

Agradecimientos

14

# Capítulo I

## Recursos genéticos

## Variación somaclonal en menta (*Mentha L.*)

Luis Felipe López Hernández y Andrés Javier Cortés Vera

Mensajes clave sobre la variación somaclonal en menta:

- La variación somaclonal es todo aquel polimorfismo genético que no se da por mutación en las células germinales sino por mutación en la línea somática.
- La menta es una hierba fuertemente perfumada de la familia Lamiaceae, que se cultiva principalmente por propagación clonal, lo que la hace una especie valiosa para el estudio de variantes somaclonales y sus consecuencias fenotípicas.
- Las introducciones recientes de pocas especies de menta en América del Sur, seguidas de una propagación clonal desenfrenada, hacen que esta región sea ideal para estudiar el alcance de la diversidad genética somaclonal.
- Este capítulo caracteriza la diversidad somaclonal codificante de la menta en el norte de los Andes, para identificar si habían surgido variaciones somaclonales a pesar de introducciones relativamente recientes.
- Un total de 29 materiales colectados en granjas de exportación de menta, cultivada por propagación clonal en Antioquia (Colombia), han sido genotificados vía RNAseq.
- La captura de 2.033 loci en 912 transcritos a profundidad de 20X fue efectuada mediante la combinación de protocolos GATK4 + Trinity.
- A partir de los 2.033 loci se realizó un análisis de distancia por UPGMA con 10.000 *bootstrap* y los algoritmos de agrupamiento de machine learning: K-means y AGNES, y se identificaron tres grupos genéticos para *M. spicata* y un grupo genético para *M. piperita*.
- Lo anterior muestra que el origen de la *M. spicata* que se cultiva en la región del Oriente antioqueño para exportación y consumo local tiene posiblemente dos ancestrías que se propagaron clonalmente por la zona.
- Uno de los orígenes de *M. spicata* presentó mayor estructura poblacional que el otro, lo que sugiere que posiblemente existan presiones ambientales o antropológicas que intervinieron en la fragmentación de este grupo genético en la región.

La tasa, el alcance y la arquitectura de las mutaciones *de novo*, así como las variaciones somaclonales, han sido durante mucho tiempo preguntas intrigantes en la evolución molecular. Las características genómicas y las restricciones cromosómicas son determinantes en el conocimiento de estos niveles ocultos de variación genética. Los reordenamientos de segregación inusuales y los altos niveles de ploidía también se consideran potenciadores de la diversidad de nucleótidos en escalas de tiempo evolutivo.

Sin embargo, las variaciones somaclonales en periodos de tiempo más superficiales siguen siendo esquivas (Plomion et al., 2018), debido en parte a su supuesta rareza y a la dificultad para identificarlas. Además, a menudo se supone que son neutrales y su valor adaptativo potencial rara vez se ha probado.

El uso de información transcriptómica hace posible a una mayor resolución capturar la variación somaclonal en variantes alélicas. Estudios comparativos como el de Zhao et al. (2019) sugieren que el sistema más eficaz de reconstruir la matriz de variantes alélicas, a partir de la secuenciación de RNA, es la integración de los algoritmos Trinity como ensamblador *de novo* y GATK (*Genome Analysis Toolkit*) como protocolo de llamado de SNPs. La ejecución del protocolo integrado Trinity + GATK recuperó SNPs con una precisión del 100 % en casos de melocotón y mandarina, y fue la primera vez en ser probado para hierbas perfumadas como la menta.

Los cultivos mantenidos por propagación clonal constituyen campos de juego experimentales únicos para apuntar a variantes somaclonales y explorar sus consecuencias fenotípicas. En particular, las especies que se cultivan por sus órganos no reproductivos tienen graves interrupciones en sus sistemas de floración y fructificación, lo que hace que la clonalidad sea una estrategia de propagación obligatoria. La menta, una hierba fuertemente perfumada de la familia Lamiaceae, es un ejemplo de esto. Varias especies se han utilizado durante siglos con fines medicinales y gastronómicos, incluyendo alrededor de 30 especies y especies híbridas que se distribuyen alrededor del globo (Vining et al., 2020). Más allá de su uso como hierbas, especias y para necesidades farmacéuticas, la destilación de aceites esenciales de la menta comercial (mentol) es hoy en día un producto económico mundial. Sin embargo, el potencial bioeconómico de la menta sigue siendo enorme, debido a los metabolitos secundarios y los usos novedosos que aún no se han descubierto.

