuttings implanted in stonemasons was reached. Sanitary treatments, applied to mother plants, were effective for plague and disease control, achieving appropriate conditions for the execution of intended tests. Agrochemical applications reduced the incidence of *in vitro* contaminants.

II. Micropropagation Test

Disinfection protocol applied in the laboratory was effective for contaminants control, reaching 92 % asepsis. Recorded contamination appeared within four days, corresponding to 43 % of bacteria and 57 % fungus. This is a highly promissory aspect for our region, due that in other places as Mexico and Rumania the presence of endogenous contaminants limit application of this

conteniendo perlita. En esta etapa se evaluó el porcentaje de supervivencia.

III. Ensayo de macropropagación de esquejes

A partir de plantas madre con sanidad controlada se seleccionaron esquejes de aproximadamente 15 cm de longitud, las que se desinfectaron con Carbendazim a 1 mL L⁻¹, durante cinco minutos. Una vez desinfectadas, a fin de inducir el enraizamiento, se aplicaron ANA, AIB y un producto comercial conteniendo 4 g de ANA por 100 g de formulado, denominado Nafusaku ®. Se utilizaron para cada fitoregulator tres concentraciones diferentes (10, 25 y 50 mg L⁻¹), en todos los casos se empleó un tratamiento testigo, sin regulador de crecimiento. Cada tratamiento con 50 unidades experimentales, se replicó tres veces. Posteriormente, las estacas se plantaron en un microtúnel elevado, usando perlita como sustrato, bajo 80 % de HR y una temperatura promedio de 25 °C. Luego de dos semanas desde la plantación se evaluó el porcentaje de enraizamiento, aplicándose el mismo criterio de clasificación de raíces empleado en la etapa de micropropagación. Una vez definido el tratamiento en el cual se presentaron los más altos valores de la categoría de raíces abundantes, se analizó el efecto de cuatro sustratos en la rizogénesis: a) Perlita, b) Perlita + arena, (proporción 1:1), c) Perlita + lombricompost, (1:1) y d) Perlita + arena + lombricompost (1:1:1). Los esquejes fueron distribuidos en bandejas de 288 celdas, conteniendo los distintos sustratos. Se analizó Porcentaje de enraizamiento y biomasa total. Los ensayos se llevaron a cabo en un diseño en bloques completamente aleatorizado (DCA). En el análisis estadístico de la biomasa, se utilizó el test de Tukey para la comparación de medias.

Resultados y Discusión

I. Acondicionamiento de plantas madre

A los 45 días, se consiguió el establecimiento de los esquejes implantados en canteros. Los tratamientos sanitarios aplicados a las plantas madre fueron efectivos para el control de plagas y enfermedades, logrando en las mismas, condiciones apropiadas para la ejecución de los ensayos previstos. Las aplicaciones de agroquímicos redujeron la incidencia de contaminantes *in vitro*.

II. Ensayo de micropropagación

El protocolo de desinfección aplicado en laboratorio fue efectivo para el control de contaminantes, alcanzando

technique (Hector *et al.*, 2005; Ionescu - Mălăncuș *et al.*, 2009). As consequence of the agents used, necrosing of explants was not observed neither liberation of phenols in the culture medium. The analysis of the node number (average value of 2.38) and number of branches (average value 1.63) did not show statistically significant differences among treatments. The number of branches is a characteristic that is kept independently from the applied treatment. In the auxin free treatment, an average of 2.0 nodes/branch was recorded, and with the adding of auxins to the culture medium, it increases up to 2.63 nodes/branch, which increases multiplication rate. In other species as *Vitex negundo* (Kannan *et al.*, 1998), *Syzygium travancoricum* (Anand *et al.*, 1999), *Ancistrocladus abbreviatus* (Bringmann *et al.*, 1999) and *Coleus blumeni* (Rani *et al.*, 2006), the use of NAA improves the growth response of stems when nodal segments were used. In this work, nodal segments constitute an adequate source of explants with excellent response; similar observations have been recorded for medicinal species such as *Rauwolfia serpentina* (Roy *et al.*, 1995), *Embllica officinalis* (Rahaman *et al.*, 1999), *Holarrhena antidysenterica* (Ahmed *et al.*, 2001) and *Enicostemma hyssopifolium* (Seetharam *et al.*, 2002).

