

Avances en la producción de metabolitos secundarios de interés farmacológico a partir de material vegetal de *Stevia rebaudiana*, Bert.



Susana Vilariño Rodríguez
2022

Índice

1. Capítulo 1. Introducción general	1
1.1. Metabolitos secundarios	1
1.2. Interés farmacológico.....	2
1.3. Optimización del material vegetal para la inducción de metabolitos secundarios	5
1.3.1. Cultivo <i>in vitro</i>	5
1.4. Elicitores	13
1.5. Estevia (<i>Stevia rebaudiana</i>).....	14
1.5.1. Variedades de estevia	17
1.6. Biorreactores	18
1.7. Objetivos generales	20
1.8. Bibliografía.....	21
2. Capítulo 2. Optimización de la micropropagación y callogénesis en <i>Stevia rebaudiana</i> . Uso de biorreactores.....	29
2.1. Introducción	29
2.1.1. Micropropagación	29
2.1.2. Callogénesis.....	31
2.2. Objetivos	33
2.3. Materiales y métodos.....	33
2.3.1. Micropropagación	33
2.3.2. Resultados	40
2.4. Callogénesis.....	52
2.4.1. Material y métodos	52
2.4.2. Resultados	54
2.5. Discusión	57
2.6. Bibliografía.....	69
3. Capítulo 3. Uso de elicitores para incrementar la producción <i>in vitro</i> de metabolitos secundarios de <i>Stevia rebaudiana</i> cultivada en sistema sólido y biorreactor.	80
3.1. Introducción	80
3.1.1. Elicitación	80
3.1.2. Caracterización de los metabolitos secundarios obtenidos.....	88
3.2. Objetivos	90
3.3. Material y Métodos.....	90
3.3.1. Elicitación en plantas micropropagadas.....	90
3.3.2. Elicitación en callos y cultivos celulares	92

3.3.3.	Caracterización de los metabolitos secundarios obtenidos.....	94
3.4.	Resultados	97
3.4.1.	Elicitación en plantas micropropagadas.....	97
3.4.2.	Caracterización de los metabolitos secundarios obtenidos.....	104
3.5.	Discusión	126
3.6.	Bibliografía.....	135
4.	Capítulo 4. Discusión general	145
4.1.	Bibliografía.....	147
5.	Capítulo 5. Conclusiones	¡Error! Marcador no definido.

Resumen general

Hasta ahora las plantas de estevia se han empleado fundamentalmente para la obtención de edulcorantes bajos en calorías. No obstante, se conoce su capacidad para producir ciertos compuestos de gran interés en farmacología. Para optimizar la producción de metabolitos secundarios con interés farmacológico en esta Tesis se acometen dos aspectos: La optimización del material vegetal inicial para implementar sistemas de producción a gran escala de dichos metabolitos y en segundo lugar la adición de elicitores al cultivo para estimular la obtención dirigida de los compuestos citados. En relación con el primer aspecto se emplean tres sustratos y dos sistemas de cultivo en plantas micropropagadas de dos variedades de estevia, Criolla y Morita III. Los resultados obtenidos permiten afirmar que el factor de multiplicación o productividad es mayor en las plántulas de la variedad Criolla creciendo en sustrato de Murashige-Skoog (MS) tanto en sistema de cultivo sólido como en biorreactor. Las plántulas de Morita presentan mayor productividad en los sustratos sólidos MS y MS con menores dosis de compuestos nitrogenados, tanto sólido como en biorreactor. Los niveles de malondialdehído (MDA) no indican daño a la membrana celular de las plantas obtenidas. El estudio del estado nutricional de hojas de ambas variedades permite concluir que las diferentes situaciones ensayadas no alteran significativamente este estado, siendo ésta la primera investigación que proporciona una gama de macro y micronutrientes en hojas de estevia, lo que sugiere su posible uso como referencia para futuras investigaciones. Respecto a la optimización de la callogénesis para el establecimiento de cultivos celulares tras 40 días de cultivo se obtienen porcentajes de formación de callo cercanos al 100% tanto en luz como en oscuridad, siendo los de mejor calidad respecto a friabilidad y peso fresco los desarrollados en condiciones de oscuridad y en presencia de ácido naftil acético y la concentración más alta de kinetina, con una ligera mejor respuesta en los callos de hojas de la variedad Morita. La presencia de los elicitores ácido salicílico y metil jasmonato en cultivos, tanto de plantas como de callos y células, a pesar de haber mermado el desarrollo de la planta cuando se usa ésta como material de partida, multiplica por varias decenas de veces respecto al control sin elicitores la liberación al medio de una amplia gama de metabolitos secundarios. Se obtienen ácidos clorogénicos con marcadas propiedades beneficiosas para la salud ya sean antimicrobianas (ácidos 3 cafeoilquínico o p-cumárico), potenciadoras del sistema inmunológico (derivados de los ácidos clorogénicos o ácido ferúlico), antidepresivas (Kaempferol), contra enfermedades derivadas de disfunciones pancreáticas y hepáticas (ácido 3 cafeoilquínico) y en todos los casos con alta efectividad contra una amplia gama de cánceres.

General summary

Until now, stevia plants have been used primarily to obtain low-calorie sweeteners. However, its ability to produce certain compounds of great interest in pharmacology is known. To optimize the production of secondary metabolites with pharmacological interest in this Thesis, two aspects are addressed: The optimization of the initial plant material to implement large-scale production systems for these metabolites and secondly, the addition of elicitors to the crop to stimulate the targeted production of the mentioned compounds. In relation to the first aspect, three substrates and two culture systems are used in micropropagated plants of two varieties of stevia, Criolla and Morita III. The results obtained allow us to affirm that the multiplication or productivity factor is greater in the plantlets of the Criolla variety growing in Murashige-Skoog (MS) substrate, both in a solid culture system and in a bioreactor. Morita plantlets show higher productivity in solid MS and MS substrates with lower doses of nitrogenous compounds, both solid and in bioreactor. The levels of malondialdehyde (MDA) do not indicate damage to the cellular membrane of the plants obtained. The study of the nutritional status of leaves of both varieties allows us to conclude that the different situations tested do not significantly alter this status, this being the first investigation that provides a range of macro and micronutrients in stevia leaves, which suggests its possible use as a reference for future investigations. Regarding the optimization of callogenesis for the establishment of cell cultures after 40 days of culture, percentages of callus formation close to 100% are obtained both in light and in darkness, with the best quality regarding friability and fresh weight being those developed in dark conditions and in the presence of naphthaleneacetic acid and the highest concentration of kinetin, with a slightly better response in the calluses of leaves of the Morita variety. The presence of the elicitors salicylic acid and methyl jasmonate in cultures, both of plants and calluses and cells, despite having reduced the development of the plant when it is used as starting material, multiplies by several tens of times compared to the control without elicitors the release of a wide range of secondary metabolites into the medium. Chlorogenic acids with marked beneficial properties for health are obtained, whether antimicrobial (3-caffeoylquinic or p-coumaric acids), immune system enhancers (derived from chlorogenic acids or ferulic acid), antidepressants (Kaempferol), against diseases derived from pancreatic and hepatic dysfunctions (3-caffeoylquinic acid) and in all cases with high effectiveness against a wide range of cancers.

Capítulo 1

Introducción general

1. Capítulo 1. Introducción general

1.1. Metabolitos secundarios

Las plantas destinan una cantidad importante de fotoasimilados y energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas, que no tienen una función directa en el metabolismo primario, denominadas metabolitos secundarios. El conjunto de estas moléculas pequeñas conforma el metaboloma, que se relaciona directamente con el fenotipo y comprende a todos los metabolitos intracelulares (endometaboloma) y a todos los excretados al fluido extracelular (exometaboloma). En consecuencia, la metabolómica se ha definido como “el estudio global y no sesgado del conjunto de moléculas pequeñas (<1 kDa) en un biofluido, tejido, órgano u organismo” (Beyoğlu e Idle, 2013). Como se ha indicado los metabolitos secundarios no están directamente implicados en funciones vitales, pero generalmente tienen una función biológica importante como, por ejemplo, la defensa contra predadores, parásitos o enfermedades, la competencia entre especies o la implicación en la reproducción (colores, olores, etc.), así como en procesos de señalización celular. Los metabolitos son moléculas muy diversas químicamente, no se encuentran confinados, como en el caso del ADN, y están presentes en el organismo en un gran número. Según Molina-Calle (2017) un sistema vegetal puede alcanzar hasta los 200.000 aunque para Chandra Gili y cols. (2016) el número total puede llegar a los 500.000. No solamente su número es importante, sino que además se pueden encontrar en un amplio rango de concentraciones que puede abarcar desde picomoles a milimoles. Por todo ello, su detección, caracterización y cuantificación hacen necesaria la aplicación de técnicas analíticas muy diversas. Los metabolitos secundarios, además, presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies.

1.2. Interés farmacológico

La vida en un entorno rico en oxígeno ha supuesto la adaptación de los organismos a la convivencia con esta molécula y con sus derivados, denominados en su conjunto especies reactivas de oxígeno -ROS (Radical Oxygen Species)-, las cuales se han integrado de manera imprescindible en la señalización intra e intercelular. Las ROS son mediadores de funciones celulares esenciales como la expresión de genes, la fosforilación de proteínas, la activación de los factores de transcripción, la síntesis de ADN o la proliferación celular. Sin embargo, las ROS desempeñan un papel bivalente, ya que sobrepasados los límites oxidativos permitidos, estas moléculas se convierten en potentes destructores celulares. Para combatir el potencial citotóxico de las ROS, los seres vivos han desarrollado eficientes sistemas antioxidantes y maquinarias de reparación del daño oxidativo (Vaquero-Raya y Molero-Richard, 2005). Estas ROS y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) son generadas de forma endógena por la respiración mitocondrial y son aportadas por la exposición exógena a agentes oxidantes, incluidas las radiaciones ionizantes, los metales pesados y la hipoxia (Jena, 2012).

El uso de fitoquímicos en el tratamiento de enfermedades se conoce desde tiempos inmemoriales y se desarrolló a través de la práctica médica basada en plantas, habituales hoy como materias primas vegetales de medicamentos modernos producidos por la industria farmacéutica.

Desde el descubrimiento, y posterior aislamiento, del ácido ascórbico en el año 1927 por Szent-Györgyi, que le valió el Premio Nobel de Medicina en 1937, la capacidad antioxidante de las plantas ha recibido gran atención identificándose una amplia variedad de compuestos con esta capacidad, entre ellos una extensa serie de metabolitos secundarios. Según Espinosa-Leal y cols. (2018), a pesar de la extensa investigación sobre metabolitos secundarios desde esas primeras décadas del siglo pasado, las estimaciones actuales indican que solo alrededor del 6% de las plantas superiores (entre 300000 y 500000 especies) han sido estudiadas sistemáticamente por su potencial farmacológico, y solo el 15% se ha evaluado para fitoquímicos en general. Por tanto, el potencial de las plantas superiores como fuente de nuevos fármacos todavía está en gran parte inexplorado (Hostettaman y Walfender, 1997).

Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono (Figura 1).

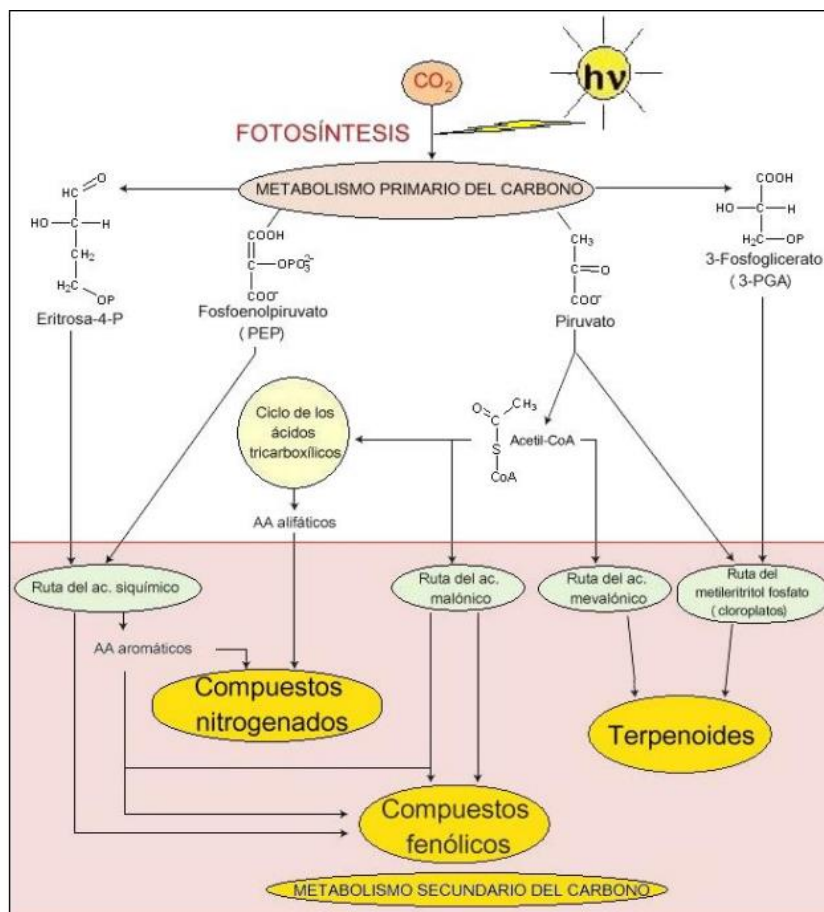


Figura 1.- Elementos del metabolismo del carbono en relación con las rutas de síntesis de metabolitos secundarios. (según Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Los metabolitos secundarios se agrupan generalmente en tres clases: terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides. Aunque los terpenos, según Shahzad y cols. (2013), se encuentran en mayor proporción (55%, Figura 3), el interés por los compuestos fenólicos, estructuras moleculares que contienen al menos un grupo fenol (un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo) (Figura 2), ha aumentado considerablemente durante las últimas décadas debido a su carácter levemente ácido y, especialmente, muy oxidante produciendo efectos beneficiosos en las enfermedades cardiovasculares, los síntomas posmenopáusicos, el cáncer (Dixon y Ferreira 2002; Nastel 2004; Grof 2018; Naim-Feil y cols. 2021) y tratamientos cosméticos anti-edad.