A pesar del área de distribución nativa cosmopolita de la menta, el único subcontinente donde tuvieron que introducirse como parte del intercambio colombino fue América del Sur. Las introducciones recientes de pocas especies de menta, seguidas de una propagación clonal desenfundada, hacen de esta

región un escenario ideal para estudiar el alcance de la diversidad genética somaclonal. Por lo tanto, se caracteriza la diversidad somaclonal codificante de la menta en el norte de los Andes, para abordar las siguientes preguntas: ¿Habían surgido variaciones somaclonales a pesar de introducciones relativamente recientes? ¿En qué medida albergan potencialmente consecuencias fenotípicas?

## Herramientas para el estudio de la variación somaclonal

A partir del recurso genético de menta en el noroeste de los Andes, se desarrolló una investigación para el estudio de la variación somaclonal con 38 materiales colectados en 14 fincas productoras en la región del oriente del departamento de Antioquia (Colombia), entre septiembre y diciembre de 2019, y bajo condiciones protegidas y de libre exposición. De los 38 materiales colectados, 36 correspondían a *Mentha spicata* y 2 a *Mentha piperita*.

Personal especializado de la Universidad Católica de Oriente (UCO) y productores de cada predio identificaron los materiales en cada especie. Las muestras colectadas consistieron en tallos con raíces, las cuales fueron entregadas a la UCO para su reproducción clonal, con el fin de disponer de suficiente material endurecido para su procesamiento por secuenciación de ARN (ARNseq), en conjunto con la colección de referencia de la UCO para las especies mencionadas.

## Estudio de la diversidad transcriptómica de la menta

Con el fin de recuperar la mayor cantidad y calidad de RNA de la menta colectada, se realizó un experimento comparativo de protocolos de extracción. Se efectuaron seis protocolos diferentes de extracción de RNA, en el laboratorio de genética molecular del Centro de Investigación Tibaitatá de AGROSAVIA (Mosquera, Colombia), en dos muestras aleatorias de *M. piperita* y *M. spicata*, además de las referencias proporcionadas por la UCO para las mismas especies. Los protocolos evaluados fueron: 1) casero Agrosavia; 2) casero Agrosavia, modificado en volúmenes y tiempo; 3) casero Agrosavia con variaciones para especies con altos contenidos de polisacáridos y polifenoles; 4) casero Agrosavia con Trizol; 5) kit comercial Qiagen RNeasy Plant Mini Kit, y 6) kit comercial Qiagen RNeasy Plant Mini Kit con Trizol. El ARN genómico se extrajo a 29 individuos a partir de las hojas de las muestras almacenadas a -80 °C, mediante el kit de extracción comercial de ARN Qiagen RNeasy Plant Mini Kit. La cuantificación de ADN extraído se realizó por método de espectrofotometría con el equipo Nanodrop® 2000 (Thermo Fischer Scientific, Estados Unidos), y por método fluorimétrico con el fluorómetro Qubit® dsDNA HS (Life Technologies, Suecia). La construcción de librerías se realizó a partir

del kit Sure Select Strand-Specific RNA<sup>®</sup> para secuenciación multiplexada por Illumina<sup>®</sup>. Las librerías se cuantificaron por medio del método fluorimétrico en el fluorómetro Qubit<sup>®</sup> dsDNA HS. La concentración y los tamaños de los fragmentos de las librerías de cDNA se evaluaron en el equipo TapeStation 4200<sup>®</sup> (Agilent Technologies, Estados Unidos) y el kit High Sensitivity D1000. Las secuencias de ADN fueron obtenidas mediante el secuenciador HiSeq de Illumina 2500 (Macrogen, Corea del Sur) en un solo sentido (*single-end*).

Con el fin de depurar los datos de la secuenciación de RNAseq, se corrió una rutina automatizada usando el programa Trimmomatic (Bolger et al., 2014) con los parámetros principales: ILLUMINACLIP:TruSeq3-SE:2:30:10, ventana SLIDINGWINDOW:4:20 y MINLEN:50. Posteriormente, se realizó un análisis de la calidad de los archivos *fastq* mediante el programa FastQC (Andrews, 2010), a través de la codificación 1,9 de Illumina. Estudios comparativos como el de Zhao et al. (2019) sugieren que el sistema más eficaz para reconstruir la matriz de variantes genómicas informativas (SNPs), a partir de RNAseq, es la integración de los algoritmos Trinity + GATK. De este modo, se obtuvo el transcriptoma *de novo* de las 29 muestras de menta por medio del programa Trinity (Grabherr et al., 2011) en la plataforma en el proyecto Galaxy versión 2.9.1 (Afgan et al., 2018).