In the number of roots statistically significant differences were detected ($F=2.54$, $gl=9$ and $p=0.01$) among the treatments. It was observed that the auxin that influenced the most in the root emission (average value 2.39) was indole acetic acid (IAA) at a concentration of 0.1 mg L^{-1} (Figure 1). On the other hand, independently from the type of auxin (regulator applied), concentration 0.1 mg L^{-1} turned out to be appropriate to bear roots of the Medium category (4-6 roots larger than a cm length) (Figure 1). Smaller or larger concentrations than this affected the analyzed variable, generating a smaller number of roots for really low concentrations (average value 2.15) or inhibiting the rhizogenesis at higher concentrations (average value 2.00). Sujana and Naidu (2011), inform that an increment in the BAP (benzylaminopurine) and NAA reduce the frequency and the number of stems in *M. piperita*, emphasizing that there is a maximum allowed threshold in BAP concentrations so that a positive answer can be achieved. Muhammad, *et al.*, (2007), accomplished excellent rooting systems for this species by applying high concentrations of IBA, while in *M. viridis* L., concentrations from 0.5 to 1.5 mg

un 92 % de asepsia. La contaminación registrada apareció a los cuatro días, correspondiendo un 43 % a bacterias y un 57 % a hongos. Un aspecto altamente promisorio para nuestra región, debido a que en otros lugares como México y Rumania la presencia de contaminantes endógenos limitan la aplicación de esta técnica (Héctor *et al.*, 2005; Ionescu-Mălăncuș *et al.*, 2009). No se observó necrosamiento de los explantos, como consecuencia de la exposición a los agentes empleados, ni tampoco liberación de fenoles en el medio de cultivo. El análisis del número de nudos (valor promedio de 2.38) y número de ramas (valor promedio de 1.63), no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. El número de ramas es una característica que se mantiene independientemente del tratamiento aplicado. En el tratamiento sin auxinas se registró un promedio de 2.0 nudos/rama y con la adición de auxinas a los medios de cultivo, aumenta hasta 2.63 nudos/rama lo cual incrementa la tasa de multiplicación. En otras especies como *Vitex negundo* (Kannan *et al.*, 1998), *Syzygium travancoricum* (Anand *et al.*, 1999), *Ancistrocladus abbreviatus* (Bringmann *et al.*, 1999) y *Coleus blumeni* (Rani *et al.*, 2006), la utilización de ANA mejora la respuesta en el crecimiento de tallos cuando se utilizaron segmentos nodales. En este trabajo los segmentos nodales constituyen una adecuada fuente de explantos con excelente respuesta, observaciones similares han sido informadas para especies medicinales como *Rauwolfia serpentina* (Roy *et al.*, 1995), *Embllica officinalis* (Rahaman *et al.*, 1999), *Holarrhena antidysenterica* (Ahmed *et al.*, 2001) y *Enicostemma hyssopifolium* (Seetharam *et al.*, 2002).

En el número de raíces se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($F=2.54$, $gl=9$ y $p=0.01$) entre los tratamientos. Se observó que la auxina que más influyó en la emisión de raíces (valor promedio 2.39) fue el ácido indolacético (AIA) en una concentración de 0.1 mg L^{-1} (Figura 1). Por otra parte, se encontró que independientemente del tipo de regulador auxínico aplicado, la concentración 0.1 mg L^{-1} resultó apropiada para dar raíces de la categoría medias (4-6 raíces mayores a un cm de longitud) (Figura 1). Concentraciones menores o mayores que ésta, afectaron la variable analizada, generando un menor número de raíces para concentraciones muy bajas (valor promedio 2.15) ó inhibiendo la rizogénesis en concentraciones mayores (valor promedio 2.00). Sujana y Naidu (2011), comunican que un incremento en las concentraciones de BAP (benclaminopurina) y ANA reducen la frecuencia y el número de tallos en *M. piperita*, enfatizando que existe un umbral máximo permitido en las concentraciones de BAP, a fin de lograr una respuesta positiva. Muhammad, *et al.*, (2007), logró excelentes sistemas radiculares para esta especie aplicando altas concentraciones de AIB, mientras que en *M. viridis* L., se reportan concentraciones de 0.5 a 1.5 mg L^{-1} de AIA para inducir enraizamiento (Raja *et al.*,

