

Artículo original

Protocolo de fácil aplicación en la regeneración *in vitro* de "peperina" (*Minthostachys verticillata*) (Griseb) Epling)

Fast appliance protocol in vitro regeneration of "peperina" (*Minthostachys verticillata*) (Griseb) Epling)

Patricia Angélica Peralta^{1,2}, Martín Arteaga¹, Hernán Gerónimo Bach^{1,3}

1. Instituto de Recursos Biológicos. Centro de Investigación de Recursos Naturales, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina.
2. Escuela Superior en Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Morón, Buenos Aires.
3. Museo de Farmacobotánica "Juan A. Domínguez". Facultad de Farmacia y Bioquímica-Universidad de Buenos Aires.

Manuscrito recibido: 18 de junio de 2021; aceptado para publicación: 14 de octubre de 2021

Autor de Contacto: Patricia Angélica Peralta. Instituto de Recursos Biológicos, Área "Evaluación y Desarrollo de Recursos Fitogenéticos", Grupo de plantas aromáticas y medicinales. INTA Castelar C.C. 25 - Castelar (B1712WAA). Buenos Aires – Argentina. E-mail: pperalta@unimoron.edu.ar; peralta.patricia@inta.gob.ar

Resumen

La peperina es una especie aromática y medicinal que actualmente se encuentra sobreexplotada en su medio natural. El empleo del cultivo *in vitro* de tejido vegetal es una herramienta utilizada por varias disciplinas y en varias especies. El objetivo de este trabajo fué desarrollar un protocolo de multiplicación que sea más económico en tiempos y en costos que los reportados hasta la fecha. Los explantos se extrajeron de una planta madre cultivada en invernadero, para evitar el efecto de la variabilidad intraespecífica dentro del ensayo. Se evaluaron tres tratamientos para la desinfección y se introdujeron segmentos uninodales en dos concentraciones de medio de cultivo, con el agregado de reguladores de crecimiento. Las plántulas se aclimataron sin inconvenientes y no presentaron diferencias morfológicas con respecto a la planta madre. Se pudo cerrar un ciclo de regeneración exitosa desde la introducción a la aclimatación en dos meses y medio. Este protocolo resulta interesante para abastecer a los programas de conservación y multiplicación.

Palabras clave: micropropagación, segmento uninodal, planta aromática - medicinal.

Abstract

Peperina is an aromatic and medicinal species that is currently overexploited in its natural environment. The use of in vitro culture of plant tissue is a tool used by several disciplines and in several species. The objective of this work was to develop a multiplication protocol that is economical in time and costs. The explants were extracted from a mother plant

grown in the greenhouse to avoid the effect of intraspecific variability. Three treatments for disinfection were evaluated and uninodal segments were introduced in two concentrations of culture medium, with the addition of growth regulators. The seedlings acclimatized without inconvenience and did not show morphological differences with respect to the mother plant. A successful regeneration cycle could be closed since the introduction to acclimatization in two and a half months. This protocol is interesting to supply conservation and multiplication programs.

Key words: micropropagation, uninodal segment, aromatic-medicinal plant.

DOI: <http://doi.org/10.34073/274>

INTRODUCCIÓN

Minthostachys verticillata (Griseb. Epling.) es una especie aromática y medicinal comúnmente conocida como "peperina" y endémica de Argentina (Epling, 1939; Schmidt-Lebuhm, 2008a.). Crece entre 700 a 2300 msnm, en bosques, pastizales y laderas. Crece en áreas con precipitaciones entre 600 y 1100 mm aunque se adapta a condiciones de sequía (Juliani *et al.*, 2021). Es un subarbusto perenne que tiene una altura variable entre 0,30 y 2 metros, que se distribuye entre el noroeste y la región central de Argentina, en las provincias de Catamarca, Jujuy, Salta, Córdoba, San Luis, Tucumán y La Rioja (Ojeda *et al.*, 2004; Schmithd Lebuhn, 2008a). Dentro de su amplio rango, las poblaciones de *M. verticillata* tienen variabilidad fitoquímica (Zygodlo *et al.*, 1996; Ojeda *et al.*, 2001; Elechosa *et al.*, 2007; van Baren *et al.*, 2014, Arteaga, *et al.* 2016) como también, variabilidad genética (Bonafede *et al.*, 2014).