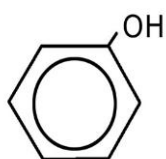


Figura 2. Anillo fenólico

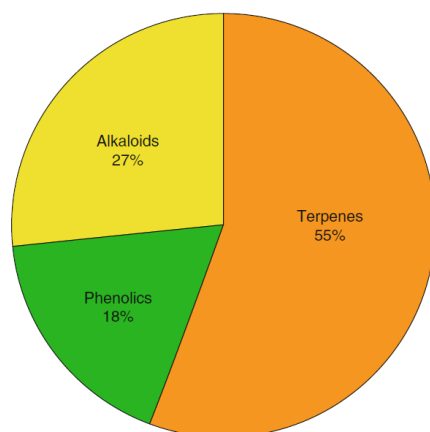


Figura 3.- Gráfico circular que representa los principales grupos de metabolitos secundarios de las plantas. (Shahzad y cols. 2013).

Los compuestos fenólicos aparecen cuando la planta se somete a un determinado tipo de estrés, generalmente biótico como una infección, entonces ésta segrega una batería de estos compuestos que oxidan fuertemente el medio intracelular. Esto tiene dos consecuencias: primero, pueden ser capaces, por sí solos, de eliminar al patógeno y en segundo lugar activan los genes de defensa de la planta, creando un ambiente mucho más agresivo para el patógeno. Dentro de los compuestos fenólicos se debe hacer mención de los flavonoides, que son sustancias fenólicas hidroxiladas, que se presentan como una unidad C6-C3 unida a un anillo aromático. Las flavonas son flavonoides, son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. La adición de un grupo 3-hidroxilo produce un flavonol (Fessenden y Fessenden 1982). Dado que se sabe que las plantas los sintetizan en respuesta a una infección microbiana (Dixon y cols. 1983), no debería sorprender que se haya descubierto que son sustancias antimicrobianas eficaces contra una amplia gama de microorganismos. Su actividad se debe probablemente a su capacidad para formar complejos tanto con proteínas extracelulares solubles, como con paredes celulares bacterianas, como ocurre con las quinonas. Los compuestos flavonoides exhiben efectos inhibidores contra múltiples virus. Numerosos estudios han documentado la eficacia de flavonoides como la crisina (Critchfield y cols. 1996) contra el VIH. Kaul y cols. (1985) probaron el efecto de la quercetina, la naringina, la hesperetina y la catequina sobre monocapas de células en cultivo *in vitro* sometidas a diversos virus. Si bien la naringina, glicósido de la naringenina (Marchionatti y cols. 2018) no inhibió el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1), el poliovirus tipo 1, el virus de la parainfluenza tipo 3 o el RSV, los otros tres

flavonoides sí fueron efectivos. La hesperetina redujo la replicación intracelular de los cuatro virus; la catequina inhibió la infectividad pero no la replicación intracelular de RSV y HSV-1; y la quercetina fue efectiva para reducir la infectividad. Otros autores proponen que las pequeñas diferencias estructurales en los compuestos son críticas para su actividad y señalan otra ventaja de muchos derivados de plantas: su bajo potencial tóxico en humanos (Naseem y Farhat , 2016).

Dado que la dieta promedio diaria occidental contiene aproximadamente 1 g de flavonoides variados (Kuhnau 1976), no es probable que las concentraciones farmacológicamente activas sean perjudiciales para los humanos (Shahzad y cols. 2013).

1.3. Optimización del material vegetal para la inducción de metabolitos secundarios

1.3.1. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es un área importante de la Biotecnología vegetal que, entre otras muchas aplicaciones, se puede utilizar para la producción de metabolitos en condiciones de laboratorio (Figura 4). La obtención de metabolitos secundarios mediante técnicas *in vitro* ofrece muchas ventajas sobre las otras fuentes de producción, por ejemplo la eliminación de la sobreexplotación de las plantas de interés, mayoritariamente silvestres, que pueden llegar a estar amenazadas o en extinción; la producción a gran escala de plantas que en condiciones naturales presentan un crecimiento lento y la mayor eficacia en la obtención de los compuestos de interés que se producen en bajas concentraciones en las plantas, que por otra parte en muchos casos deben someterse a estreses abióticos para una producción más efectiva. En consecuencia, actualmente la producción *in vitro* de compuestos bioactivos se considera una estrategia importante para las industrias farmacéuticas (Rajendra y D'souza, 2000; Srivastava y Srivastava 2007; Tasheva y Kosturkova, 2013). Aunque como se ha indicado los metabolitos secundarios, como compuestos fitoactivos, no se sintetizan en todas las especies vegetales, sí se pueden obtener a partir de una variedad de fuentes vegetales desde algas hasta angiospermas. Es evidente que la elección del material vegetal inicial es importante para establecer cultivos de

alto rendimiento del fitoquímico deseado (Dues y Zenk 1982). Además, se ha enfatizado la necesidad de seleccionar repetidamente líneas de alta producción (debido a la inestabilidad inherente de las líneas celulares), donde la composición nutricional del medio de cultivo es de gran importancia (Whitaker 1986).

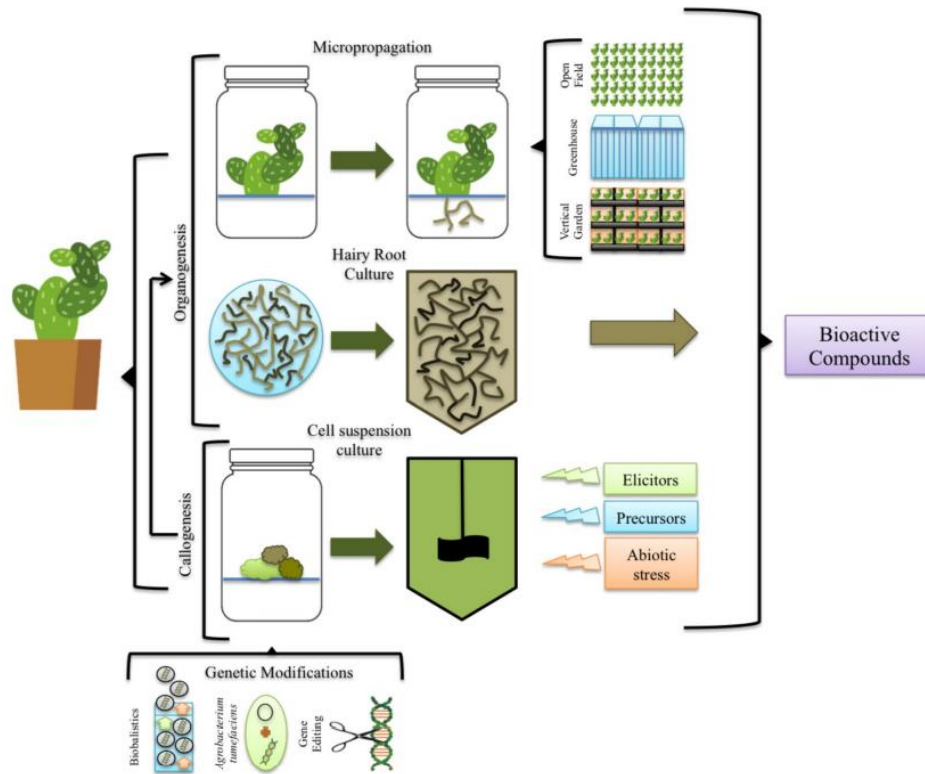


Figura 4.- Esquema de los métodos actuales empleados para una producción a gran escala de compuestos bioactivos usando cultivo *in vitro* de tejidos (De Espinosa-Leal y cols. 2018)

Existe una amplia variedad de factores que intervienen en la producción de compuestos bioactivos de plantas medicinales, aromáticas y ornamentales (Figura 5). La interacción de los sistemas de cultivo (líquidos y sólidos), material vegetal (diferenciado y no diferenciado), potenciadores, denominados elicitores como se verá más adelante, y precursores junto a otros parámetros del medio de cultivo *in vitro* (composición del medio de cultivo basal, reguladores del crecimiento o fitohormonas, fuentes de carbono, otros aditivos y pH) crea una condición multifactorial que afecta directamente a la citada producción de metabolitos.

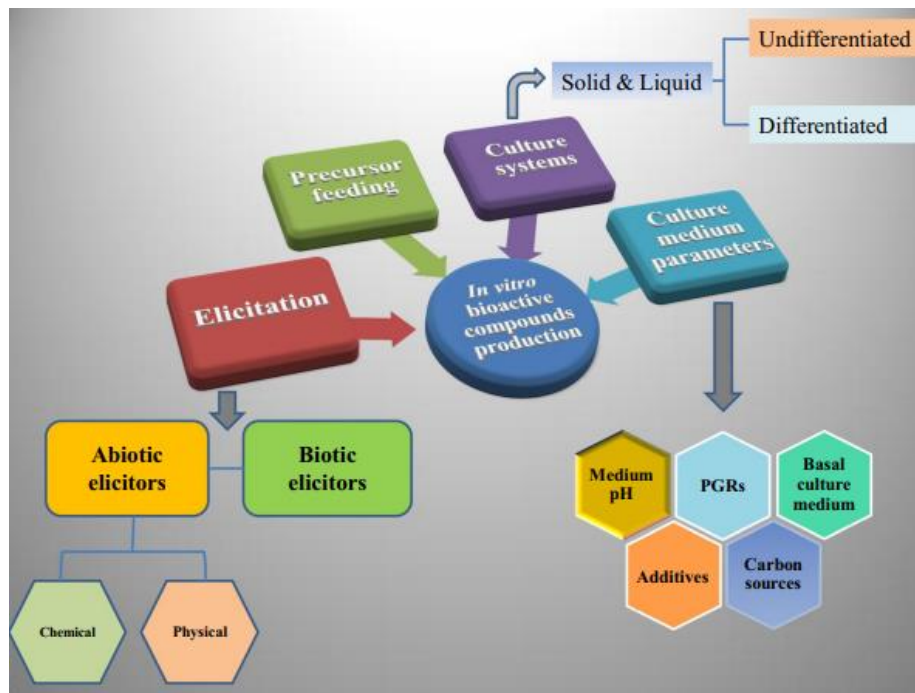


Figura 5.- Factores que afectan a la producción *in vitro* de compuestos bioactivos a partir de plantas medicinales, aromáticas y ornamentales. (Niazian y Sabbatini, 2021)

Desde el trabajo fundamental de Haberlandt (1902) sobre el cultivo *in vitro* de células vegetales aisladas, el cultivo de células y tejidos vegetales se ha convertido en una disciplina importante y bien establecida, con impacto tanto en la investigación básica como en las tecnologías aplicadas. De este conjunto de técnicas, tanto la organogénesis o producción directa de órganos como raíces y tallos, partiendo generalmente de meristemos (micropropagación) (Figura 4), como la callogénesis promoviendo una masa amorfa de células por exposición del material madre a diferentes tipos y dosis de reguladores de crecimiento (Figura 4) son procesos eficaces para obtener metabolitos secundarios.