El supertranscrito es útil al ser una referencia para mapear lecturas e identificar polimorfismos alélicos en el contexto de ensamblaje *de novo* sin genoma de referencia. Un supertranscrito se construye colapsando regiones de secuencias únicas y comunes entre isoformas de empalme en una sola secuencia lineal (Davidson et al., 2017). De este modo, en la misma plataforma Galaxy versión 2.9.1 (Afgan et al., 2018), se obtuvo el supertranscrito mediante Trinity para ser usado como referencia en el protocolo de llamado de variantes de GATK4.

Con el fin de identificar polimorfismos alélicos entre las 29 muestras de menta, se construyó un script para automatizar el proceso de llamado de variantes con la función *Haplotype Caller* del protocolo GATK4 (McKenna et al. 2010) con BWA-MEM. Los estadísticos del mapeo se obtuvieron a partir de la función *flagstat* (Li et al., 2009) en la plataforma Samtools 1,9, en el proyecto Galaxy versión 2.0.3 (Afgan et al., 2018). La matriz de SNPs se filtró usando el programa Tassel 5.2.78 (Bradbury et al., 2007), a una profundidad de 20X y porcentaje de datos perdidos por loci de 96 %.

A partir de la identificación de polimorfismos alélicos consolidados en una matriz de SNPs, se realizó un análisis de reducción dimensional lineal por componentes principales moleculares PCA con la función *glPca* del paquete R *adegenet* 2.1.4 (Jombart, 2008). Posteriormente, con el fin de encontrar una subestructura en los conjuntos de *Mentha spicata* y *Mentha piperita*, se realizó un agrupamiento particional y jerárquico a partir de las variables

reducidas. Paralelamente, se corrió un proceso de validación de clustering por medio de la función *optCluster* del paquete R *optCluster* (Sekula et al., 2017), una versión optimizada de la función *clValid* (Brock et al. 2008). Los algoritmos comparados en *optCluster* fueron los algoritmos particionales: K-means (MacQueen, 1967; Lloyd, 1982) y k-medoids (Kaufman & Rousseeuw, 2009); los algoritmos jerárquicos: AGNES (AGglomerative NESTing) y DIANA (Divisive analysis) (Kaufman & Rousseeuw, 2009). Los métodos de validación usados en *optCluster* fueron algoritmo genético y entropía cruzada. También se ejecutó un algoritmo usado ampliamente en ciencia de datos para validación de clustering llamado *NbClust* (Charrad et al. 2014). Por otro lado, se reconstruyó un dendrograma UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) con muestreo aleatorio *bootstrap* de 10.000 réplicas con la función *aboot* del paquete R *poppr* (Kamvar et al., 2014).

## Recomendaciones para optimizar perfiles de ARN

Los 38 materiales colectados y las referencias de *M. piperita* y *M. spicata* se llevaron al invernadero de la UCO para aclimatación homogénea en las mismas presiones ambientales de humedad y temperatura por un periodo de nueve meses. La Unidad de Sanidad Vegetal reportó que todos los materiales se encontraban en estado óptimo de conservación y propagados clonalmente para disponer de suficiente material foliar para la preparación de librerías.

De los seis protocolos realizados a las muestras de menta, el kit comercial Qiagen® RNeasy Plant Mini Kit permitió obtener una mejor calidad de concentración y relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/230. Posteriormente, se realizó la extracción de RNA mediante kit comercial a los 29 materiales en estado óptimo de conservación, donde se encontró una concentración media de ARN (ug/uL) de 922,0206897 (IC: 236,5158607), usando Nanodrop®, concentración media Qubit® (ug/uL) de 94,79172414 (IC: 8,775199689), relación media A260/280 de 2,11034483 (IC: 0,016035813) y relación media A260/230 de 2,014827586 (IC: 0,228618311).

Las 29 librerías genéticas construidas para secuenciación presentaron una concentración media Qubit® (ug/uL) de 18,77241379 (IC: 5,542889311), un tamaño medio de fragmento (bp) de 282,6551724 (IC: 3,099013281) y una cuantificación media TapeStation® de 99,96206897 nM (IC: 29,16482462). Los electroferogramas para cada material sugirieron la distribución de los fragmentos con picos definidos, sin presencia de contaminantes. La información genética de todas las muestras se componía de secuencias con score mayor a 30 usando la codificación 1,9 de Illumina, sin presencia de adaptadores, y con altos porcentajes de duplicación y desviación de GC, lo que era de esperarse en datos RNAseq.