L⁻¹ to induce rooting are reported (Raja et al., 2008). In *M. piperita*, an increase in the weight of the radical system and in growth of the stem was reached by using IBA in concentrations of 0.6 mg L⁻¹, assigning this effect also to the pH of the mean (Santoro et al., 2013). The treatments with IAA at 0.01, 0.1 and 1 mg L⁻¹ presented between 42 and 50 % in the Medium roots category, and a 17 to 25 % in the Abundant roots category (Figure 1). In *M. piperita* (Sujana et al., 2011) there was no development of the radical system with addition of IAA, but there was with NAA at concentrations higher than 2.0 mg L⁻¹. In *M. spicata* the addition of 4 mg L⁻¹ of NAA produced the higher development of roots (Samantaray et al., 2012). In *M. piperita* var Columna (Ionescu - Mălăncuș et al., 2009) a maximum of roots was obtained by using 4.92 μM AIB. In the control treatment, seedlings with scarce rooting development were registered (average value 1.39), a similar behavior was observed in a mean auxin free in *M. piperita* (Sujana et al., 2011).

Within two weeks, the multiplication rate reached was 1:8 (Figure 2a); corresponding with results obtained in the province of Mendoza (Martinez et al., 1991), which obtained in 15 days of assay in average one stem with 5 nodes per explant. In *M. piperita*, in a period of 40

2008). En *M. piperita*, se logró un incremento en el peso del sistema radical y en crecimiento del tallo empleando AIB en concentraciones de 0.6 mg L⁻¹, atribuyendo también este efecto al pH del medio (Santoro et al., 2013). Los tratamientos con AIA a 0.01, 0.1 y 1 mg L⁻¹ presentaron entre un 42 a 50 % en las categorías raíces medias y un 17 a 25 % de raíces de la categoría abundantes (Figura 1). En *M. piperita* (Sujana et al., 2011), no obtuvieron desarrollo del sistema radical con la adición de AIA, pero lo obtuvieron con ANA en concentraciones superiores a 2.0 mg L⁻¹. En *M. spicata*, la adición de 4 mg L⁻¹ de ANA produjo el mayor desarrollo de raíces (Samantaray et al., 2012). En *M. piperita* var Columna (Ionescu - Mălăncuș et al., 2009), obtuvieron un máximo de raíces empleando 4.92 μM AIB. En el tratamiento testigo se registraron plántulas con escaso desarrollo radicular (valor promedio 1.39), un comportamiento similar fue observado en un medio libre de auxinas en *M. piperita* (Sujana et al., 2011).

Al cabo de dos semanas la tasa de multiplicación alcanzada fue de 1:8 (Figura 2a); correspondiéndose con resultados obtenidos en la provincia de Mendoza (Martínez et al., 1991); los cuales obtuvieron en 15 días de ensayo un promedio de un tallo con 5 nudos por explanto. En *M. piperita*, en un periodo de 40 días, Sunandakumari, et al., (2004), obtienen por segmento nodal 4 tallos con 5 nudos.