1.3.1.1 Micropropagación

La micropropagación se define como la regeneración *in vitro* de una planta madre a partir de trozos de la misma, denominados explantos, bien mediante organogénesis a partir de brotes diferenciados o mediante embriogénesis somática (Siahsar y cols. 2011). A escala comercial, esta técnica se ha convertido en una industria multimillonaria ya que ofrece importantes ventajas sobre la propagación convencional de plantas de elevado interés agrícola, ornamental, vegetal y forestal (Debnath y cols. 2006; Read, 2007; Tasheva y Kosturkova, 2013). Estas ventajas se resumen en la producción masiva en un tiempo

comparativamente corto y durante todo el año de plantas genéticamente homogéneas (clones) y libres de enfermedades (Debnath y cols. 2006). La micropropagación ciertamente también tiene un potencial significativo en la producción masiva de plantas medicinales. Durante los últimos años se han desarrollado numerosos protocolos partiendo de una gran cantidad de especies con interés farmacológico (Rout y cols. 2000; Tripathi y Tripathi, 2003; Afolayan y Adebola, 2004; Debnath y cols. al., 2006; Chaturvedi y cols. 2007; Debnath y cols. 2007; Sarasan y cols. 2011; Wawrosch, 2010; Grof, 2018; Naim Feil y cols. 2021; Lubell–Brand y cols. 2021). Por otro lado, estas líneas genética y fenotípicamente homogéneas son un material de partida idóneo para la iniciación de una callogénesis satisfactoria.

1.3.1.2 Callogénesis

La callogénesis u obtención de una masa desorganizada de células de tipo parenquimático, (callo) se aplica a la inducción de embriones somáticos o para obtener material de partida para cultivos celulares. El callo producido se puede utilizar asimismo directamente para extraer o manipular algunos metabolitos primarios y secundarios (Singh 2004). La calidad de la planta madre es fundamental para la obtención de un callo competente, es decir que se pueda disgregar convenientemente (friable) y con una coloración blanco-amarillenta, por lo que generalmente se usan plantas micropropagadas por los argumentos expuestos en el apartado anterior. Para el establecimiento de un cultivo de células a partir de callos, se requiere un alto grado de friabilidad del callo en cuestión, lo que significa que sus células podrán separarse con facilidad en el cultivo en suspensión. Esta propiedad está muy relacionada con las características de la pared celular y por tanto puede modificarse con la adición al medio de cultivo de reguladores de crecimiento y vitaminas. Los reguladores de crecimiento auxínicos aumentan la actividad específica de las enzimas, que provocan la disolución de la lámina media de las paredes celulares de las plantas (Torrey y Reinert, 1961) de modo que altas concentraciones de auxinas y bajas de citoquininas favorecen esta condición.

Las células de callo con frecuencia no contienen cloroplastos, sino solo plástidos con granos de almidón en los que puede verse un sistema lamelar ligeramente desarrollado. Singh y cols. 2011 encontraron que el contenido de almidón en los callos disminuyó durante el proceso de diferenciación de raíces y brotes y aumentó solo después de la iniciación del

brote. De todos modos, se ha comprobado que muchos callos que se vuelven verdes en la exposición continua a la luz al inducir cloroplastos la mayoría de sus células. La formación de cloroplasto también se relaciona con la capacidad del callo para experimentar morfogénesis. A veces aparecen puntos verdes en algunos callos iniciadores de nuevos brotes (George y col. 2008). Es importante el estado de diferenciación del callo en procesos metabólicos y fitoquímicos (Singh y cols. 2011)

Es conocido que las heridas en las plantas estimulan con frecuencia la formación de callosidades. En el caso del cultivo *in vitro*, por la propia característica de la técnica, los explantos utilizados de partida están sujetos a heridas durante los diferentes subcultivos ya que se obtienen por separación mediante corte de la planta madre. Cuanto menor es el explanto, mayor es la proporción de superficie afectada. En muchos casos, el daño causa la liberación de sustancias inhibitoras pero también induce la producción natural de etileno, que a menudo proporciona un estímulo para la formación de tejido desorganizado o brotes y raíces adventicias (George y col. 2008). Los cambios fisiológicos en los tejidos, que provocan estas respuestas son conocidos como reacción de herida. La ventaja que se obtiene al herir puede ser tal que a los explantos se les dé, a veces, activación adicional, superior a la inducida por la escisión (Mariotti y Arcioni, 1983).

La capacidad de producir callos en las hojas se ve influenciada también por la localización en la misma. Raju y Mann (1970) describieron que la planta mexicana *Echeveria elegans* produce brotes solo en el haz de la hoja. En las orquídeas *Phalaenopsis* y *Vanda*, se formaron protocormos a partir de primordios desarrollados también en el haz de pequeños fragmentos de hojas u hojas enteras inmaduras (Tanaka y cols. 1975). En *Bryophyllum daigremontianum* el callo regenerativo solo surgió del envés de la hoja, mientras que otros tejidos foliares nunca produjeron brotes en las mismas condiciones de cultivo (Bigot, 1976). La superficie abaxial (envés) de las hojas de *Ipomoea batata* formó callo más embriogénico que la superficie adaxial (Liu y Cantliffe, 1984). La regeneración de brotes ocurre con mayor frecuencia en el lado en el que se encuentran los haces vasculares, lo que indica que pueden proporcionar estímulos de división celular. Welander (1988) sugirió que la superficie adaxial (haz) es la que más responde a los nutrientes, ya que es el último tejido de la hoja que deja de crecer y dividirse.

La callogénesis en estevia ha sido reportada por varios autores con notables diferencias en el tipo y concentración del regulador de crecimiento utilizado lo que indica la

influencia del genotipo y material de partida en este proceso. Radice (2004) plantea que en todas las fases del cultivo de callo el genotipo juega un papel importante para llegar a obtener éxito, por lo cual se debe siempre trabajar durante la investigación con de 2 a 3 genotipos a la vez. Por esta causa es difícil generalizar metodologías o protocolos de trabajo.

Kryvenki y cols. 2008 lograron la formación de callos de estevia tras 45 días de cultivo en la oscuridad en medio de cultivo MS complementado con 0.5 y 0.25 mg^l⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg^l⁻¹ de BA a partir de explantos foliares de plantas *in vitro*.

Otros autores (Swanson y cols. 1992; Tadhni y cols. 2007) describieron la formación del callo a partir de explantos de hojas de estevia cultivadas en medio MS suplementado con 0.5 mg^l⁻¹ NAA + 0.5 mg^l⁻¹ BA y 0.9% Agar.

Pratibha y cols. 2010, desarrollaron un protocolo para la inducción y multiplicación de callos a partir de explantos nodales, hoja y raíz en medio de Murashige y Skoog (MS) con diferentes concentraciones de hormonas vegetales: AIB, kinetina, ANA, 2,4-D en solitario o ANA en combinación con 2,4-D. Se observó un 100% de callogénesis a partir de las hojas cultivadas en combinación de ANA y 2,4-D a las tres semanas de cultivo. Los callos obtenidos a partir de los explantos de hojas y raíces eran de color verde brillante, mientras que los explantos nodales resultaron poco friables y de color marrón. La máxima cantidad de callos se produjo a partir de hojas, con 0.75 mg^l⁻¹ de ANA y 1 mg^l⁻¹ de 2,4 D.

Javad y cols. 2016 obtuvieron callos verdes friables cultivando explantos de estevia en medio MS suplementado con BA 1 mg^l⁻¹, ANA 1 mg^l⁻¹ y 2,4-D 2.5 mg^l⁻¹. Los autores sugirieron que es la combinación adecuada para iniciar el callo y multiplicarlo así como para la producción a escala comercial de esteviósidos.

Park y Kim (2003) opinaron que el 2,4-D solo en concentración de 1 mg^l⁻¹ era más apropiado para la callogénesis en estevia, mientras que Patel y Shah (2009) utilizaron BA y ANA para la callogénesis en esta especie.

Masri y cols. 2019 en su estudio para la inducción eficiente de callos de estevia obtuvieron la mejor respuesta con medio MS complementado con 1 mg^l⁻¹ de 2,4 D + 0.75 mg^l⁻¹ de ANA.

1.3.1.3 Cultivos celulares

En el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se puede utilizar como material de partida cualquier parte de la planta, incluida la célula aislada, mientras mantenga la totipotencia celular, es decir su capacidad de regenerar la planta completa de la que procede, que solamente se pierde cuando el grado de diferenciación celular es tan alto que la célula está entrando en fase de envejecimiento. El cultivo de células vegetales aisladas y desdiferenciadas en un medio de cultivo líquido se ha considerado durante mucho tiempo como una herramienta óptima para la producción biotecnológica de compuestos vegetales, como es el caso de los metabolitos secundarios (Rao y Ravishankar, 2002). Esta técnica de cultivo ofrece una serie de ventajas sobre el uso convencional de plantas como fuentes de fitoquímicos, la mayoría inherentes al propio cultivo *in vitro* como por ejemplo la independencia de las variaciones geográficas, estacionales y ambientales; producción fiable continua en calidad y rendimiento uniformes y ciclos de crecimiento comparativamente cortos (Rao y Ravishankar, 2002; Debnath y cols. 2006; Bonfill y cols. 2013).

Con el fin de obtener altos rendimientos aptos para la explotación comercial, los esfuerzos se han centrado en el aislamiento de actividades biosintéticas de células cultivadas, logradas optimizando las condiciones de cultivo, seleccionando cepas de alta producción y empleando medios nutritivos con precursores, métodos de transformación, técnicas de inmovilización y elicitación (Premjet y cols. 2002; Collin 1987; Shahzad y cols. 2013). Desde hace décadas se conoce que hay células cultivadas que producen, en cultivo, metabolitos no detectados en la planta. Así, por ejemplo se ha observado que los cultivos de *Lithospermum erythrorhizon* sintetizan ácido rosmarínico (Fukui y cols. 1984), o que las cantidades acumuladas en las células cultivadas se ven sensiblemente aumentadas respecto a las obtenidas en la planta diferenciada gracias a la optimización de las condiciones de cultivo, como por ejemplo, ginsenósidos de *Panax ginseng* (Ushiyama y cols. 1991), ácido rosmarínico de *Coleus blumei* (Ulbrich y cols. 1985), siconina de *Lithospermum erythrorhizon* (Takahashi y Fujita 1991), diosgenina de *Dioscorea* (Shahzad y cols. 2013). En consecuencia, la formación de compuestos de interés en cultivos de células vegetales puede mejorarse claramente mediante diferentes iniciativas. En este sentido, un enfoque importante es la modificación del medio nutritivo con el objetivo de aumentar la biomasa y, a menudo en un paso posterior, optimizar la producción de metabolitos (Weathers y cols. 2010; Bonfill y cols.

2013; Murthy y cols. 2014). Aquí, los factores clave incluyen la fuerza iónica del medio basal, el nivel de fosfato y nitrato, el nivel y tipo de azúcares, los reguladores del crecimiento y la adición de potenciadores, conocidos específicamente como elicitores (Rao y Ravishankar, 2002; Murthy y cols. 2014).

Además, varios factores físicos pueden influir en el desarrollo de los cultivos de células vegetales, como la densidad del inóculo, la temperatura, la calidad e intensidad de la luz, el pH del medio nutritivo y la agitación y aireación del sistema de cultivo (Kanokwaree y Doran, 1997; Chattopadhyay y cols. 2002; Murthy y cols. 2014).

Pero, a pesar de muchas décadas de investigación en este campo, en el año 2008 solo se producían comercialmente catorce sustancias o productos a partir de cultivos de células vegetales (Frense, 2007; Kolewe y cols. 2008), siendo el más destacado el paclitaxel de *Taxus* spp con actividad anticancerígena. En la última revisión realizada por Wawrosch y Zotchev en 2021 el número de compuestos así producidos se ha incrementado levemente, hasta los 26. Esto se debe a varias limitaciones, que con cierta frecuencia aparecen en los cultivos de células vegetales en comparación con las fuentes de producción microbiana, que incluyen tasas de crecimiento lentas y rendimientos bajos; de hecho, muchos metabolitos no se acumulan en cultivos de células vegetales debido a que las células desdiferenciadas suelen presentar una gran variabilidad en la biosíntesis de los metabolitos de interés. Además tienen tendencia a formar agregados celulares grandes y presentan sensibilidad al estrés producido por el medio líquido, siendo las dos últimas características obstáculos particularmente importantes en el cultivo a escala industrial (Yun y cols. 2012). En general, la productividad de una planta cultivada *in vitro* está relacionada con el grado de diferenciación, y esta es una de las razones por las que en muchos casos solo se pueden encontrar bajos rendimientos de los metabolitos secundarios deseados en cultivos celulares (Kolewe y cols. 2008; Sauerwein y cols. 1992).