El ensamblaje del transcriptoma sin genoma de referencia mediante Trinity, a partir de todos los *fastqc* depurados, se compone de 509.754 transcritos con una longitud media de 557,9 pb, mínima de 178 pb, máxima de 12.186 pb y porcentaje GC de 43,2 %. El transcriptoma presenta isoformas de empalme que podrían incrementar la tasa de falsos positivos en el llamado de variantes alélicas. Así, a partir del transcriptoma y los *fastqc* depurados, se construyó un supertranscrito que colapsa regiones de secuencias únicas y comunes entre isoformas de empalme en una sola secuencia lineal. El supertranscrito se compone de 352.512 transcritos con una longitud media de 472,2 pb, mínima de 201 pb, máxima de 15.765pb y porcentaje GC de 43,1 %.

### Variación somaclonal revela grupos crípticos en menta

A partir de la información transcriptómica de los 29 materiales de menta, se obtuvo una matriz de variantes alélicas del supertranscrito construido a partir del mismo set de trabajo, usando la combinación de protocolos GATK + Trinity, dedicados a datos RNAseq para llamado de SNPs.

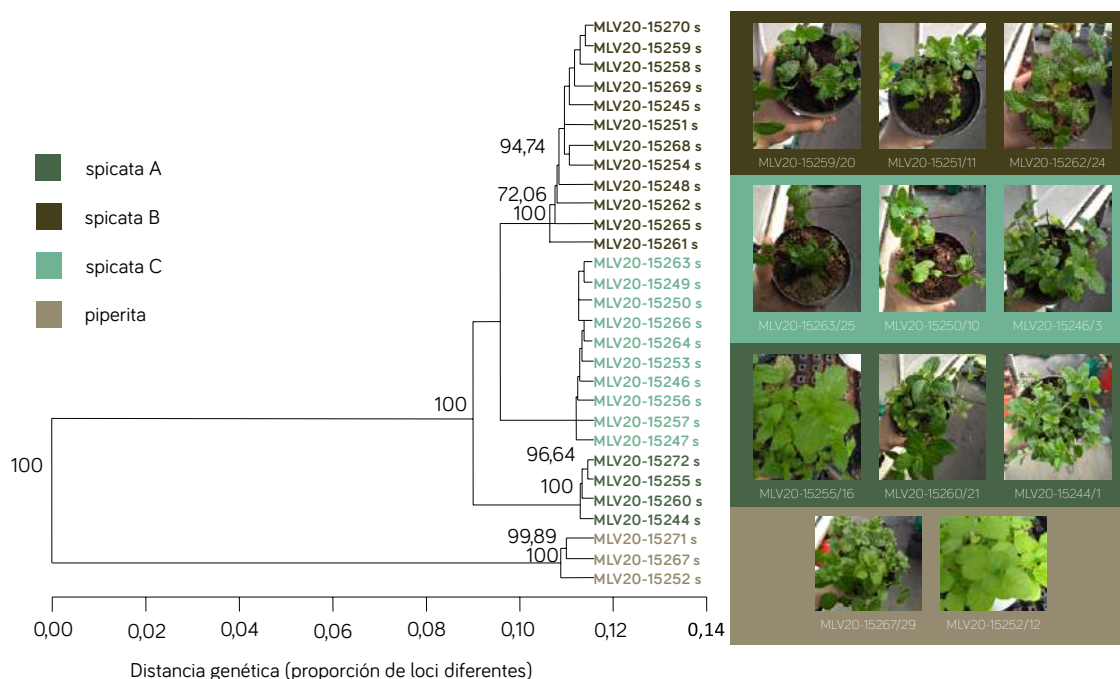
A partir de la información de variantes alélicas, también se hizo un análisis de reducción dimensional lineal por componentes principales como entrada a algoritmos de agrupamiento (por ejemplo, k-means, k-medoids y jerárquicos), así como análisis de distancia para visualización por dendograma. Todos los algoritmos muestran ampliamente la diferencia entre materiales de *M. piperita* y *M. spicata*, lo que comprueba el uso de *M. piperita* como control para la exploración de la diversidad genética de *M. spicata*. El análisis de búsqueda de número óptimo de clúster y el dendograma por UPGMA sugieren la presencia de tres posibles grupos de *M. spicata* y uno de *M. piperita*.

Siguiendo el protocolo GATK4, se desarrolló un *script* para automatizar el proceso para su reproducción. De los 29 materiales, se tuvo una media global de 15.588.705 (IC: 1.368.899) de lecturas, de las cuales se mapearon un total de 15.136.482 (IC: 1.403.825), lo que sugiere un porcentaje de mapeo del 96,81 %. Se presentó un alto contenido de lecturas duplicadas en el mapeo, con un promedio de 11.257.168 (IC: 1.166.846). Al ser removidos en el protocolo GATK4, se obtuvo un promedio de 3.879.314 (IC: 293.552) lecturas sin duplicados para el conjunto de 29 materiales. Finalmente, se obtuvo una matriz de variantes alélicas de 2.033 loci en 912 transcritos para las 29 muestras, a profundidad de 20X y porcentaje de datos perdidos por loci de 96 %.