Esta especie es conocida popularmente por su uso en medicina tradicional para aliviar dolores reumáticos, dolores de cabeza, palpitaciones, anemias y problemas digestivos, (Schmidt-Lebuhn, 2008b, Barboza *et al.*, 2009; van Baren *et al.*, 2014), también como un potente antihistamínico (Cariddi *et al.*, 2006). Se utiliza en la elaboración de yerba mate compuesta (aromatizada) y en la elaboración de dulces y licores (Bonzani y Ariza Espinar, 1993).

La sobreexplotación de esta especie, sumada al cambio en el uso del suelo, la coloca en una situación de vulnerabilidad ecológica (Ojeda *et al.*, 2004; Elechosa *et al.*, 2009; Juliiani *et al.*, 2021). Por ello es necesario desarrollar estrategias

que colaboren con su conservación. El uso del cultivo de tejidos vegetales como herramienta permite la generación de muchos clones, en poco tiempo, en cualquier época del año y en espacios reducidos.

Existen protocolos para la introducción *in vitro* de "peperina", Chebel *et al.* (1998) y Bima *et al.* (2006) evaluaron la cantidad de brotes y el porcentaje de enraizamiento utilizando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, aunque son relativamente costosos en tiempo y dinero. También la regeneración por embriogénesis somática directa a partir de hojas fue evaluada por Bertero *et al.* (2020) utilizando otro medio de cultivo y reguladores.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo económico, rápido y eficiente para la multiplicación *in vitro* de *M. verticillata* y su posterior aclimatación.

Material y Método

La planta madre utilizada, originaria de la localidad de Padre Monti en la provincia de Tucumán (Arteaga *et al.*, 2016), se mantuvo en una maceta de plástico de 25 litros, con una mezcla de arena, tierra y perlita (1:2:1) (**Fig. 1a**) en condiciones estándar de invernadero (predio experimental del IRB – INTA Castelar). Se pretrató semanalmente con 0,5 g/l de solución antifúngica Carbendazim (Mamboretá®).

Desinfección de los brotes

Se cortaron quince estacas de aproximadamente 15 cm, se quitaron los extremos apicales y se evaluaron tres protocolos de desinfección, bajo flujo laminar:

A. Se sumergieron las estacas en una solución de etanol al 70% v/v durante 20 segundos y se realizaron tres lavados finales en agua destilada estéril.

B. Se sumergieron las estacas en una solución de etanol al 70% v/v durante 20 segundos, se lavaron con agua destilada estéril y luego se desinfectaron con leve agitación en una solución de hipoclorito de sodio al 1,2% v/v durante 10 minutos. Tres lavados finales en agua destilada estéril.

C. Se sumergieron con leve agitación las estacas en una solución de hipoclorito de sodio al 1,2% v/v durante 10 minutos. Tres lavados finales en agua destilada estéril.

Se sembraron en 10 ml de medio semisólido MS (Murashige y Skoog, 1962) en tubos de 2,5 de diámetro y 12 cm de longitud cerrados con tapones de algodón para favorecer el intercambio gaseoso. El porcentaje de éxito en la desinfección se calculó como el número de explantos (segmento uninodal proveniente de las estacas) desinfectados que sobrevivieron al tratamiento, dividido por el total de explantos. El porcentaje de necrosis se definió como el número de explantos desinfectados que murieron sobre el total sembrado por tratamiento. El índice de eficiencia del tratamiento se definió como el número de explantos que se convierten en brotes divididos por el número total de explantos.

Multiplicación

Para evaluar la mejor concentración de medio de cultivo MS se cortaron 20 segmentos uninodales (explantos) provenientes del tratamiento de desinfección que resultó exitoso, se extrajeron las partes oxidadas y se sembraron 10 explantos en medio semisólido estéril durante 15 días: a) Medio MS completo (MS 1X) y b) medio MS con sus macro y micronutrientes diluidos a la mitad (MS 0.5X). Se utilizaron los mismos tubos descritos en la desinfección. Ambos medios suplementados con 20 g/l de sacarosa y 7 g/l de agar. El pH se ajustó a 5,8 con KOH. Se realizaron dos repeticiones.