Si bien todavía se sabe muy poco sobre la biosíntesis de los metabolitos secundarios de las plantas y su regulación, sigue siendo cuestionable si en un tiempo razonablemente corto los cultivos de células vegetales desempeñarán un papel significativo en la producción industrial de productos naturales, ya que como cultivos desdiferenciados, las suspensiones celulares permanecen heterogéneas a lo largo del tiempo, lo que da como resultado un crecimiento deficiente y un rendimiento bajo/inconsistente de metabolitos debido a cambios genéticos y epigenéticos nocivos. Por esa razón, también se han utilizado en la

biosíntesis de productos naturales los cultivos de brotes o raíces pilosas, como sistemas diferenciados de plantas *in vitro* (Marchev y cols, 2020).

1.4. Elicitores

Como se ha indicado anteriormente, la función principal de los metabolitos secundarios de las plantas es la protección contra patógenos e insectos, o contra otros estreses bióticos o abióticos (Ramakrishna y Ravishankar, 2011; Zhao y cols. 2005). Las moléculas y condiciones de estrés, que activan los mecanismos de defensa de las plantas, incluida la síntesis de metabolitos secundarios, se denominaron potenciadores, inductores o elicitores (Dörnenburg y Knorr, 1995) y más tarde Thakur y cols. 2019 definieron elicitor como una sustancia que, cuando se aplica en pequeñas cantidades a un sistema vivo, induce o mejora la biosíntesis de un compuesto específico que juega un papel importante en la adaptación de las plantas a condiciones estresantes. Como consecuencia, al mecanismo que procura esta activación se le denomina elicitación. Existe un amplio número de sustancias o situaciones que procuran esta activación desde reguladores de crecimiento, hormonas de estrés, quitosano, elicitores microbianos –tanto hongos como extractos bacterianos o de levaduras- metales pesados, nanopartículas, hasta situaciones de estrés hídrico o, salino (Niazian y Sabbatini, 2021). Los elicitores bióticos incluyen sustancias como pectina, quitosano, jasmonato de metilo o extracto de levadura, mientras que el ácido salicílico, los metales pesados o el tratamiento electromagnético son elicitores abióticos típicos (Shilpa y cols. 2010). Por consiguiente, la elicitación se ha utilizado con éxito para la mejora de la formación de productos secundarios en cultivos de células y órganos de muchas plantas (Namdeo, 2007; Shilpa y cols. 2010; Sharma y cols. 2011).

Según Singh y cols. 2020, los elicitores pueden inducir la producción de metabolitos secundarios a través de la activación del sistema de transducción intracelular, cascada de NADPH, producción de especies reactivas de oxígeno, expresión de genes relacionados con la defensa, proteínas de unión a GTP, altos contenidos de cAMP intracelular y Ca^{2+} u otros mensajeros secundarios con proteína quinasas activadas por factores que actúan en el ciclo celular estimulando la división celular (mitógenos).

Otros uso de los elicitores es su aplicación para mejorar la capacidad germinativa de las semilla. Mohamadian y cols. 2018 describen el uso del MeJA en tratamientos de imprimación de semillas de estevia con buenos resultados. Por su parte Gorzi y cols. 2020

indicaron que la imprimación con As, Fe y Zn a una adecuada dosis puede mejorar la baja germinación de las semillas de estevia y el contenido de clorofila, tanto en condiciones de contenido normal de agua, como bajo estrés hídrico.

La ingeniería metabólica se ocupa del estudio de las vías de transducción de señales promovidas por un determinado elicitor en la inducción de metabolitos secundarios (Figura 6), aspecto de gran importancia para la optimización de los sistemas de producción basados en cultivos de tejidos vegetales (Zhao y cols. 2005).

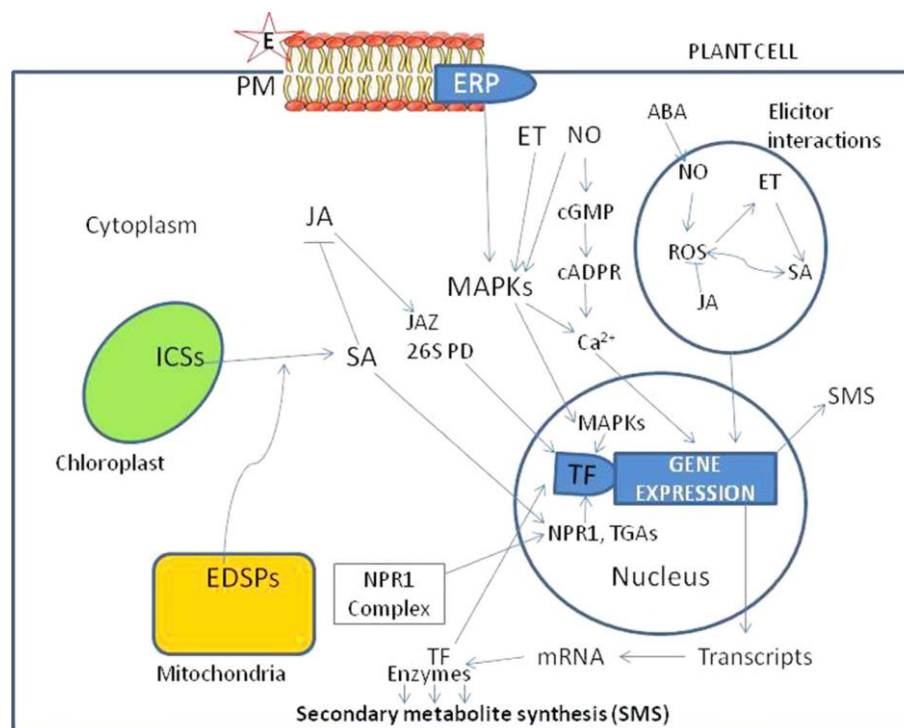


Figura 6.- Representación esquemática de los elicitores y posible mecanismo de elicitación utilizando cultivos de células, tejidos y órganos vegetales *in vitro*. (ABA abscisic acid, Ca_2^+ Calcium ion, cADPR cyclic adenosine diphosphoribose, cGMP cyclicguanosine monophosphate, E elicitor, EDSPs enhanced disease susceptibility proteins, ERP elicitor receptor perception, ET ethylene, ICSs isochorismate synthases, JA jasmonic acid, JAZ jasmonate zim domain, MAPKs mitogen activated protein kinases, NO nitric oxide, NPR1 non-expressor of pothogenesis-related genes 1, PM plasma membrane, ROS reactive oxygen species, SA salicylic acid, TF transcription factors, TGAs leucine zipper transcription factors, 26S PD 26S proteasomal degradation). (Giri y Zaheer, 2016).

1.5. Estevia (*Stevia rebaudiana*).

La estevia, *Stevia rebaudiana* Bert., es una planta perenne originaria de Paraguay, Megeji y cols. 2005; semiarbustiva, perteneciente a la familia Asteraceae (Figura 7). Crece en regiones subtropicales, semihúmedas con 1.400 a 1.800 mm de precipitaciones distribuidas

regularmente en el año, no soportando períodos prolongados de sequía. En regiones donde la precipitación mensual es inferior se necesita la utilización de un sistema de riego.



Figura 7.- Planta de estevia

En la naturaleza, crece a temperaturas promedio de 24 °C a 28 °C, 75-85 % de humedad relativa, aunque puede crecer aceptablemente bien entre los 18 a 34 °C y soporta temperaturas extremas de -6 °C a 43 °C. Necesita alta intensidad solar y días largos (16 horas de luz) para su crecimiento vegetativo óptimo. Para su cultivo son aptos los suelos tanto franco arenosos como franco arcillosos. Deben tener un buen drenaje, con pH óptimo entre 5.5 y 6.5. En grandes producciones se requiere la aplicación de fertilizantes, estimándose 1.62 g N/planta/año 0.19 g P y 1.4 g K por cada 1000 kg de hoja seca cosechada; estas necesidades de nutrientes varían a lo largo del ciclo fenológico. La capacidad para resistir inviernos crudos, aparentemente viene determinada por la temperatura del suelo. Plantas de 5 cm, con 10 hojas soportaron temperaturas de -5°C durante 70 minutos, lo que implica que las áreas potenciales de producción de la especie podrían extenderse a latitudes mayores. (http://procadisaplicativos.inta.gob.ar/cursosautoaprendizaje/stevia/l2_p2.html)

Recientemente, 2020, O'Neill K y Pirro completaron la secuenciación del genoma de estevia. Este avance posibilitará el descubrimiento de marcadores para el rendimiento de los

cultivos, la resistencia a las enfermedades y la sequía y determinará las vías bioquímicas de los metabolitos más relevantes.

Últimamente, la capacidad bioactiva de ciertos compuestos vegetales que pueden utilizarse como alimento rico en nutrientes beneficiosos para la salud humana ha despertado un gran interés en diferentes campos científicos, como la bioquímica, la medicina y la farmacia (Orona-Tamayo y cols. 2019). De estos, destaca el extracto obtenido de las hojas de estevia por su alta capacidad edulcorante y muy bajo contenido calórico. Dado que no se han descrito efectos secundarios por su consumo tales como toxicidad o mutagénesis (Lyakhovkin y cols. 1993; Thiyagarajan y Venkatachalam, 2012), la estevia se ha convertido en una fuente de edulcorante alternativo en el mercado. Esta capacidad edulcorante se puede atribuir a los glicósidos de esteviol, principalmente esteviósido y rebaudiósido A (Akbari y cols. 2018). Entre los compuestos de estevia, el rebaudiósido-A, es de particular interés por su perfil de sabor (Dubois, 2000). El esteviósido por lo general constituye la mayor parte del edulcorante (60 a 70% del contenido de glucósidos total) y se valora como 110 a 270 veces más dulce que el azúcar. Este glucósido también es responsable del sabor amargo (sabor regaliz o efecto persistente). Por su parte, el rebaudiósido-A está generalmente presente en un 30 a 40% del edulcorante total y tiene el sabor más dulce, 180 a 400 veces más dulce que el azúcar, sin sabor amargo. La relación rebaudiósido-A/esteviósido es la medida aceptada de calidad del dulzor, de forma que cuanto mayor sea esta relación mayor será la calidad del producto (Yadav y cols. 2011.). Hoy en día, los consumidores demandan cada vez más productos de fuentes naturales, de modo que la extracción de edulcorantes a partir de hojas de estevia ha generado un sector industrial y comercial en crecimiento a nivel mundial. Más de 750 toneladas de hojas de estevia se utilizaron en 2011 como extracto crudo para el consumo y extracción de glucósidos (Atteh y cols. 2011). Actualmente, más de cien mil hectáreas de superficie se dedican en el mundo al cultivo de estevia. Se utiliza cada vez más para endulzar diferentes alimentos, postres, bebidas, sobre todo en EE. UU., Europa, China y Japón. China destaca como el mayor productor de estevia (Jahangir y cols. 2020). En 2016, el 80% de la producción mundial de hojas de estevia procedía de China (alrededor de 50.000 -toneladas de hojas secas al año) (Sun 2016). Taweel y cols. 2021 indican que se estima que el mercado de estevia estima alcanzar los \$ 781.61 millones en el 2023. Coinciden en que China es el mayor productor y Estados Unidos el mayor consumidor.

Además de los ya citados y más conocidos compuestos edulcorantes bajos en calorías, otros autores han destacado otros beneficios, de tipo terapéutico, de compuestos presentes en la hoja de estevia con efecto antimicrobiano (por ejemplo, contra cepas de *Streptococcus*) (Mohammadi-Sichani y cols. 2012), antifúngico (contra *Candida albicans*, *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger*) (Mali y cols. 2015), hipotensores, antiinflamatorios, antitumorales, antidiarreicos, diuréticos e inmunomoduladores (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009; Pandey, 2018). Igualmente se han descrito Chatsudthipong y Muanprasat, (2009) y Thiyagarajan y Venkatachalam, (2012) propiedades insulino-trópicas y antihiper-glucémicas muy efectivas de los extractos de estevia, por ejemplo contra diabetes tipo II en modelos animales. Varios estudios han demostrado la relación entre la actividad antioxidante de los extractos de hojas de estevia y sus compuestos polifenólicos (Radić y cols. 2016). Por todo ello, se considera una especie idónea como fuente para la obtención de nuevos metabolitos secundarios de interés farmacológico.

1.5.1. Variedades de estevia

Para Al-Taweel y cols. (2021), cuando hablamos del incremento de la tolerancia a factores abióticos y bióticos, así como del incremento y calidad de las producciones, Criolla y Morita II son las variedades híbridas de estevia más estudiadas, la primera, nativa de Paraguay y la segunda reconocida por su alto contenido en rebaudiósido A. Otras variedades conocidas y cultivadas en Paraguay incluyen Eirete, un híbrido mejorado para cultivos duros, Morita III, también alta en rebaudiósido A y con bajos requerimientos hídricos. Estos autores mencionan también la variedad Katupyris seleccionada en Paraguay para el cultivo en suelos áridos y otras como Sugar High A3, Huny, Shur A3, Shou-2 con un alto contenido de glicósidos de esteviol y rebaudiósido A (Ever Stevia Co. Canadá).