Con el fin de explorar la variabilidad genética de la menta que actualmente se produce en el Oriente antioqueño, se realizó un análisis de agrupamiento vía PCA y agrupamiento por distancias genéticas mediante UPGMA.

A partir de los 2.033 loci distribuidos en 912 transcritos, se hizo una reducción dimensional de componentes principales, donde el primer componente explica el 58,552 % de la varianza, el segundo componente, un 22,274 % y el tercero, un 11,283 %. A partir de los tres primeros componentes principales (92,109 %), se corrió el análisis de validación de clustering, donde los algoritmos *NbClust* y *optCluster*, validados por algoritmo genético y entropía cruzada, sugirieron un total de cuatro clústeres.

Por otro lado, los mejores algoritmos de reconstrucción del agrupamiento fueron K-means y AGNES, los cuales generaron la misma organización de muestras. Finalmente, el enfoque UPGMA muestra cuatro grupos diferenciados por *bootstrap*, tal como se dispone en la figura 1.1. En los cuatro grupos genéticos obtenidos por enfoques de algoritmos de agrupamiento parcial y por distancia genética, se mostró que el grupo *M. piperita* está ampliamente diferenciado del resto. Los grupos restantes son todos *M. spicata*, que se dividen en tres grupos (A, B y C), donde A y B tiene muy poca divergencia frente al primer componente y están distantes frente a C, por el segundo.



**Figura 1.1.** Dendrograma reconstruido por UPGMA, a partir de los 2.033 loci distribuidos en 912 transcritos, con metodología de validación por remuestreo aleatorio *bootstrap*, con 10.000 iteraciones, basados en la distancia de *Nei*. Se evidencia la presencia de cuatro grupos genéticos validados por *bootstrap* de 100 %.

Fuente: Elaboración propia

## Conclusiones

El origen de la menta que se cultiva en la región oriente de Antioquia para exportación y consumo local tiene posiblemente dos orígenes, tal vez debido a su propagación clonal por toda la zona productiva.

Uno de los posibles orígenes de *M. spicata* presentó mayor estructura poblacional que el otro, lo que sugiere presiones ambientales o antropológicas que intervinieron en la fragmentación de este grupo genético.

## Referencias

- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., Van Den Beek, M., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A., & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W537-W544. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>
- Andrews, S., Krueger, F., Segonds-Pichon, A., Biggins, L., Krueger, C., & Wingett, S. (2010). FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data. *Babraham Bioinformatics*, 370.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D. E., Casstevens, T. M., Ramdoss, Y., & Buckler, E. S. (2007). TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23(19), 2633-2635. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308>
- Brock, G., Pihur, V., Datta, S., & Datta, S. (2008). cValid: An R package for cluster validation. *Journal of Statistical Software*, 25, 1-22. <https://www.jstatsoft.org/article/view/v025i04>
- Charrad, M., Ghazzali, N., Boiteau, V., Niknafs, A., & Charrad, M. M. (2014). Package 'nbclust'. *Journal of Statistical Software*, 61, 1-36. <https://www.jstatsoft.org/article/view/v061i06>
- Davidson, N. M., Hawkins, A. D., & Oshlack, A. (2017). SuperTranscripts: A data driven reference for analysis and visualisation of transcriptomes. *Genome Biology*, 18(1), 1-10. <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-017-1284-1>
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., & Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644-652.

- Jombart, T. (2008). Adegnet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403-1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., & Grünwald, N. J. (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2, e281. <https://peerj.com/articles/281/>
- Kaufman, L., & Rousseeuw, P. J. (2009). *Finding groups in data: an introduction to cluster analysis* (Vol. 344). John Wiley & Sons.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., & Durbin, R. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Lloyd, S. P. (1982). Least-Squares Quantization in PCM. *IEEE Transactions on Information Theory*, 28, 129-137.
- MacQueen, J. B. (1967). *Some methods for classification and analysis of multivariate observations. Proceedings of 5th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*. University of California Press.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., & DePristo, M. A. (2010). The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9), 1297-1303. <https://genome.cshlp.org/content/20/9/1297.full.pdf>
- Plomion, C., Aury, J. M., Amselem, J., Leroy, T., Murat, F., Duplessis, S., Faye, S., Francillonne, N., Labadie, K., Le Provost, G., Lesur, I., Bartholomé, J., Faivre-Rampant, P., Kohler, A., Leplé, J. C., Chantret, N., Chen, J., Diévar, A., Alaeitabar, T., Barbe, V., & Salse, J. (2018). Oak genome reveals facets of long lifespan. *Nature Plants*, 4, 440-452. <https://www.nature.com/articles/s41477-018-0172-3>
- Sekula, M., Datta, S., & Datta, S. (2017). optCluster: An R package for determining the optimal clustering algorithm. *Bioinformatics*, 13(3), 101. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28584451/>
- Vining, K. J., Hummer, K. E., Bassil, N. V., Lange, B. M., Khoury, C. K., & Carver, D. (2020). Crop wild relatives as germplasm resource for cultivar improvement in mint (*Mentha L.*). *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01217>
- Zhao, Y., Wang, K., Wang, W. L., Yin, T. T., Dong, W. Q., & Xu, C. J. (2019). A high-throughput SNP discovery strategy for RNA-seq data. *BMC Genomics*, 20(1), 1-10. <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-019-5533-4>