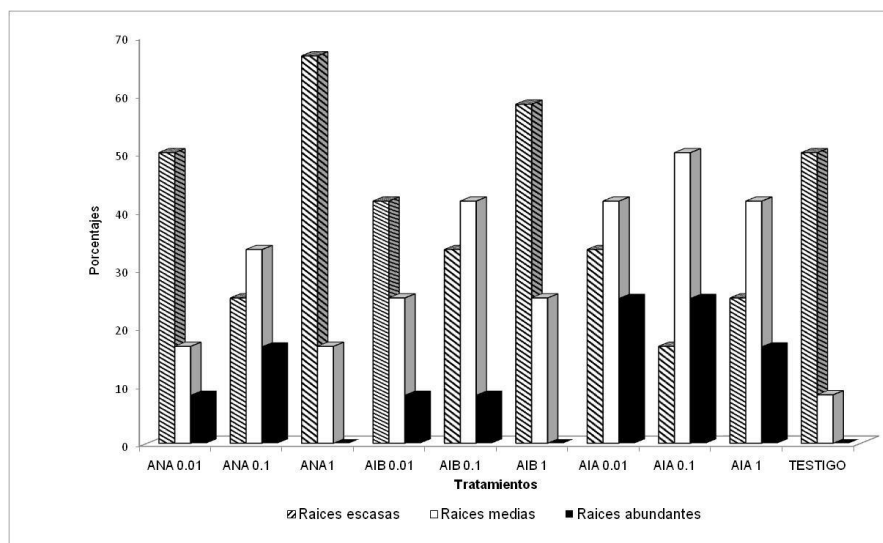


Figure 1. Root formation percentage in *M. arvensis* L. explants during micropropagation.

Figura 1. Porcentaje de formación de raíces en los explantos durante el proceso de micropropagación en *M. arvensis* L.

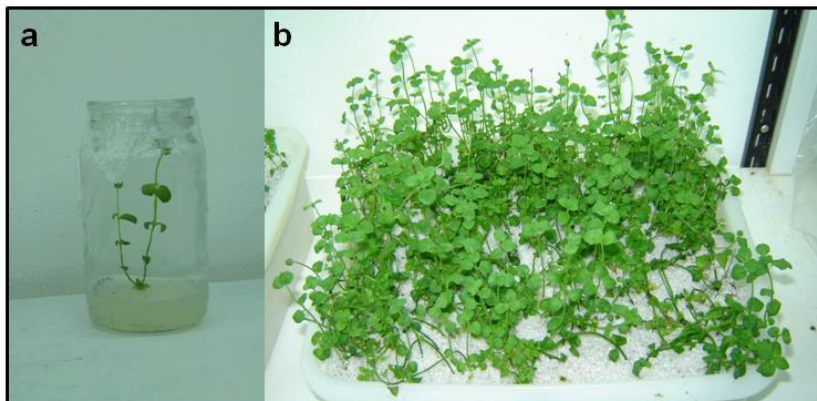


Figure 2. a) Explant with two stems and four nodes for *M. arvensis* L. in the beginning of the multiplication phase. b) Growth stage *in vitro* seedlings obtained.

Figura 2. a) Explanto con dos tallos y cuatro nudos para el inicio de la fase de multiplicación de *M. arvensis* L. b) Estado de desarrollo de plantines obtenidos *in vitro*.

days, Sunandakumari, *et al.*, (2004), obtained by nodal segment 4 stems with 5 nodes.

The total of explants rooted *in vitro* achieved to overcome acclimation phase, being within the maximum values obtained for other aromatic species (Sunandakumari *et al.*, 2004). Plasticity of this species allows to obtain high survival rates once micropropagation has finished, which indicates that this technique is feasible of being applied at a massive production level with plants of excellent sanity. In Figure 2b, the state of development of the seedlings obtained *in vitro* before being taken to the greenhouse stonemasons is presented.

III. Propagation test by cuttings

All applied treatments for rooting of cuttings were successful, achieving 100 % of rooting. Rooting systems in the seedlings presented different aspect in quantity and quality of roots. Treatment NAA 50 mg L⁻¹ reached 50 % of roots from the Medium root category, 30 % from the abundant category and 10 % from the scarce category, Figure 3a. Fine and small roots were observed by diminishing NAA concentration. Witness treatment presented high values of scarce roots, this response highlights the importance of the application of regulators of growth to favor the rooting process of cuttings.

The effect of four substrates in the rhizogenesis process was analyzed with NAA at 50 mg L⁻¹. The rooting

El 100 % de los explantos enraizados *in vitro*, lograron superar la etapa de aclimatación, estando dentro de los valores máximos obtenidos para otras especies aromáticas (Sunandakumari *et al.*, 2004). La plasticidad de esta especie, permite conseguir altas tasas de supervivencia una vez finalizada la micropropagación, lo cual indica que esta técnica es factible de ser aplicada a nivel de producción masiva de plantas con excelente sanidad. En la Figura 2b, se presenta el estado de desarrollo de los plantines obtenidos *in vitro* antes de ser trasladados a los canteros de invernadero.