1.5.1.1 Criolla

Aunque esta variedad puede reproducirse a partir de semillas y es muy adaptable a diferentes condiciones agroambientales, su rendimiento sólo es del 12% de glicósidos de esteviol. El promedio de rendimiento en cultivo comercial es de 1.200 a 1.500 kg por ha y año, usando 100000 plantas por Ha.

Las plantas de esta variedad son muy adaptables a diferentes condiciones agroambientales. Presenta floración heterogénea afectando esto negativamente la calidad

de las hojas producidas, debido a que no es posible realizar en el momento oportuno la cosecha de las mismas.

1.5.1.2 Morita III

Es una de las variedades obtenidas con altos contenidos de rebaudiósido A, (10 y 12%), crece mejor en zonas de clima tropical, es tolerante a septoria y a condiciones de baja humedad, tiene un sabor más noble y dulce que otras especies, aunque con mayores necesidades de manejo en el cultivo. En cultivo *in vitro*, esta variedad ha mostrado un buen desarrollo y alto coeficiente de multiplicación tanto en medio semisólido como líquido (estático y en Sistema de Inmersión Temporal-SIT) lo que sumado a su ya citado alto contenido de rebaudiósido A, resulta en una opción muy interesante.

1.6. Biorreactores

Pierik (1987) definió el cultivo en medio líquido como el desarrollo del explanto en un sustrato carente de agentes gelificantes como el agar. El cultivo *in vitro* de material vegetal en medio líquido tiene algunas ventajas sobre el sólido como facilitar el contacto total de la planta con el medio de cultivo permitiendo la absorción foliar de nutrientes y reguladores, en contraste con las desarrolladas sobre agar donde solamente la parte basal tiene capacidad de absorción. El crecimiento en medio líquido facilita la disolución de cualquier exudado de la planta en el medio lo que resulta mucho más difícil en presencia de agar. A todo ello se une el menor coste debido a la ausencia de gelificante que encarece el proceso. Sin embargo, el cultivo en medio líquido ofrece una serie de inconvenientes como la imposibilidad de airear el cultivo, por lo que la mayoría de las plantas necesitan un buen suplemento de oxígeno para su desarrollo. Esta limitación se puede superar cultivando el explanto en semi inmersión utilizando un agitador. Por otro lado, el medio líquido puede aumentar la aparición de la alteración fisiológica denominada vitrificación o hiperhidratación que se visibiliza por un aspecto vítreo de la planta. Para optimizar las ventajas del cultivo en medio líquido evitando en lo posible los aspectos negativos reseñados se vienen usando los biorreactores, que alcanzaron especial notoriedad a partir de los años 80 del pasado siglo.

El término “biorreactor” no cuenta con una definición precisa, aunque el concepto es el de un sistema o recipiente que tiene la capacidad de mantener un ambiente biológicamente activo. Dentro de este concepto se engloban diferentes equipos como los fermentadores clásicos, sistemas de perfusión para cultivos celulares o los propios biorreactores enzimáticos por ejemplo. Los biorreactores normalmente están conectados a unidades que controlan la temperatura, el pH, la aireación, la agitación y otras variables. Sin embargo, en algunos casos, los recipientes de cultivo *in vitro* como matraces Erlenmeyer, placas de Petri o cajas de cultivo también se han denominado “biorreactores” a condición de que se innoven con mejoras que permitan controlar adecuadamente el sistema para conseguir los objetivos perseguidos.

Los biorreactores se han desarrollado originariamente para cultivar microorganismos y posteriormente, para cultivar suspensiones de células vegetales y acumular biomasa celular capaz, entre otros objetivos, de producir metabolitos secundarios. En 1983, Harris y Mason describieron máquinas basculantes diseñadas para lograr una inmersión temporal, con el fin de combinar aireación y cultivo en medio líquido. Desde este trabajo, se ha desarrollado una amplia gama de sistemas semiautomáticos que utilizan el principio de inmersión temporal. Todos estos sistemas respetan las condiciones necesarias para un buen desarrollo de plantas en medio líquido: evitar la inmersión continua, que afecta negativamente el crecimiento y la morfogénesis, proporcionar una transferencia de oxígeno adecuada, permitir cambios secuenciales de medio y automatización, reducir el riesgo de contaminación y ser lo más barato posible. Los sistemas propuestos difieren en el tamaño del recipiente, el tipo de soporte de cultivo, la existencia de un control de inmersión computarizado o un simple temporizador, mediante el uso de una bomba peristáltica, o una bomba de aire, o el movimiento mecánico del recipiente para desplazar el líquido, mediante reciclado o no del medio, y finalmente mediante separación o incorporación del tanque de sustrato en el propio recipiente de cultivo. Estos sistemas son fáciles de usar y en la mayoría de ellos es posible realizar subcultivos más prolongados. La originalidad de los sistemas de cultivo por inmersión temporal es permitir un contacto parcial o total de duración programable entre el explanto y el medio líquido.

Para el cultivo de estevia se han empleado varios de estos biorreactores usando el sistema de inmersión temporal. Alvarenga y Salazar (2015) han utilizado tanto el sistema de inmersión temporal RITA® (Recipient for Automated Temporary Immersion) patentado en

1995 y desarrollado principalmente para embriogénesis somática, como el de vasos gemelos (BIT®) para la producción masiva de estevia obteniendo en ambos casos plantas verdes y vigorosas con bajos niveles de hiperhidricidad. Ramírez-Mosqueda y cols. (2016), han optimizado el proceso de micropropagación de estevia usando también biorreactores RITA® a partir de explantos nodales en medio MS con BA alcanzando un buen número de brotes laterales y un 100% de emisión radicular. Más recientemente Vives y cols. (2017), también utilizando biorreactores BIT® multiplicaron por siete el número de brotes y peso fresco de plantas de estevia micropropagadas en comparación con medios sólidos y semisólidos. Welander y cols. (2014), han desarrollado un biorreactor (Plantform) también para la producción de plantas *in vitro* a gran escala. Plantform está diseñado para facilitar su manejo: tiene poco peso, es transparente, apilable, esterilizable en autoclave y posee un eficiente sistema de bombas para el intercambio de gases, incluyendo oxígeno y CO₂. Este biorreactor se ha usado con éxito en la propagación de mirto y olivo (Benelli y De Carlo, 2018) así como de palmera (*Phoenix dactylifera*) (Abahmane, 2020). En el caso de estevia se han comparado los sistemas de medio gelificado con el sistema de inmersión temporal en biorreactores RITA® y Plantform en micropropagación (Sacco y cols. 2015). Ambos sistemas de inmersión temporal superaron en calidad de la planta obtenida al medio gelificado, pero el sistema Plantform fue mejor que RITA® cuando el ciclo de inmersión de los explantos fue de 8 horas.

1.7. Objetivos generales

En la presente tesis se pretende optimizar el proceso de cultivo en suspensión *in vitro* para la obtención y producción de metabolitos secundarios a partir de material vegetal de estevia y caracterizar estos compuestos orgánicos como posibles candidatos para su aplicación en farmacología.

Para alcanzar estos objetivos se optimizará, tanto el medio de cultivo como el sistema de cultivo -sólido o en biorreactor- en la micropropagación de plantas de estevia para la obtención de material vegetal idóneo. Con este material se obtendrán plantas callos y células que, cultivados con elicitores en el sustrato líquido, liberen compuestos fenólicos al medio. Una vez identificados, caracterizados y cuantificados estos compuestos, se estudiará su posible interés farmacológico.

1.8. Bibliografía

Afolayan A.J., Adebola P.O. 2004. In vitro propagation: a biotechnological tool capable of solving the problem of medicinal plants decimation in South Africa. *Afr. J. Biotechnol.* 3, 683-687.

Akbari F., Arminian A., Kahrizi D., Fazeli A. and Ghaheri, M. 2018. Effect of nitrogen sources on gene expression of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) under in vitro conditions. *Cell. Mol. Biol.* 64, 11–16.

Al-Taweel S. K., Azzam C.R., Khaled, K.AM, Abdell-Aziz, R.M. 2021. Improvement of stevia (*Stevia rebaudiana* bertoni) and steviol glycoside through traditional breeding and biotechnological approaches. *SABRAO Journal of breeding and genetics*, 53(1) 88 – 111.

Atteh J., Onagbesan O., Tona K., Buyse J., Decuypere E. and Geuns J. 2011. Potential use of *Stevia rebaudiana* in animal feeds. *Arch Zootec*; 60: 133-136.

Beyoğlu D. and Idle J.R. 2013. Metabolomics and its potential in drug development. *Biochem. Pharmacol.* 85: 12–20

Bigot C. 1976. Bourgeonnement in vitro à partir d'épiderme séparé de feuille de *Bryophyllum daigremontianum* (Crassulacées). *Can. J. Bot.* 54, 852-867.

Bonfill M., Malik S., Mirjalili M.H., Goleniowski M., Cusido R. and Palazón J. 2013. Production and genetic engineering of terpenoids production in plant cell and organ cultures. In: Ramawat, K.G., MJM (Eds.), *Natural Products*. Springer, Berlin, pp. 2761–2796.

Collin H. A. 1987. Determinants of yield of secondary products in plant tissue cultures. *Advances in Botanical Research*, 13 , 146–183.

Critchfield J. W., Butera S. T. and Folks T. M. 1996. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 12 , 39–46

Chattopadhyay, S., Sunita F., Ashok K.S. and Virendra S.B. 2002. Bioprocess Considerations for Production of Secondary Metabolites by Plant Cell Suspension Cultures. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7: 138-149.

Chaturvedi H.C., Jain M and Kidwai N.R. 2007. Cloning of medicinal plants through tissue culture — a review. *Indian J. Exp. Biol.* 45, 937–948.

Debnath M., Malik C. P. and Bisen, P. S. 2006. Micropropagation: A tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7 , 33–49.

Dixon R. A. and Ferreira D. 2002. Molecules of interest. *Genistein Phytochemistry*, 60 , 205.

Dixon R. A., Dey P. M. and Lamb, C. J. 1983. Phytoalexins: Enzymology and molecular biology. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 55 , 1–69.

Dörnenburg H. and Knorr D. 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzym. Microb. Technol.* 17, 674–684.

Dues B. and Zenk M. H. 1982. Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. *Biotechnology and Bioengineering*, 24 , 1965–1974.

Espinosa-Leal C. A., Puente-Garza C.A. and García-Lara, S. 2018. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta* 248:1–18
<https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>

Fessenden R. J. and Fessenden J. S. 1982. *Organic chemistry*, 2nd ed. Willard Grant Press, Boston, Mass.

Frense D., 2007. Taxanes: perspectives for biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 1233–1240.

George E.F., Hall M.A., Klerk G.J.D. 2008. Plant Tissue Culture Procedure - Background In: George E.F., Hall M.A., Klerk G.J.D. (eds) *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Dordrecht.

George E.F., Hall M.A., Klerk G.J.D. 2008. Adventitious Regeneration. In: George E.F., Hall M.A., Klerk G.J.D. (eds) *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Dordrecht.

Giri Ch. Ch. and Zaheer M. 2016. Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 126:1–18.

Gorzi A., Heshmat O., Abdolamir B. 2020. Effect of stevia (*Stevia rebaudiana*) seed priming treatments with salicylic acid, iron and zinc on some germination traits and photosynthetic pigments under drought. *Iranian J. Seed Res.* 6(2): 125-135.

Grof C.P.L. 2018. Cannabis, from plant to pill. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84(11), 2463–2467. <https://doi.org/10.1111/bcp.13618>.

Hostettaman K. and Walfender J. 1997. The search for biologically active secondary metabolites. *Pesticide Science*, 51 , 471–482.