## Material de siembra en el cultivo de hierbabuena o menta verde

Dagoberto Castro Restrepo, María Isabel Domínguez Rave y Jesús Jaiber Díaz García

El género *Mentha* tiene un genoma complejo con alto nivel de poliploidía, es decir, son plantas que contienen más de dos juegos completos de cromosomas. Esta es una forma de evolución de la especie y una manera de adaptarse a diferentes condiciones ambientales, que le ha permitido establecerse en todo el mundo (Heylen et al., 2021). La *M. spicata* pertenece a la familia Lamiaceae, con origen en el norte de Inglaterra y cultivada en zonas climáticas tropicales y templadas. Debido a la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides, carvona y ácido ascórbico en las hojas, se utiliza en la industria alimenticia, farmacéutica y ornamental, con importantes efectos antimicrobianos y antioxidantes, así como en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y hepáticas (Kee et al., 2017).

### Propagación a partir de semilla sexual

La *M. spicata* es una especie que requiere condiciones estacionales para la producción de la semilla sexual. La menta verde es un híbrido poliploide estéril, lo que dificulta su reproducción convencional para mejorar los cultivos. Debido a su amplia diversidad genética y a la tendencia a cruzarse con otras especies de la misma familia, la propagación por semilla presenta alta variabilidad en la altura de las plantas, contenidos de aceite, olor y sabor, entre otros (Tucker et al., 2012). Sin embargo, para quienes quieren seleccionar nuevos materiales, esta es una oportunidad para desarrollar su propio clon o material de siembra.

### Propagación vegetativa o asexual

En vista de las dificultades de *M. spicata* para la reproducción por semilla sexual, la forma más segura para su multiplicación es mediante esquejes o rizomas, que garantizan que las características de las plantas cumplan los requisitos requeridos por los mercados nacionales e internacionales. Es importante aclarar que la denominación de *semilla* se hace tanto para semilla sexual como para semilla asexual o vegetativa. Por lo tanto, debido a que la reproducción de este cultivo es mediante propagación vegetativa, nos estaremos refiriendo en adelante a semilla asexual, que debe reunir ciertas características de calidad para garantizar el éxito del cultivo.

## Semilla de calidad

En el caso de la menta, semilla de *alta calidad* se refiere a los esquejes o estolones libres de patógenos, que correspondan a la variedad requerida, la calidad física de las plantas, la calidad del sustrato, la adaptación a las condiciones ambientales específicas y los tipos de metabolitos secundarios. El Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, 2015) define la alta calidad como “el conjunto de atributos de la semilla que involucra factores genéticos, físicos, fisiológicos y fitosanitarios”. La ventaja de utilizar semilla de calidad previene la introducción y/o propagación de muchas enfermedades no deseadas en el cultivo.

Cuando se realiza la propagación vegetativa, se corre el riesgo de multiplicar algunas enfermedades como los virus, viroides, fitoplasmas, bacterias y algunos hongos que se desarrollan en la planta de manera endógena y sistémica, y que tienen la capacidad de transmitirse a las siguientes generaciones. Este problema se denomina *degeneración de la semilla*, que se debe a la ausencia de programas de certificación de materiales libres de patógenos (Sharma et al., 2017).

Cuando se utilizan semillas vegetativas de plantas que tienen alguna de estas enfermedades, no existe forma de realizar manejo químico o biológico y el único método de control es la erradicación, lo que implica pérdidas económicas importantes para el productor.

En la tabla 1.1 se muestra la lista de algunos agentes fitopatógenos que pueden ser transmitidos a través de la semilla vegetativa y que fueron identificados en cultivos comerciales de menta en algunos municipios del Oriente antioqueño.