En el tratamiento con mejor respuesta, se añadió 2,2 μ M de 6-bencilaminopurina (BAP). Se introdujeron 20 segmentos uninodales en tubos de 12x2,5 cm, que contenían 10 ml de medio, cubiertos con un tapón de algodón. Se cultivaron a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y un fotoperíodo de 16:8 h, durante 15 días, hasta la generación de un callo con múlti-

ples brotes. Se realizaron dos repeticiones para cada tratamiento.

Los brotes derivados del callo se sembraron en un medio MS suplementado con 2,46 μ M de ácido indol butírico (IBA), sin BAP, durante 20 días.

La tasa de multibrotación se definió como el número promedio de brotes por callo obtenido en 15 días.

El porcentaje de enraizamiento se definió como el número de plántulas que desarrollaron raíces por tratamiento.

Aclimatación

Todas las plántulas enraizadas se retiraron de los tubos y sus raíces se lavaron con abundante agua para eliminar los restos de agar adherido. A continuación, las plántulas se transfirieron a macetas de 0,5 l con una mezcla de sustrato comercial de enraizamiento Tabaco de Grow Mix® humedecido (humedad 55-65%; pH 5,00–5,70; densidad sustrato seco: 130-150 Kg/m³; porosidad Total: 90-95%) y perlita (1:1). Las macetas fueron cubiertas con bolsas de nylon transparente a modo de cámara húmeda y colocadas en sala de cultivo bajo condiciones estándar.

La tasa de éxito de este procedimiento se definió como el número de brotes que dieron lugar a una planta completa por explanto, totalmente aclimatada y funcional sobre el número total de plantas transplantadas.

Análisis estadístico

Se realizaron dos réplicas para cada tratamiento en un diseño estadístico al azar con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y comparación de medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia. Se utilizó el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012) para todos los análisis estadísticos.

Resultados

Desinfección de los brotes

La **Tabla I** muestra el porcentaje de éxito en la desinfección mediante diferentes tratamientos. Se puede observar que el único tratamiento eficaz fue el que solo consistió en inmersión en hipoclorito de sodio (1,2 % de Cl⁻ activo), donde los explantos solo sufrieron una pequeña decoloración, pero se recuperaron a los pocos días (**Fig. 1b**).

Tabla I. Resultado de las desinfecciones obtenidas en los diferentes tratamientos aplicados en explantos uninodales.

| Tratamiento | Desinfección (%) | Necrosis (%) | Índice de eficiencia (%) |
|-------------|------------------|--------------|--------------------------|
| A | 73,33 | 73,33 | 0 |
| B | 80,00 | 80,00 | 0 |
| C | 86,67 | 6,67 | 0,8 |

Multiplicación

En la introducción *in vitro*, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los brotes entre las concentraciones ensayadas (Tabla II). Sin embargo, los brotes desarrollados en MS 0.5X mostraron mejor apariencia que los cultivados en MS 1X, por lo que se seleccionó el primero para continuar con las pruebas, además de ser la opción más económica.

Tabla II. Número de brotes / explantos obtenidos en 15 días en las diferentes concentraciones de medio MS aplicadas. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre las medias (prueba de Tukey, $p < 0.05$). En negrita se destaca el tratamiento seleccionado para la multiplicación *in vitro*.

| Medio MS | Tasa de multiplicación (brotes / explanto) n=20 |
|--------------|---|
| 1 X | 8,87 ± (0,31) a |
| 0,5 X | 8,80 ± (0,31) a |

En la concentración con BAP probada, se observó la formación de un callo de color verde oscuro con multibrotaciones, en un rango entre 8 a 10 brotes / explanto (Fig. 1c a 1e).

Enraizamiento y aclimatación

Todos los explantos desarrollaron raíces alrededor del decimoquinto día, con el agregado de IBA, por lo tanto, el porcentaje de enraizamiento con MS (0,5 X) fue del 100%. Después de 20 días, las plántulas enraizadas se transfirieron a pequeños recipientes. La tasa de éxito en la aclimatación fue de 98%. Las plantas aclimatadas mostraron un aspecto

saludable, sin anomalías morfológicas y con un fenotipo similar a la planta madre (Fig. 1f).