Jahangir Chughtai, M. F., Pasha, I., Zahoor, T., Khaliq, A., Ahsan, S., Wu, Z., Nadeem, M., Mehmood, T., Amir, R. M., Yasmin, I., Liaqat, A., & Tanweer, S. 2020. Nutritional and therapeutic perspectives of *Stevia rebaudiana* as emerging sweetener; a way forward for sweetener industry. *CYTA - Journal of Food*, 18(1), 164–177.
<https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1721562>

- Javad S., Naz S., Ilyas S. and Aftab, A. 2016. Production of stevioside from callus and cell suspension cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *Journal of Animal and Plant Sciences*, 26(5), 1374–1382.
- Jena N.R. 2012. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J. Biosci*, 37:503-517.
- Kanokwaree K. and Doran P.M. 1997. Effect of inoculum size on growth of *Atropa belladonna* hairy roots in shake flasks. *J. Ferment. Bioeng.* 84, 378–381.
- Kaul T.N., Middletown E.J., Ogra P.L. 1985. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J. Med. Virol.* 15:71–79.
- Kolewe M.E., Gaurav V. and Roberts S.C. 2008. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Mol. Pharm.* 5, 243–256.
- Kryvenki M., Kosky R. G., Guerrero D., Domínguez M., y Reyes M. 2008. Obtención de callos con estructuras embriogénicas de *Stevia rebaudiana* Bert. en medios de cultivo semisólidos. *Biotechnología Vegetal*, 8(2), 91–98.
- Kuhnau J. 1976. The flavonoids. A class of semi- essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24:117–191.
- Liu J.R. and Cantliffe D.J. 1984 Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.). *Plant Cell Rep.* 3, 112-115.
- Lubell-Brand, J. D., Kurtz, L. E., & Brand, M. H. (2021). An in vitro–ex vitro micropropagation system for hemp. *HortTechnology*, 31(2), 199–207. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH04779-20>
- Marchev A. S., Yordanova Z.P. and Milen I. Georgiev M.J. 2020. Green (cell) factories for advanced production of plant secondary metabolites, *Critical Reviews in Biotechnology*, 40:4, 443-458, DOI: 10.1080/07388551.2020.1731414
- Marchionatti A.M., Páez A.B., Collin A., Tolosa de Talamoni N. 2018. Efectos de Naringina sobre la proliferación, migración e invasión de células de cáncer de colon. *Revista de ña Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba.Suplemente JIC XIX*
DOI:<https://doi.org/10.31053/1853.0605.v0.n0>
- Mariotti D. and Arcioni S. 1983 *Coronilla varia* L. (Crown vetch): plant regeneration through somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2, 103-110.
- Masri M.I., Amein M.M.M., Abdel- Aziz R.M., Saye D.O. 2019. Callogenesis and plant regeneration via in vitro culture of *Stevia rebaudiana* explants, *Egyptian J. Plant Breed.* 23(1):65– 76.

Mohamadian E., Kianmehr H., Somagh H.A., Mahjor N.A.N., Safari F. and Safarzaden A. 2018. Effect of Methyl Jasmonate Pre-Treatment on germination indices and biochemical traits of stevia seedling (*Stevia rebaudiana*) under salt stress. *Iranian J. Seed. Res.* 5(1): 101- 117.

Molina Calle, M (2017). Análisis orientado y global en metabolómica vegetal mediante espectrometría de masas acoplada a técnicas cromatográficas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba.

Murthy H.N., Lee E.J., Paek K.Y. 2014. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 118, 1–16.

Naim-Feil E., Pembleton L.W., Spooner L.E., Malthouse A.L., Miner A., Quinn M., Polotnianska R.M., Baillie R.C., Spangenberg G.C. and Cogan, N. O. I. 2021. The characterization of key physiological traits of medicinal cannabis (*Cannabis sativa* L.) as a tool for precision breeding. *BMC Plant Biology*, 21(1), 294. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03079-2>

Namdeo A.G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Phcog. Rev.* 1, 69–79.

Naseem U., Farhat A. Khan. 2016. An introduction to natural products and phytochemicals with special reference to its antimicrobial activity. *Life Sci J* 13(10):103-119].

Nastel P. 2004. Isoflavones: Effect on cardiovascular risk and functions. In *Proceedings of the international congress series 1262* , p. 317.

Niazian M. and Sabbatini P. 2021. Traditional in vitro strategies for sustainable production of bioactive compounds and manipulation of metabolomic profile in medicinal, aromatic and ornamental plants. *Planta* 254:111. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03771-5>

O'Neill K. and Pirro S. 2020. The complete genome sequence of *Stevia rebaudiana*, the Sweetleaf [version 1; peer review: 2 approved, 1 approved with reservations] *F1000Research*, 9:751 <https://doi.org/10.12688/f1000research.24396.1>

Park, K.H. and K.M. Kim. 2003. Factors affecting plant regeneration in the cultures of different explants of *Stevia*. *Korean J. of Plant Biotech.* 30(2): 151-154.

Patel R.M. and R.R. Shah. 2009. Regeneration of *Stevia* plant through callus cultures. *Ind. J. of Pharm. Sci.* 71: 46-50.

Pratibha G., Satyawati S. and Sanjay, S. 2010. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* (natural sweetener) using kinetin for Steviol glycoside production. *Research Journal of Biotechnology*, 5(1), 63–67.

Premjet D., Itoh K. and Tachibana S. 2002. Enhancement of podophyllotoxin production by biogenetic precursors and elicitors in cell suspension cultures of *Juniperus chinensis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5 , 1267–1271.

- Radic S., Vujcic V., Glogoski M. and Radic-Stojcovic M. 2016. Influence of pH and plant growth regulators on secondary metabolite production and antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* (Bert). *Periodicum Biologorum* 118: 9–19.
- Radice S. 2004. Morfogénesis in vitro. En: V. Echenique, C Rubinstein y L Mroginski (Eds). *Biología y mejoramiento vegetal*. Ediciones INTA. Buenos Aires.
- Rajendra K. and D'Souza L. 2000. Secondary metabolite of ayurvedic plants in vitro . In P. C. Trivedi (Ed.), *Plant biotechnology recent advances* (pp. 350–358). New Delhi: Panima Publishing Corporation.
- Raju M.V.S. and Mann H.E. 1970. Regenerative studies on the detached leaves of *Echeveria elegans*. *Anatomy and regeneration of leaves in sterile culture*. *Can. J. Bot.* 48, 1887-1891.
- Ramakrishna A. and Ravishankar G.A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal. Behav.* 6, 1720–1731.
- Rao S.R. and Ravishankar G.A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 20, 101–153.
- Read P.E. 2007. Micropropagation: past, present and future. *Acta Hort.* 17–27.
- Sarasan V., Kite G.C., Sileshi G.W. and Stevenson, P.C. 2011. Applications of phytochemical and in vitro techniques for reducing over-harvesting of medicinal and pesticidal plants and generating income for the rural poor. *Plant Cell Rep.* 30, 1163–1172.
- Sharma M., Sharma A., Kumar A., Basu S.K. 2011. Enhancement of secondary metabolites in cultured plant cells through stress stimulus. *Am. J. Plant Physiol.* 6, 50–71.
- Sauerwein M., Yoshimatsu K. and Shimomura K. 1992. Further approaches in the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. *Plant Tissue Cult. Lett.* 9, 1–9.
- Shilpa K., Varun K. and Lakshmi B.S. 2010. An alternate method of natural drug production: eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *J. Plant Sci.* 5, 222–247.
- Siahsar B., Rahimi M., Tavassoli A. and Raissi A. 2011. Application of biotechnology in production of medicinal plants. *Am. Eur. J. Agric. Environ. Sci.* 11, 439–444.
- Singh N., Yadav K. and Kumari, S. 2011. Metabolic Changes During Differentiation in Callus Cultures of *Stevia Rebaudiana* (Bertoni). *Journal of Phytology*, 3(3), 63–67.
- Singh B. D. 2004. *Biotechnology* (1st ed., p. 338). New Delhi: Kalyani Publishers.
- Singh T, Sharma U, Agrawal V. 2020. Isolation and optimization of plumbagin production in root callus of *Plumbago zeylanica* L. augmented with chitosan and yeast extract. *Ind Crops Prod* 151:112446. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112446>

Srivastava N. K. and Srivastava A. K. 2007. Influence of gibberellic acid on CO₂ metabolism, growth, and production of alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Photosynthetica*, 45 (1), 156–160.

Swanson S.M. , Mahady G.B. and Beecher C.W.W. 1992. “Stevioside biosynthesis by callus, root, shoot and rooted-shoot cultures in vitro”. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* Vol. 28, pp. 151–157.

Tadhni M.B., V.H. Patel V.H., Subhash R. 2007. “In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus”. *Journal of food composition and Analysis* 20: 323-329.

Tanaka M., Hasegawa A. and Goi M. 1975. Studies on the clonal propagation of monopodial orchids by tissue culture: 1. Formation of protocorm-like bodies (PLB) from leaf tissue in above sp. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 44, 47-58.

Takahashi S. and Fujita Y. 1991. In: A. Komamine, M. Misawa, F. DiCosmo (Eds.), *Plant cell culture in Japan* (pp. 92–98/pp. 72–78). Tokyo: CMC Co. Ltd.

Tasheva K. and Kosturkova G. 2013. Role of biotechnology for protection of endangered medicinal plants. In: Petre, M. (Ed.), *Environmental Biotechnology — New Approaches and Prospective Applications*. InTech.

Thakur M., Bhattacharya S., Khosla P.K. and Puri S. 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *J Appl Res Med Aromat Plants* 12:1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.11.004>.

Tripathi L. and Tripathi J.N. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. *Trop. J. Pharm. Res.* 2, 243–253.

Yun, U.W., Yan, Z., Amir, R., Hong, S., Jin, Y.W., Lee, E.K., et al., 2012. Plant natural products: history, limitations and the potential of cambialmeristematic cells. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 28, 47–59.

Torrey J.G. & Reinert J. 1961 Suspension cultures of higher plant cells in synthetic media. *Plant Physiol.* 36, 483-491.

Ulbrich B., Weisner W. and Arens H. 1985. Large-scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumei* Benth. In K. H. Neumann & E. Reinhard (Eds.), *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures* (pp. 293–303). Berlin: Springer.

Ushiyama A., Takahashi M. and Fujita K. 1991. Rokem et al. 1984; Matsumoto et al. 1980; Ushiyama, K. In: A. Komamine, M. Misawa, & F. DiCosmo (Eds.), *Plant cell culture in Japan* (pp. 92–98). Tokyo: CMC Co. Ltd.

Vaquero-Raya E.C. y Molero-Richard X. 2005. Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿una posible diana terapéutica?. *Gastroenterol. Hepatol.* 2005;28(8):473-84. DOI:[10.1157/13078997](https://doi.org/10.1157/13078997)

Wawrosch C. y Zotchev S.B. 2021. Production of bioactive plant secondary metabolites through in vitro technologies—status and outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2021) 105:6649–6668. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11539-w>

Wawrosch, C., 2010. In vitro propagation of medicinal plants for conservation and quality assurance. *Medicinal Plant Biotechnology*, pp. 93–97.

Whitaker R. J. 1986. Production of secondary metabolites in plant cell cultures. *American Chemical Society Symposium Series*, 317 , 347–362. *Chemical Society Symposium Series*, 317 , 347–362.

Yadav A.K. Singh, S. Dhyani, D. Ahuja P.S. 2011. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Can. J. Plant Sci.* 91, 1–27. <https://doi.org/10.4141/cjps10086>

Zhao J., Lawrence T., Davis C. and Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23 , 283–333.

Capítulo 2

Optimización de la micropropagación y calogénesis en *Stevia rebaudiana*. Uso de biorreactores

2. Capítulo 2. Optimización de la micropropagación y callogénesis en *Stevia rebaudiana*. Uso de biorreactores.

2.1. Introducción

2.1.1. Micropropagación

Como es sabido, la reproducción sexual de estevia se caracteriza por una alta heterogeneidad genética de las poblaciones resultantes de sus semillas a causa de la alogamia de esta especie (Esra y cols. 2015). Además, la eficiencia de germinación es baja debido a un alto porcentaje de semillas estériles (Das y cols. 2011) y la recolección de semillas es muy difícil debido a su baja madurez a causa de la falta de uniformidad de floración. Por todas estas razones, se han preferido los métodos de propagación asexual para obtener plantaciones homogéneas de plantas élite de estevia, como el esquejado. Sin embargo, la propagación vegetativa clásica de los genotipos de élite es lenta y costosa y presenta un mayor riesgo de propagación de virus. Este riesgo puede ser minimizado usando un reducido número inicial de plantas madre (Rasouli y cols. 2021). En consecuencia, la micropropagación es un sistema muy recomendable para alcanzar un elevado número de plantas de estevia homogéneas genéticamente, uniformes vegetativamente y sanas (Bondarev y cols. 2002; Casaccia y Álvarez, 2006; Ibrahim y cols. 2008b).