III. Ensayo de macropropagación por esquejes

Todos los tratamientos aplicados para el enraizamiento de esquejes fueron exitosos, lográndose el 100 % de enraizamiento. Los sistemas radiculares en las plántulas, presentaron diferente aspecto en cantidad y calidad de raíces. El tratamiento ANA 50 mg L⁻¹ alcanzó un 50 % de raíces de la categoría de raíces medias, un 30 % de la categoría abundante, y 10 % en la categoría raíces escasas, Figura 3a. Se observaron raíces finas y pequeñas al disminuir la concentración de ANA. El tratamiento testigo presentó altos valores en raíces escasas, esta respuesta resalta la importancia de la aplicación de reguladores de crecimiento, para favorecer el proceso de enraizamiento de estacas.

Con ANA a 50 mg L⁻¹ se analizó el efecto de cuatro sustratos en el proceso de rizogénesis. Los porcentajes de



Figure 3. a) *M. arvensis* L. rooted cuttings and root appearance for the concentration 50 mg L⁻¹. 1) ANA, 2) Nafusaku, 3) AIB and 4) control without growth regulator. b) Appearance of rooted cuttings on different substrates.
(P=perlite; P+A=perlite+sand; P+L=perlite+earthworm compost; P+A+L=perlite+sand+earthworm compost).

Figura 3. a) Esquejes de *M. arvensis* L. enraizados y aspecto radicular para la concentración 50 mg L⁻¹ de: 1) ANA, 2) Nafusaku, 3) AIB y 4) testigo sin regulador de crecimiento. b) Aspecto de las estacas enraizadas sobre diferentes sustratos.
(P=perlita; P+A=perlita+arena; P+L=perlita+lombricompuesto; P+A+L=perlita+arena+lombricompuesto).

percentages reached 100 % in all used substrates. However, disparities in quantity and aspect of the roots were observed, Figure 3b.

enraizamiento alcanzaron el 100 % en todos los sustratos empleados. Sin embargo, se visualizaron desigualdades en la cantidad y aspecto de las raíces, Figura 3b.

From the qualitative analysis made, the treatment perlite + sand + earthworm compost, it was the substrate that allowed the development of an abundant rooting system, followed by the mix of perlite plus sand, Figure 4.

Del análisis cualitativo realizado, el tratamiento perlita + arena + lombricompuesto, fue el sustrato que permitió el desarrollo de un sistema radicular abundante, seguido por la mezcla de perlita más arena, Figura 4.

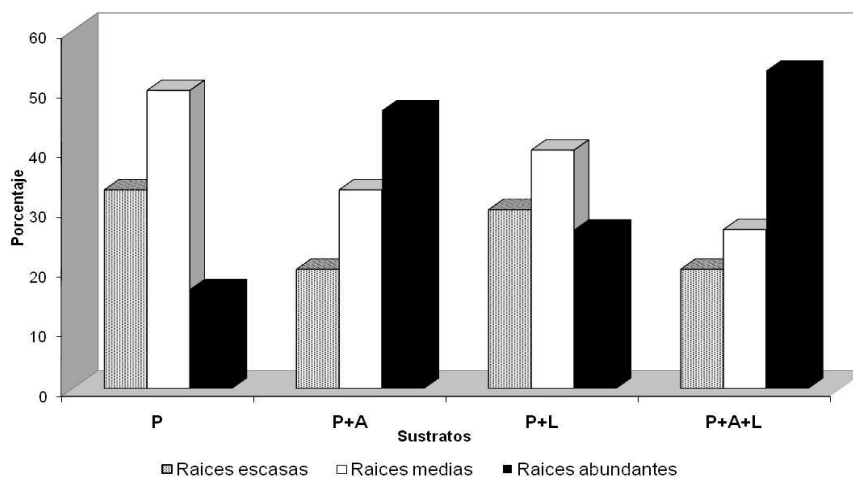


Figure 4. *M. arvensis* L. root formation percentage in different substrates.
(P=perlite; P+A=perlite+sand; P+L=perlite+earthworm compost; P+A+L=perlite+sand+earthworm compost).