Discusión

La peperina ha sido cultivada *in vitro* con éxito aplicando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. La desinfección inicial de la planta madre y del material a utilizar son pasos cruciales para el establecimiento del protocolo, en la cual se intenta disminuir la carga bacteriana y fúngica que atenten contra la supervivencia de los tejidos. Los explantos son sometidos a sustancias que pueden agredir el tejido vegetal. Encontrar una metodología que evite o disminuya la necrosis y la oxidación permite reducir el estrés que los explantos deben enfrentar durante la introducción *in vitro*. En este protocolo se obtuvo un 80% de explantos desinfectados con éxito utilizando sólo hipoclorito de sodio (1,2%), valor similar al alcanzado por Bima *et al.* (2006) y Bertero *et al.* (2020) quienes emplearon alcohol, hipoclorito de sodio y Tween.

La generación de brotes nuevos permite la multiplicación del material vegetal. La adición de BAP al medio MS es responsable de inducir la multiplicación *in vitro* (Peralta *et al.*, 2020). A partir de un explanto inicial se desarrollaron 9 brotes en promedio, un número mayor al obtenido por Chebel *et al.* (1998) en la misma concentración de BAP. Los mismos autores reportan un 91% de éxito en el enraizamiento *in vitro* utilizando Acido naftalen acético (ANA). También, junto con Bima *et al.* (2006) obtuvieron valores menores al nuestro con respecto al enraizamiento (50 y 80%, respectivamente) con el uso de IBA, pero éstos últimos utilizaron concentraciones del regulador mucho mayores.

Finalmente, en la aclimatación, el resultado es ligeramente superior al presentado por Chebel *et al.* (1998) y Bertero *et al.* (2020), aunque utilizaron diferentes sustratos al mostrado en este trabajo.

Estas diferencias podrían deberse a los diferentes orígenes geográficos de las plantas madre. Según Bonafede *et al.* (2014) existe variabilidad genética entre diferentes poblaciones de peperina, siendo la región de Tucumán la que presenta mayor variabilidad con respecto a las poblaciones del centro del país, que son más homogéneas. En el trabajo mencionado se muestra que existe correlación entre distancia genética y geográfica en estas poblaciones tal como se