Uno de los factores fundamentales para el éxito de la micropropagación es la composición del medio de cultivo. El equilibrio iónico del medio depende en gran medida de los iones de amonio y nitrato, ya que son los componentes principales de cualquier sustrato para el cultivo *in vitro* de plantas (George y cols. 2008; Ivanova y Van Staden, 2009). El medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) se viene utilizando ampliamente para alcanzar los objetivos indicados ya que se considera muy adecuado debido a su composición equilibrada de macro y micronutrientes y también porque puede usarse con éxito en diferentes diluciones. No obstante, se considera moderadamente salino (Pierik, 1987). En el caso de la estevia, se ha aplicado de forma rutinaria el medio basal MS con diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento para la micropropagación a partir de yemas

(Sivaram y Mukundan, 2003; Hossain y cols. 2008; Ibrahim y cols. 2008a; Khalil y cols. 2014; Ahmad y cols. 2021). Sin embargo, este medio presenta alto contenido de nitrógeno total con una relación de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ de 1.9, altos niveles de Cl y Mo y concentraciones relativamente bajas de Ca, P, Mg y Cu en comparación con las concentraciones promedio de estos elementos en los brotes de las plantas, aunque, según Epstein (1972), se consideran suficientes para un crecimiento adecuado. De acuerdo con Magangana y cols. (2018) las plantas cultivadas en un medio con bajo contenido de sal potencian claramente la capacidad de absorción de iones frente a las cultivadas en un medio normal o con un alto contenido de sal.

En consecuencia, este sustrato puede no ser óptimo para ciertas especies (George y cols. 2008; Rathore y cols. 2013) y puede mejorarse como se muestra para el caqui (Sugiura y cols. 1986) o la vid (Villegas y cols. 1992). Según Chée y Pool (1987), el IK es un componente no esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas de vid y, en consecuencia, puede eliminarse de los medios de cultivo. Los autores mencionados han publicado que concentraciones más bajas de Mn, específicamente 0.85 mg l^{-1} ($5 \mu\text{M}$), han mejorado el desarrollo de la vid *in vitro*, y la sustitución del nitrato de calcio por cloruro de calcio asimismo han optimizado la calidad de los sarmientos de vid producidos con esta técnica.

Las concentraciones óptimas de macro y micronutrientes presentes en los medios de cultivo inciden directamente en la buena respuesta morfogénica de las plantas y, en consecuencia, en el contenido adecuado de clorofila. La determinación de la concentración de pigmentos fotosintéticos proporciona una información adicional para la interpretación del análisis foliar. Por ejemplo, el cobre está directamente involucrado en la cadena de transporte de electrones como constituyente de la plastocianina, transportador de electrones entre los dos fotosistemas. Jain y cols. (2014) concluyeron que las células de plantas de estevia cultivadas en medio de cultivo rico en cobre ($0.5 \mu\text{M}$) mostraban mayor actividad fotosintética y cambios morfológicos en los cloroplastos y en la ultraestructura de los tilacoides. Sus resultados confirman la importancia nutricional del cobre si se añade en óptimas concentraciones en el medio de cultivo por su efecto en la función y estructura del fotosistema II.

Otros elementos, como el magnesio, se asocia con diversas funciones fisiológicas y bioquímicas tales como la regulación de la estabilidad de los nucleótidos y enzimas (Waters,

2011). Además, es el componente fundamental de la clorofila y, por consiguiente, es esencial para su síntesis (Kobayashi y cols. 2013).

Es de interés destacar la influencia del contenido de carbohidratos en la síntesis y funcionamiento de los pigmentos fotosintéticos. Por ejemplo, se ha descrito que la alta concentración de sacarosa en los medios restringe la eficacia fotosintética de las plantas cultivadas causando una reducción de los niveles de clorofila y de las ceras epicuticulares (Hazarika, 2006).

Los lípidos de la membrana celular son las principales biomoléculas diana de las especies reactivas de oxígeno (ROS), en especial los ácidos grasos poliinsaturados, quienes representan entre el 50 y el 90 % de los lípidos de la membrana. La peroxidación de lípidos como el malondialdehído afecta la integridad de la estructura de la membrana y altera sus funciones, llevando a la lisis celular. Cuando los ácidos grasos poliinsaturados se oxidan, se forman estos aldehídos reactivos que causan los daños citados. El malondialdehído (MDA) es una molécula altamente reactiva y tóxica que al reaccionar con los ácidos nucleicos y proteínas causa modificaciones que alteran las funciones biológicas. En consecuencia, el nivel de MDA es considerado un indicador útil de los niveles de peroxidación lipídica (Wong y cols. 1987). El aumento en el contenido de esta molécula es indicativo de un incremento del daño oxidativo (Sofa y cols. 2007; Hossain y cols. 2009). Un método práctico de medición de MDA, es el denominado ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) por el cual el MDA reacciona el mencionado ácido dando lugar a un derivado que puede ser medido espectrofotométricamente (Leonard y cols. 2010). Esta técnica rápida ha sido muy utilizada en estudios de peroxidación lipídica (Hu y cols. 2012; Kumar y cols. 2015; Souza y cols. 2019).

2.1.2. Callogénesis

El callo puede definirse como una masa irregular de tejido parenquimatoso no organizado con posible capacidad de organogénesis en determinadas condiciones de cultivo. De acuerdo con Bhojwani y Dantu (2013) un callo bien formado puede contener diferentes tipos de células. Existen distintos tipos de callo dependiendo principalmente del origen del explanto, composición del sustrato y condiciones de cultivo (luz/oscuridad y temperatura de la cámara de cultivo). La facilidad de disgregación (friabilidad), el color y el grado de humedad son características importantes en los callos.

El uso de reguladores para la inducción del callo ha sido muy estudiado, tanto la variedad de los mismos, solos o combinados, como sus concentraciones. En la mayoría de los casos se encuentran en la bibliografía diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas, siendo dichas combinaciones muy dependientes de la especie vegetal. En la revisión sobre este tema publicada por Handro y Ferreira en 1989 se incluye una relación de diferentes combinaciones de ambos grupos de reguladores para la obtención de callo en estevia. Más recientemente Bondarev y cols. (1998) indican que cuando usan explantos de hojas o tallo de estevia la callogénesis, siempre con medio MS, es prácticamente nula en ausencia de fitorreguladores. Según estos autores en todos los tratamientos las hojas tuvieron una mejor respuesta que los tallos para la callogénesis, siendo la combinación entre ANA y BA la mejor para la inducción de callo. Entre otras combinaciones entre auxinas/citoquininas, la de ANA con kinetina resultó más efectiva que el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) con BA y la combinación menos efectiva fue 2,4-D y kinetina. Sairkar y cols. (2009) sembraron hojas jóvenes de estevia en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D, kinetina y BA para inducción de callo. Javad y cols. 2016 determinaron que en medio MS modificado, la combinación de BA, ANA y 2,4-D produjo callos verdes de estevia capaces de producir esteviósido. Estos cultivos de callo verde también pueden dar lugar a suspensiones celulares.

Razavi y cols. 2019, determinaron que en el aceite obtenido del tejido de los callos de estevia inducidos a partir de segmentos foliares, predominaban compuestos como diterpenos, triterpenos, fitol y escualeno. Los autores consideraron que algunos reguladores pueden tender a cambiar las vías metabólicas. En su caso utilizaron combinaciones de ANA, KIN, BA y AIB.

Un amplio número de autores han inducido callogénesis en estevia usando medio de Murashige y Skoog (MS) a partir de explantos procedentes generalmente de hojas de plantas previamente cultivadas *in vitro* (Sharma y cols. 2015; Dwivedi y cols. 2016; Javad y cols. 2016; Imtiaz y cols. 2020), trozos de tallo también procedentes de plantas *in vitro* (Kumani y Chandra, 2015; Yücesan y cols. 2016) o, más raramente, de flores (Ahmad y cols. 2011). En prácticamente todos los casos los callos obtenidos sirvieron como estructura adecuada e incluso necesaria para procesos biotecnológicos como obtención de cultivo celulares (Mustafa y cols. 2011; Mathur y Shekhawat, 2013; Dwivedi y cols; 2016); inducción de embriogénesis somática (Kryvenki y cols. 2008; Keshvari y cols. 2018) producción de

glucósidos (Aman y cols. 2013; Mathur y Shekhawat, 2013; Sharma y cols. 2015) y otros metabolitos secundarios (Radic y cols. 2016; Gupta y cols. 2016; Javed y cols. 2017; Lucho y cols. 2019).

2.2. Objetivos

Dado que el propósito del estudio recogido en este capítulo es optimizar la producción material vegetal de estevia como base para la obtención de metabolitos secundarios, el primer objetivo es responder a las siguientes preguntas: ¿Se pueden optimizar las condiciones nutricionales descritas en la literatura actual para potenciar el desarrollo de la parte aérea de estevia y su coeficiente de multiplicación por micropropagación usando SIT y variaciones en la composición del sustrato? ¿Las nuevas condiciones ensayadas afectan negativamente al equilibrio fisiológico de las plántulas obtenidas? ¿Se pueden extrapolar los efectos estudiados a diferentes variedades de estevia?

El segundo objetivo es comparar las respuestas a diferentes variables (variedad de estevia -Criolla y Morita-, luz/oscuridad y concurso de fitorreguladores) en la obtención de callos friables, a partir de trozos de hoja de las plantas anteriormente micropropagadas, previos a suspensiones celulares, en ambos casos -callos y suspensiones-, capaces de potenciar la síntesis de metabolitos secundarios con posible interés farmacológico.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Micropropagación

2.3.1.1 Material vegetal y tratamientos.

Se aislaron explantos uninodales de 1-2 cm de longitud con dos yemas axilares (Figura 8) de plántulas cultivadas previamente *in vitro* de las dos variedades citadas, Criolla y Morita III, que se cultivaron en dos sistemas de cultivo diferentes: medio solidificado por agar y sistema de inmersión temporal (SIT) en biorreactores Plantform. Se ensayaron tres sustratos en cada sistema de cultivo: MS; MS modificado (MSM) y G, también derivado de MS y adaptado para cultivo *in vitro* de vid (Cantos y cols. 2017) todos con adición de sacarosa, vitaminas y reguladores del crecimiento (Tabla 1). Las modificaciones realizadas lo fueron a nivel de macronutrientes, que consistieron principalmente en una reducción

gradual del contenido de nitrógeno (Tablas 1 y 2). Concretamente en lo referente al medio MSM las modificaciones fueron una reducción del NH_4NO_3 de 20.6 a 10 mM, el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ fue sustituido por $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ a 5.08 mM, se duplicó la dosis de KH_2PO_4 respecto al medio MS, se aumentó la dosis de MgSO_4 de 1.5 a 2.43 mM y la de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de 0.10 a 0.13 mM y, consecuentemente, el agente quelante NaEDTA de 0.1 a 0.13 mM. Respecto al medio G la concentración de NH_4NO_3 se redujo en la misma proporción que para el caso de MSM, el KNO_3 se redujo a 7.92 mM y el $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ fue sustituido por $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ a 1.27 mM. De los micronutrientes se eliminó el IK, tomando como referencia lo indicado por Chée y Pool (1987) y el $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ se redujo a 5 μM .



Figura 8. Obtención de explantos de estevia

Tabla 1. Composición basal de los medios de cultivos empleados

COMPONENTES	MS		MSM		G	
Macronutrientes						
	mg l ⁻¹	mM	mg l ⁻¹	mM	mg l ⁻¹	mM
CaCl ₂ 2 H ₂ O	440.00	2.99	-	-	-	-
Ca (NO ₃) ₂ 4 H ₂ O	-	-	1200.00	5.08	300.00	1.27
KH ₂ PO ₄	170.00	1.25	340.00	2.50	170.00	1.25
MgSO ₄	370.00	1.50	600.00	2.43	370.00	1.50
NH ₄ NO ₃	1650.00	20.60	800.00	10.00	800.00	10.00
KNO ₃	1900.00	18.80	1900.00	18.80	800.00	7.92
FeSO ₄ 7 H ₂ O	27.80	0.1	36.14	0.13	27.80	0.1
Micronutrientes						
	mg l ⁻¹	μM	mg l ⁻¹	μM	mg l ⁻¹	μM
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.105	0.025	0.105	0.025	0.105
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.1	0.025	0.1	0.025	0.1
NaEDTA	37.30	100	48.5	130	37.30	100
KI	0.83	5	0.83	5	-	-
H ₃ BO ₃	6.20	100	6.20	100	6.20	100
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90	100	16.90	100	0.85 ⁽¹⁾	5
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	1.03	0.25	1.03	0.25	1.03
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60	29.9	8.60	29.9	8.60	29.9
Vitaminas						
	mg l ⁻¹	μM	mg l ⁻¹	μM	mg l ⁻¹	μM
MioInositol	100	555	100	555	100	555
Tiamina	1.00	2.96	1.00	2.96	1.00	2.96
Carbohidratos						
	(g l ⁻¹)	(mM)	(g l ⁻¹)	(mM)	(g l ⁻¹)	(mM)
Sacarosa	20	58.4	20	58.4	20	58.4
Reguladores de crecimiento						
	mg l ⁻¹	μM	mg l ⁻¹	μM	mg l ⁻¹	μM
BA	0.072	0.32	0.072	0.32	0.072	0.32
ANA	0.024	0.13	0.024	0.13	0.024	0.13

(1) Según Chée y Pool 1987.