Figura 4. Porcentajes de formación de raíces en *M. arvensis* L., en diferentes sustratos.
(P=perlita; P+A=perlita+arena; P+L=perlita+lombricompuesto; P+A+L=perlita+arena+lombricompuesto).

Table 1.
Seedlings total biomass of *M. arvensis* L.
grown in different substrates.

Tabla 1.
Biomasa total de plantines de *M. arvensis* L.
cultivadas en diferentes sustratos.

Substrate	Substrate Dry Weight (g)
Perlite	0.6285 a
Perlite + sand	0.6470 b
Perlite + earthworm compost	0.6395 a
Perlite + sand + earthworm compost	0.6715 c

Different letters indicate significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

It is probable that the qualitative difference of the radical systems observed was due to the delivery of nutrients from the earthworm compost, which improved nutrition of the new generated tissues. The earthworm action in the substrate increases the nitrogen fraction of the soil (Eriksen-Hamel and Whalen, 2007). It delivers macro and micronutrients, improves the availability of nutrients and increases the microbial activity of the soil (Cacciamani, 2004). Determination of biomass confirmed what was observed in the greenhouse (Table 1).

The importance of conforming a good substrate that gives the necessary conditions for the rhizogenesis process must be recognized, meaning: elevated aeration (given by perlite and sand), minerals delivery (earthworm compost) and facilitate the rooting development (sand) (Valenzuela *et al.*, 2006).

Macropropagation by cuttings is a practical method for the obtaining of seedlings, which can be grown within 30 days once the process has begun; these results keep great similarity with the ones informed for *M. arvensis*, where in 25 days the rooted microcuttings are in condition for field transplant (Chagas *et al.*, 2008).

Propagation of Japanese mint was achieved successfully by both techniques of asexual propagation (micro and macropropagation of cuttings). The application of the used auxin (growth regulators) stimulated the rooting development in both nodal explants and cuttings.

Probablemente la diferencia cualitativa de los sistemas radicales observados, se debió al aporte de nutrientes por parte del lombricompost, el cual mejoró la nutrición de los nuevos tejidos generados. La acción de las lombrices en el sustrato incrementa la fracción nitrogenada del suelo (Eriksen-Hamel y Whalen, 2007), provee de macro y micronutrientes, mejora la disponibilidad de nutrientes e incrementa la actividad microbiana del suelo (Cacciamani, 2004). La determinación de la biomasa confirmó lo observado en invernadero (Tabla 1).

Se debe reconocer la importancia de conformar un buen sustrato, que aporte las condiciones necesarias para el proceso de rizogénesis, esto es: elevada aireación (aportada por la perlita y arena), aporte de minerales (lombricompost) y facilitar el desarrollo radicular (arena) (Valenzuela *et al.*, 2006).

La macropropagación por esquejes es un método práctico para la obtención de plantines, los cuales pueden ser cultivados al cabo de 30 días de iniciado el proceso, estos resultados guardan semejanza con los informados para *M. arvensis*, en donde a los 25 días las microestaquillas enraizadas se encuentran en condiciones para el trasplante a campo (Chagas *et al.*, 2008).

Se alcanzó con éxito la propagación de menta japonesa por ambas técnicas de propagación asexual (micro y macropropagación de esquejes). La aplicación de los reguladores de crecimiento auxínico empleados, estimuló el desarrollo radicular tanto en los explantos nodales, como en los esquejes.

Conclusions

The developed protocol describes two alternatives for the obtaining of seedlings of mint (*M. arvensis* L.), which can guarantee a regular provision of genetic material to small producers as an alternative of agricultural production for the production of aromatic plants and its essences.

Conclusiones

El protocolo desarrollado describe dos alternativas para la obtención de plantines de menta (*M. arvensis* L.), las cuales pueden garantizar una provisión regular de material genético a pequeños productores, como alternativa de producción agrícola para la producción de plantas aromáticas y sus esencias.