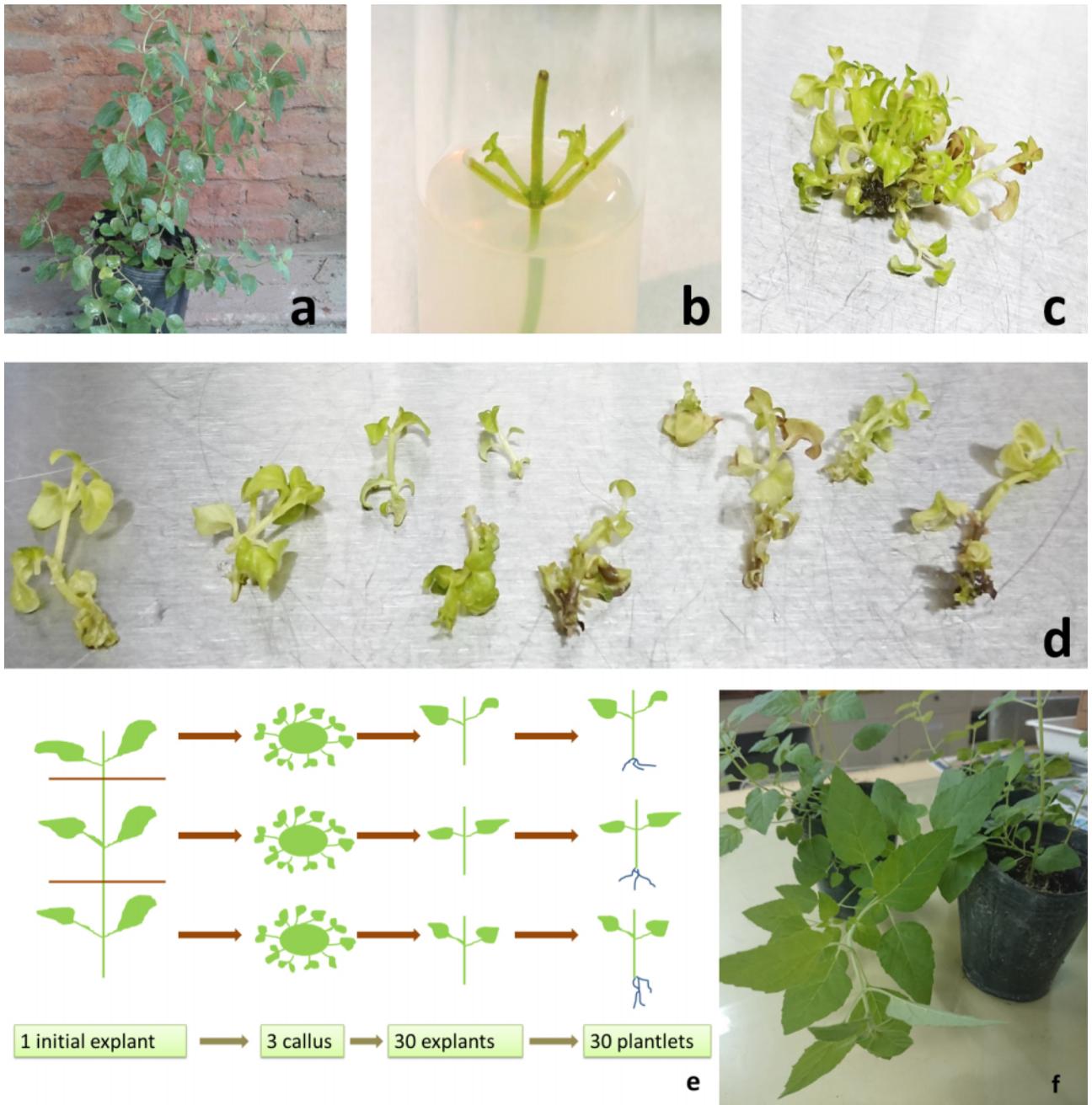


Figura 1: Secuencia de pasos de la micropropagación: a) Planta madre; b) segmento uninodal en medio MS (0.5X) suplementado con BAP, con decoloración en los extremos y con dos nuevos brotes; c) callos de múltiples brotes; d) número promedio de brotes por explante; e) resumen de la secuencia de pasos para obtener aproximadamente 27 plántulas de un explanto inicial; f) Planta regenerada y totalmente funcional.

presenta en otras especies (Lezcano *et al.*, 2010; Severin *et al.*, 2011; Sampayo-Maldonado *et al.*, 2016).

Sería conveniente considerar si se justifica incrementar la concentración de reguladores de crecimiento, aumentando

los costos de esta técnica, dados los resultados obtenidos siguiendo este protocolo. Se ha conseguido con éxito una media de 27 plantas por cada segmento uninodal introducido *in vitro*, en menos de tres meses.

CONCLUSIONES

El protocolo de desinfección de explantos resultó adecuado y no se observó ningún tipo de contaminación endógena. El 80% sobrevivió al procedimiento y pudo establecerse en condiciones *in vitro*.

El ciclo *in vitro* (introducción, establecimiento, brotación, aclimatación) de *M. verticillata* se completó con éxito, con un uso mínimo de reguladores de crecimiento.

El presente protocolo de propagación puede aplicarse para diferentes necesidades, como ayudar en la preservación de poblaciones, apoyar programas de mejora de esta especie, y también, aliviar la sobreexplotación regional. También, asegurar la propagación de clones seleccionados (comerciales o destinados a la investigación) sin aplicar el paso del protocolo de la generación de un callo.

BIBLIOGRAFIA

- Arteaga M, Collado CE, Gil A. (2016). Characterization of glandular trichomes of *Minthostachys verticillata* "peperina" from northwest and central Argentina: relation with essential oil content. *J. Bio. Env. Sci.* 8 (4): 172-181.
- Barboza GE, Cantero JJ, Núñez C, Pacciaroni A, Ariza Espinar L. (2009). Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora; Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Museo Botánico; Kurtziana; 34 (1-2): 7-365.
- Bertero VG, Beznec A, Faccio P, Auteri M, Arteaga M, Bonafede M, Bossio E. (2020). High-efficiency direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf base explants of "peperina" (*Minthostachys verticillata*). *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 56, 915–919 <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10098-5>
- Bima P, Vargas L, Ojeda M. (2006). *In vitro* propagation of peperina (*Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb.). *Mol Med Chem* 11: 3 -5.
- Bonafede M, Marsal V, Arteaga M. (2014). Diversity distribution analysis in *Minthostachys verticillata* Epling (Griseb) (Lamiaceae) (peperina) populations by EST-SSR markers. *J. Bio. & Env. Sci.* 5 (6): 190-199.
- Bonzani N, Ariza Espinar L. (1993). Estudios anatómicos

de tres especies de lamiaceae usadas en medicina popular. *Acta Farm. Bonaerense* 12(3): 113-123.