**Tabla 1.1.** Algunos patógenos en *Mentha spicata* que pueden transmitirse a partir de esquejes o rizomas encontrados en cultivos del Oriente antioqueño

Nombre del patógeno	Acónimo / síntoma	Transmisión	Forma de diagnóstico
Virus del mosaico del cocombro	CMV	Áfidos, semilla	ELISA, PCR
Virus del bronceado del tomate	TSWV	Trips, semilla	ELISA, PCR
Potyvirus	Poty	Áfidos, semilla	ELISA, PCR
Virus del mosaico del tabaco	TMV	Contacto	ELISA
<i>Rhizoctonia</i> spp.	Pudrición basal	Suelo, semillas	Medios de cultivo
<i>Fusarium</i> spp.	Marchitez	Suelo, semillas	Medios de cultivo
<i>Verticillium</i> sp.	Marchitez	Suelo, semillas	Medios de cultivo
<i>Meloidogyne</i> spp.	Nudos radicales	Suelo, semillas	Diagnóstico de laboratorio

Fuente: Elaboración propia

La figura 1.2 muestra plantas de *M. spicata* afectadas por los virus CMV, TSWV y Potyvirus, los cuales fueron identificados mediante técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). El gran riesgo que se corre al utilizar semilla a partir de estas plantas infectadas es que el patógeno puede distribuirse a todo el cultivo y afectar completamente la calidad del material producido, además de facilitar su dispersión en todo el territorio al intercambiar semilla con otros productores. En caso de encontrar síntomas similares a los presentados, se sugiere acudir al ICA o a laboratorios de diagnóstico para su identificación.



**Figura 1.2.** Síntomas de plantas de *M. spicata* afectadas por **a.** Virus TSWV; **b.** Virus CMV; **c.** Potyvirus.

Fotos: María Domínguez

## Producción de semilla de calidad

Resultaría muy costoso desarrollar una sola planta libre de varios de los patógenos que se presentan en la tabla 1.1; por ello, se han desarrollado técnicas de laboratorio para la reproducción masiva de materiales de siembra. Esta se denomina micropropagación y consiste en la siembra de un meristemo o ápice meristemático en un medio artificial de cultivo para luego realizar la multiplicación.

## Micropropagación de la menta para la producción de plantas núcleo

El proceso de micropropagación de la menta se inicia con la selección de las plantas madre, las cuales deben tener características de calidad y producción adecuadas para el mercado de exportación o para la producción de aceites esenciales. Las plantas iniciales son diagnosticadas en laboratorio mediante la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), que permite detectar si el virus se encuentra en el tejido de la planta. De igual manera, se emplea una técnica más eficaz como la PCR, que permite detectar los virus en las fases más tempranas de la enfermedad. Una vez se tiene una planta completamente diagnosticada

para los virus, se procede al aislamiento de un tejido llamado meristemo, que corresponde a un grupo de células responsables del crecimiento ubicado en los ápices de las plantas, los entrenudos y las puntas de las raíces.

El meristemo se siembra en un medio de cultivo artificial que contiene sales minerales, vitaminas, sacarosa y reguladores de crecimiento; el proceso incluye cuatro fases: i) establecimiento del meristemo en el medio de cultivo; ii) multiplicación o proliferación; iii) enraizamiento *in vitro*, y iv) climatización o endurecimiento de las plantas en vivero (Castro et al., 2011).

La ventaja de utilizar este procedimiento de micropropagación (propagación *in vitro*) es que, a partir de un solo meristemo, como en el caso de la menta, se pueden producir más de mil individuos en tiempos relativamente cortos, en poco espacio, con la garantía de mantener la misma información fenotípica y genotípica de la planta inicial y libre de patógenos.

## Certificación de las plantas de menta

En términos legales, el proceso de certificación de materiales de siembra para Colombia está a cargo del ICA. Se inicia con la propagación de plantas garantizadas libres de patógenos (plantas núcleo), las cuales se utilizan para el establecimiento de “bloques madres”, que pueden ser multiplicadas en un vivero registrado ante el ICA o por el productor, para introducirlo directamente en su cultivo. Sin embargo, vale la pena mencionar que para el caso de algunas plantas de interés condimentario, medicinal y aromático, existe una legislación en torno a la semilla sexual certificada, pero no es explícita la certificación de material de menta propagado vegetativamente.

## Manejo de plantas madre o plantas para semilla básica

Este proceso se puede asimilar al que se emplea para la producción de material de alta calidad en ornamentales y tubérculos, que parte de plantas micropropagadas (plantas super élite), las cuales serán el inicio de plantas madre o plantas básicas. Para su manejo, se sugiere utilizar la siguiente estrategia:

- A partir de la planta madre *in vitro* o garantizada libre de virus, sembrarlas y mantenerlas en un invernadero con cubierta de plástico y con paredes en malla antiáfidos; en algunos lugares se les denomina “casa-malla”, con un piso en grava, cemento o tela cubresuelo. Para las etapas iniciales, es recomendable utilizar una malla de polisombra (malla sarán), del 40 al 60 % de retención de luz y una antecámara que impida el ingreso directo de insectos que puedan ser vectores de virus y otras enfermedades.