References

- Ahmed, G., Roy, P.K. and Mammu, A.N.K. 2001. High frequency shoots regeneration from nodal and shoot tip explants of *Holarrhena antidysenterica* L. *Indian Journal of Experimental Biology* 39: 1322-1324. <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/24099/1/IJEB%2039%2812%29%201322-1324.pdf>
- Anand, A., Rao, C.S. and Balakrishna, P. 1999. *In vitro* propagation of *Syzygium travancoricum* Gamble – An endangered tree species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 56: 59-63. <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1006235900696#page-1>
- Arizio, O. and Curioni, A. 1999. Análisis de Mercado y Tecnología de producción de Menta. Proyecto de diversificación productiva. Universidad de Lujan, Serie B N° 2.
- Bringmann, G., Rischer, H., Schlauer, J. and Ake-Assi, L. 1999. *In vitro* propagation of *Ancistrocladus abbreviatus* (Ancistrocladaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 57: 71-73. <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1006201711390#page-1>
- Brown, B., Hart, J.M., Wescott, M.P. and Christensen, N.W. 2003. The critical role of nutrient management in mint production. *Better Crops* 4 suppl 87: 9-11.
- Cacciamani, M. 2004. Lombricultura: una actividad ecológica y rentable. 2° Edición. Buenos Aires. *Hemisferio Sur* 45.
- Cameroni, M.G. 2012. Hierbas Aromáticas y Especies Anual de Comercio Exterior. Ministerio de Agricultura, Ganadería y pesca, Informe Sectorial N°9.
- Camisa, N.A. 1990. Experiencias y producción de aceites esenciales en la región noroeste del país - sugerencias. *Anales de SAIPA* 11: 145-150.
- Chagas, J.H.I., Pereira, J.E.B., Vilela, S.K., and Nalon F.H. 2008. Produção de mudas de hortela-japonesa em função da idade e de diferentes tipos de estaca. *Ciencia Rural* 38 suppl 8: 2157-2163. <http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n8/a11v38n8.pdf>
- Chamorro, A.H., Martínez, S.L., Fernández, J.C. and Mosquera, T. 2007. Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de limonium var. Misty blue. *Agronomía Colombiana* 25 suppl 1: 47-53. <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v25n1/v25n1a06>
- Conger, B.V. 1981. Cloning Agricultural plants via *in vitro* techniques. Boca Raton: CRC Press Inc., 273. <http://trove.nla.gov.au/work/9939002?selectedversion=NBD1771775>
- Eriksen-Hamel, N.S. and Whalen, J.K. 2007. Impacts of earthworms on soil nutrients and plant growth in soybean and maize agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 120: 442-448. http://www.researchgate.net/publication/229280979_Impacts_of_earthworms_on_soil_nutrients_and_plant_growth_in_soybean_and_maize_agroecosystems
- Héctor, E., Barrón M.L., Godoy, L., Díaz, B., Hernández, M.M. and Torres, A. 2005. Un método para la desinfección y el establecimiento *in vitro* de la menta japonesa (*Mentha arvensis* L.). *Cultivos Tropicales* 26 suppl 1: 69-71. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215916011>
- Ionescu-Mălăncuș, I., Livadariu, O., Niculiță, P., Manole, T., Băbeanu, N., Popa, O., et al. 2009. Preliminary study regarding *in vitro* morphogenesis on *Mentha Columna* L. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*; 66 suppl 2: 376-380. <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/veterinary/article/view/4244/3884>
- Kannan, R. and Jasrai, Y.T. 1998. Micropropagation of medicinal plants – *Vitex negundo*. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 20: 693-696.