- Cariddi LN, González-Pereyra ML, Maldonado AM. (2006). *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling: A South American Plant with anti-inflammatory effect *In Vitro*. *Allergy & Clinical Immunology International* 18(6):234-241.
- Chebel A, Koroch AR, Juliani HR Jr, Juliani HR, Trippi VS. (1998). Micropropagation of *Minthostachys mollis* (H.B.K.) Griseb. and essential oil composition of clonally propagated plants. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 34: 249 -251.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. (2012). 'InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA', Argentina: Universidad Nacional de Córdoba.
- Elechosa MA, Molina AM, Juárez MA, van Baren CM, Di Leo Lira P, Bandoni AL. (2007). Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb. Obtenido de colectas en 21 poblaciones de las provincias de Tucumán, Córdoba, San Luis y Catamarca. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(5): 244-245.
- Elechosa MA (coordinator). (2009). Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noroeste de la Argentina. IRB-CIRN-INTA Castelar. Ediciones INTA: 66.
- Epling C. (1939). Las labiadas del noroeste de la Argentina. *Lilloa* 4: 389-446.
- Juliani HR, Brunetti P, Koroch AR. (2021) *Minthostachys verticillata* (Gris.) Epling. Medicinal and Aromatic Plants of South America. Vol. 2, Argentina, Chile and Uruguay. Máthé y Bandoni Editores. Pp 367-378. DOI: 10.1007/978-3-030-62818-5_28
- Lezcano Y, Escalona M, Daquinta, M. (2010). Propagación *in vitro* de *Paeonia* sp. *Actualidades Biológicas*, 32(92): 19-28.
- Murashige T, Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. Wiley Online Library, 15(3): 473-497.
- Ojeda M, Coirini R, Cosiansi J, Zapata R, Zygadlo J. (2001). Evaluation of variability in natural populations of peperina (*Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb.), an aromatic species from Argentina. *Plant Genetic Resources Newsletter* 126: 27-30.
- Ojeda M, Arroyo A, Borgogno P, Biderbost E, Balzarini M. (2004). Yield of peperina (*Minthostachys mollis* (Kunth.) Gri-

seb.) populations in the year following planting: response to cropping regimen. Spanish Journal of Agricultural Research 2(3): 393-399

- Peralta PA, Guariniello J, Bach HG, Escandón AS. (2020). Macro y micropropagación de peperina de las Lomas (*Hedeoma multiflorum* Benth.). Plataformas tecnológicas y comerciales para aromáticas cultivadas, nativas y medicinales / compiladores: Ignacio Paunero, Viviana Spotorno. Buenos Aires: Ediciones INTA. 98-105
- Schmidt-Lebhum AN (2008a). A Revisión of the Genus *Minthostachys* (Labiatae). Mem. New York Bot. Gard. 98: 1-74.
- Schmidt-Lebhum AN. (2008b). Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (Lamiaceae). Journal of Ethnopharmacology. 118: 343-353.
- Sampayo-Maldonado S, Castillo-Martínez CR, Jasso-Mata J, Jiménez-Casas M, López-Upton J, Sánchez-Monsalvo V.

(2016). Efecto del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de genotipos de *Cedrela odorata* L. Agroproductividad. 9(2): 62-69.

- Severin C, Bueno M, Santín F, Giubileo MG. (2011). Respuesta *in vitro* de diferentes biotipos y explantos de *Passiflora caerulea* L. Revista Colombiana de Biotecnología, 13(1): 73-79.
- van Baren CM, Lira PDL, Elechosa MA, Molina AM, Juárez MA, Martínez A, Perelman S, Bandoni AL. (2014). New insights into the chemical biodiversity of *Minthostachys mollis* in Argentina. Biochemical Systematics and Ecology. 57. 374-383
- Zygadlo JA, Maestri DM, Lamarque AL, Guzman CA, Velasco-Negueruela A, Perez-Alonso MJ, García-Vallejos MC, Grosso NR. (1996). Essential oil variability of *Minthostachys verticillata*. Biochem. Syst. Ecol. 24: 319-323.