- Los módulos para la siembra pueden ser variados: camas en el suelo, camas levantadas en diversos materiales como madera inmunizada, plástico o ladrillo.
- Sustratos: i) arena, que implica la utilización de riego por goteo o cinta exudante, y ii) mezclas de suelo con compost y arena.

Los sustratos deben ser desinfectados por solarización, que consiste en someter el sustrato a la acción del sol durante 3 a 4 semanas; para ello, este debe estar herméticamente recubierto con un plástico transparente calibre 6. Una vez cumplido ese lapso, se recomienda la utilización de hongos antagonistas como *Trichoderma* spp., los cuales se aplican en forma de drench.

- Para el manejo de las plantas madre es recomendable realizar un “pinch” o poda del brote apical para permitir la emisión de tallos laterales. Para mantener la planta madre en estado juvenil, es necesario cortar los esquejes con la mayor frecuencia posible.

La importancia de utilizar plantas certificadas o de calidad fitosanitaria conocida radica en que la calidad de la semilla juega un papel clave en el éxito del cultivo y ayuda a prevenir la introducción o propagación de muchas enfermedades. Evidencia de ello es la presencia de virus como el CMV y TSWV, que en algunos cultivos comerciales ha presentado pérdidas del 100 %.

## Producción de esquejes a partir de plantas madre

Generalmente, corresponde a esquejes que permiten mantener las características de la planta original. La técnica de propagación es bastante sencilla, rápida y de bajo costo para el productor. A continuación, se indica el proceso para su producción:

- Infraestructura: se recomienda utilizar cámaras de enraizamiento, las cuales se construyen con plástico soportado por madera, tubos plásticos o varillas de 2 x 1,5 x 0,4 m de altura, completamente hermético.
- Se seleccionan esquejes de aproximadamente 10 a 15 cm de longitud.
- Sustratos: se han ensayado varias alternativas, como una mezcla de suelo, arena y compost, en proporciones iguales; luego, estos sustratos son solarizados para disminuir el riesgo de arvenses y plagas. También se ha utilizado con éxito fibra de coco o arena.

- Tipo de recipiente para el enraizamiento: se sugiere utilizar bandejas semilleras.
- La adición de hongos formadores de micorrizas en el fondo del sustrato mejora el enraizamiento y la absorción de nutrientes, especialmente del fósforo.

La figura 1.3 muestra un esqueje derivado de plantas madre.



**Figura 1.3.** Esqueje de menta derivado de una planta madre.

Foto: María Domínguez.

## Referencias

Castro, D., Díaz, J., Osorio, E., Martínez, T., Urrea, P., & Muñoz, D. (2011). *Importancia de la calidad del material de siembra en plantas medicinales*. Universidad Católica de Oriente.

Heylen, O. C. G., Debortoli, N., Marescaux, J., & Olofsson, J. K. (2021). A revised phylogeny of the *Mentha spicata* clade reveals cryptic species. *Plants*, 10(4), 819. <https://doi.org/10.3390/plants10040819>

Instituto Colombiano Agropecuario [ICA]. (2015). Resolución 3168. "Por medio de la cual se reglamenta y controla la producción, importación y exportación de semillas producto del mejoramiento genético para la comercialización y siembra en el país, así como el registro de las unidades de evaluación agronómica y/o unidades de investigación en fitomejoramiento y se dictan otras disposiciones". <https://bit.ly/3JFTzPK>

Kee, L., Bakr, A., & Salihin, A. B. (2017). Bioactivity and health effects of *Mentha spicata*. *Integrative Food, Nutrition and Metabolism*, 5(1), 1-2. <https://www.oatext.com/bioactivity-and-health-effects-of-mentha-spicata.php>

Sharma, T., Piedra, J., Yepes, J., Hernández, F. N., Jeger, M. J., Jones, A. C., Kromann, P., Legg, J., Forbes, Y., & Garrett, K. A. (2017). A risk assessment framework for seed degeneration: Informing an integrated seed health strategy for vegetatively propagated crops. *Phytopathology*, 107(10), 1123-1135. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-16-0340-R>

Tucker, A. O. (2012). Genetics and breeding of the genus *Mentha*: a model for other polyploid species with secondary constituents. *Journal of Medicinally Active Plants*, 1(1), 19-29. <https://scholarworks.umass.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1000&context=jmap>