- Martínez, L., Guñazú, M.E., Riquelme, C. and Agüero, C. 1991. Estudio preliminar de la micropropagación de la menta (*Mentha arvensis* var. *Piperascens* Holmes) mediante estacas uninodales y extremos apicales. En: Simposio Argentino de Biotecnología Vegetal; Vaquerías, Córdoba, Argentina. 11-12 pp.
- Muhammad, A., Humero, A., Shahid, M. and Faheem, A. 2007. Monoterpene contents *in vitro* cultures and field-growth plants of Japanese mint (*Mentha arvensis* L.). *Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 40 suppl 2:74-79.
- Rahaman, M.M., Roy, P.K., Mannan, M.A. and Roy, S.K. 1999. Clonal propagation of *Emblica officinalis* through *in vitro* culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 9: 17-22.
- Raja, D.H. and Arockiasamy, D.I. 2008. *In vitro* Propagation of *Mentha viridis* L. from Nodal and Shoot tip Explants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 18 suppl 1: 1-6. http://baptcb.org/ptc/Full_article/ptc18_1_01.pdf
- Rani, G., Talwar, D., Nagpal, A. and Virk, G.S. 2006. Micropropagation of *Coleus blumei* from nodal segments and shoot tips. *Biologia Plantarum* 50 suppl 4: 496-500. http://www.researchgate.net/publication/227234541_Micropropagation_of_Coleus_blumei_from_nodal_segments_and_shoot_tips
- Roca, W. and Mroginski, L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. *Centro Internacional de Agricultura Tropical* 968.
- Roy, S.K., Roy, P.K., Rahaman, M. and Hossain, T. 1995. Clonal propagation of *Rauvolfia serpentina* through *in vitro* culture. *Acta Horticulturae* 39: 141-145. http://www.actahort.org/members/showpdf?booknr=390_20
- Samantaray, A., Sial, P. and Manoranjan, K. 2012. Micropropagation and biochemical analysis of Spear Mint (*Mentha spicata*). *Indian Journal Innovations Developments* 1 suppl 7: 489-493. <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=32253>
- Santoro, M.V., Nievas, F., Zygodlo, J., Giordano, W. and Banchio, E. 2013. Effects of growth regulators on biomass and the production of secondary metabolites in Peppermint (*Mentha piperita*) micropropagated *in vitro*. *American Journal of Plant Sciences* 4: 49-55. http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=32253#VT50OdJ_Oko
- Seetharam, Y.N., Barad, A., Gururaj, C., Joythishawaran, G., Ghanti, K.S., et al. 2002. *In vitro* shoot regeneration from leaf and nodal explants of *Enicostemma hyssopifolium* (Wild). A vulnerable medicinal plant. *Indian Journal Biotechnology* 1: 401-404. <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/19895/1/IJBT%201%284%29%20401-404.pdf>
- Srivastava, R.K., Singh, A.K., Kalra, A., Tomar, V.K.S., Bansal, R.P., Patra, D.D. et al. 2002. Characteristic of menthol mint *Mentha arvensis* cultivated on industrial scale in the Indo-Gangetic plains. *Industrial Crops and Products* 15: 189-198. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669001001133>
- Sujana, P. and Naidu, C.V. 2011. High frequency rapid plant regeneration from shoot tip and nodal explants of *Mentha piperita* (L.) – An important multipurpose medicinal plant. *Journal of Phytology* 3 suppl 5: 9-13. <http://journal-phytology.com/index.php/phyto/article/view/6778/3459>
- Sunandakumari, C., Martin, K.P., Chithra, M., Sini, S., and Madhusoodanan, P.V. 2004. Rapid axillary bud proliferation and *ex vitro* rooting of herbal spice *Mentha piperita* L. *Indian Journal Biotechnology* 3: 108-112. <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5836/1/IJBT%203%281%29%20108-112.pdf>
- Suresh, R., Kumar, S., Singh, V., Pravesh, R., Tomar, V.K.S. and Singh, A.K. 2012. Economics of production to marketing of aromatics crops in Uttar Pradesh: A case study. *Agricultural Economics Research Review*; 25 suppl 1: 157-160. <http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/126092/2/16-Ram-Su.pdf>
- Valenzuela, O. and Gallardo, C. 2006. Curso de sustratos para el cultivo de plantas en contenedores. Primer Encuentro de Capacitación para Productores de Plantas Ornamentales de Salta. Gobierno de la Provincia de Salta, Consejo Federal de Inversiones, Cooperativa de Viveristas y Floricultores de la Provincia de Salta. 60 pp.

Cite this paper/Como citar este artículo: Vacca-Molina M.; Velásques J.D.; Bonomo M.L.C.; Avilés Z.J. (2015). Menta (*Mentha arvensis* L.) micro and macropropagation. *Revista Bio Ciencias* 3(3): 208-219. <http://editorial.uan.edu.mx/BIOCIENCIAS/article/view/155>