Tabla 2. Contenido iónico de los macronutrientes ensayados (en mmol⁻¹)

Iones	MS	MSM	G
N total	60.01	43.88	29.18
NO ₃ ⁻	39.4	38.96	20.46
NH ₄ ⁺	20.61	10	10
H ₂ PO ₄ ⁻	1.25	2.5	1.25
K ⁺	20.04	21.3	9.16
Ca ²⁺	2.99	5.08	1.27
Mg ²⁺	1.5	2.43	1.5
SO ₄ ²⁻	1.6	2.58	1.6
Cl ⁻	5.99	-	-
Total	93.38	82.85	45.24

Se ensayaron seis tratamientos utilizando los tres sustratos mencionados: tres para medio sólido con adición de agar (7 gL⁻¹) (MSS, MSMS y GS) y tres para el sistema SIT (MSSIT, MSMSIT y GSIT). En todas las situaciones, el pH se ajustó a 5.7 antes de la esterilización en el autoclave. Los diferentes medios de cultivo se distribuyeron en cada frasco (600 mL) (100 mL por frasco) para condiciones sólidas. En el caso de los tratamientos SIT se utilizaron biorreactores Plantform (Welander, 2011; Benelli y De Carlo, 2018) de 4000 mL (Figura 9) con 500 mL de sustrato por biorreactor. Este biorreactor consta de un cuerpo de policarbonato transparente (Figura 9.1) que puede soportar una temperatura de 120 °C. Sus dimensiones son 180x150x150 mm. El intercambio de gases se controla a través de tres entradas/salidas insertas al costado por tuercas y abrazaderas a través de orificios en el cuerpo y selladas con juntas tóricas de silicona resistentes al calor. Los gases pasan a través de filtros estériles conectados por tubos de silicona a las entradas. El filtro central está conectado a un tubo de plástico en la cámara interior y pasa a través del cestillo (Figura 9.2 E). Una cámara interior (Figura 9.4 A) con 3 ranuras en el lado largo y 2 ranuras en el lado corto se sitúa en la parte inferior del biorreactor. El diseño permite que los nutrientes se eleven de manera eficiente cuando se aplica presión. El cestillo que contiene el material vegetal se coloca encima de la cámara interior. Los pequeños orificios del cestillo se colocan en tres filas que permiten que los nutrientes fluyan de manera eficiente a través del mismo

(Figura 9.5 B). Un marco con cuatro patas se inserta en la parte inferior del cestillo para presionarlo hacia abajo cuando se aplica presión. (Figura 9.6 C). Finalmente, el cuerpo está cerrado por una tapa que es hermética mediante un sellado con silicona en la ranura de la tapa que es fácil de poner y quitar mediante simple presión (Figura 9.7).

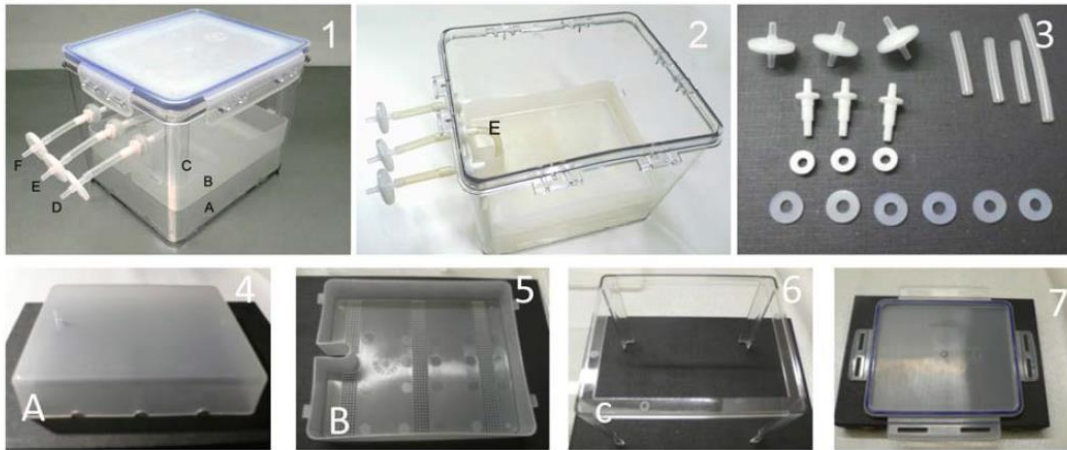


Figura 9.- 9.1: Biorreactor PLANTFORM y sus diferentes partes numeradas de A-F. 9.2: Conexión con el exterior mediante 3 entradas/salidas para intercambio de gases, E muestra el filtro central conectado a un tubo de plástico en la cámara interior. 9.3: filtros, tubos de plástico, tuercas, abrazaderas y anillos de silicona para conexión a las 3 entradas/salidas de 9.2. 9.4 A: cámara interior con 3 ranuras en el lateral más largo y conexión al filtro central. 9.5 B: cesta con 3 filas de pequeños orificios. 9.6 C: marco con 4 patas. 9.7: tapadera con 4 solapas y un anillo interior de silicona. (M. Welander and A.J. Sayegh (<http://plantform.se/index.html>)).

Una vez distribuidos los sustratos, los frascos y biorreactores se cerraron y se esterilizaron en autoclave durante 20 min (120°C, 1 kg/cm² de presión). Se establecieron 10 explantos por matraz en el caso del medio sólido y 50 por biorreactor Plantform para proporcionar 10 mL de sustrato por explanto en ambos casos. Los cultivos se incubaron en cámara de crecimiento a 26±1 °C, 30 μEm⁻²s⁻¹ con 16 h. de fotoperiodo. En el caso de los biorreactores Plantform, el intercambio de gases esterilizados mediante filtros se controló a través de las tres entradas/salidas ancladas en el lateral (Figura 10) ya citadas. La frecuencia de inmersión fue de 2 min cada 8 h, como se describe en Ramírez-Mosqueda y cols. 2016 y Vives y cols. 2017. Cada tratamiento se repitió 5 veces.



Figura 10. Cultivo de estevia en biorreactor PLANTFORM

2.3.1.2 Parámetros considerados

2.3.1.2.1 Variables biométricas

A los 25 días de cultivo se midieron las siguientes variables biométricas: longitud de la parte aérea, número de brotes por explanto (también considerado como “coeficiente de multiplicación” de acuerdo con Wiszniewska y cols. (2017)), productividad (número de brotes x longitud media del tallo) (Tallón y cols. 2012), peso fresco y seco.

El peso seco se determinó secando la parte aérea (tallos + hojas) a 80°C durante 48 h y luego pesándola en la balanza (METTLER PJ 400).

2.3.1.2.2 Tasa de crecimiento y contenido de agua

La tasa de crecimiento relativo (RGR) se calculó usando la fórmula: $RGR = \frac{\ln D_f - \ln D_i}{D} \cdot D^{-1}$ ($\text{g g}^{-1} \text{ día}^{-1}$) donde D_f = peso seco final, D_i = peso seco inicial (promedio de 10 explantos de cada tratamiento secados al inicio del experimento) y D = duración del experimento (días).

Para controlar el contenido en agua de las nuevas plantas, se determinó el nivel de hidratación usando la siguiente fórmula:

$$H (\%) = \left[\frac{F_w - D_w}{F_w} \right] 100 \quad (F_w = \text{peso fresco}; D_w = \text{peso seco}).$$

2.3.1.2.3 Pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos fotosintéticos se extrajeron en cada tratamiento, al final del período experimental. Se homogeneizaron 50 mg de hojas frescas en 10 ml de acetona al 80%. Después de filtrar, se diluyó 1 ml del extracto con 2 ml más de acetona 80%, y se evaluó el contenido de clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b) y carotenoides (xantofilas (Cx)+carotenos (c)) usando un espectrofotómetro BIOMATE, utilizando tres longitudes de onda (663.2, 646.8 y 470.0 nm). Las concentraciones finales de pigmento ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{fw}$) se calcularon siguiendo el método de Lichtenthaler (1987). Estas operaciones se repitieron tres veces para cada variedad y tratamiento de forma independiente.

2.3.1.2.4 Peroxidación lipídica

Al final del período experimental, se estimó la integridad de la membrana celular según el grado de peroxidación lipídica determinado a partir de la concentración de malondialdehído (MDA) según Dhindsa y Matowe (1981). Para ello, se trituraron tres muestras (250 mg) por tratamiento en un mortero enfriado en nitrógeno líquido. A continuación, se extrajo el polvo usando 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 0.1% (p/v). El extracto se centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante y se mezcló 1 ml con 4 ml de TCA al 20% que contenía ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.5% (p/v). La mezcla se calentó a 95 °C durante 30 minutos. Una vez enfriada en hielo, la muestra se centrifugó a 10000 x g y la densidad óptica del sobrenadante se midió en un espectrofotómetro a 532 y 600 nm. La concentración de MDA en los extractos se calculó usando un coeficiente de extinción molar de $155\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ como sigue:

Equivalentes de MDA (nmol mL^{-1}) = $(\text{Abs}_{532}-\text{Abs}_{600}) / 155000 \times 106$.

La concentración de MDA se expresó como $\text{nmol}\cdot\text{g fw}^{-1}$.

2.3.1.2.5 Estado nutritivo foliar

Para evaluar el estado nutricional del material obtenido al final del experimento, las muestras de hojas se lavaron cuidadosamente con agua destilada y luego se secaron a 80°C durante 48 h y trituraron según Redondo-Gómez y cols. (2007). Después, las muestras individuales de 500 mg se digirieron mediante oxidación en húmedo con HNO_3 concentrado a presión en un horno microondas para obtener el extracto. Las concentraciones de P, K, Ca,

Mg S, B, Cu Fe, Mn, Na, Mo y Zn en los extractos se determinaron mediante espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) (MS 3.5). La concentración de N total se determinó mediante digestión Kjeldahl utilizando un analizador elemental (Leco CHNS-932, España). Los análisis se repitieron tres veces.

2.3.1.2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico IBM SPSS Statistics v.25. Los datos se analizaron mediante el análisis de componentes principales (PCA) para la reducción de dimensionalidad y el modelo lineal general (GLM) se utilizó para analizar los efectos principales y las interacciones entre los tres medios de cultivo, los dos sistemas de cultivo y las dos variedades. Se empleó el análisis de varianza de tres vías y un factor (prueba F) y la prueba de Bonferroni para comparación de medias. Se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Levene. Las pruebas de Tukey se aplicaron a los resultados para la identificación de contrastes significativos.

2.3.2. Resultados

2.3.2.1 Crecimiento

Se observó presencia de raíces y ausencia de síntomas de hiperhidratación en todas las plántulas que se desarrollaron a partir de explantos.

La Tabla 3 recoge los resultados de los valores biométricos obtenidos de las variables estudiadas.

Tabla 3. Comparación de los valores medios de las variables biométricas obtenidos en la micropropagación de las dos variedades de estevia en los sustratos ensayados.

Variedad	Variable	Sustratos ensayados					
		MSS	MSMS	GS	MSSIT	MSMSIT	GSIT
Criolla	Longitud del tallo (cm)	8.43c	7.11b	8.48c	7.10b	5.50a	5.50a
	Nº de yemas por explanto	8.42c	6.62b	5.56a	8.24c	8.02c	6.20b
	Productividad (mm)	71.91b	48.68a	49.47a	59.86b	46.07a	34.70a
	Peso fresco (g.)	0.39ab	0.33a	0.46ab	0.49b	0.33a	0.42ab
	Peso seco (g.)	0.065c	0.037b	0.046ab	0.049abc	0.034a	0.054bc
	RGR (gg ⁻¹ día ⁻¹)	0.051c	0.032ab	0.040abc	0.041abc	0.028a	0.046bc
	Contenido hídrico (%)	83.65a	87.70ab	88.78ab	87.47ab	89.89b	85.90ab
	Morita	Longitud del tallo (cm)	5.21bc	4.62abc	5.63c	4.20ab	4.80abc
Morita	Nº de yemas por explanto	9.98bc	9.65bc	9.14bc	6.95a	10.72c	8.42ab
	Productividad (mm)	53.56b	47.88ab	54.38b	31.37a	56.73b	35.60a
	Peso fresco (g.)	0.31c	0.26bc	0.27bc	0.143a	0.175a	0.201ab
	Peso seco (g.)	0.028a	0.029a	0.032a	0.026a	0.027a	0.027a
	RGR (gg ⁻¹ día ⁻¹)	0.032a	0.034a	0.037a	0.024a	0.032a	0.029a
	Contenido hídrico (%)	88.98c	87.04bc	86.14abc	78.56ab	77.22a	85.06abc

Letras distintas leídas en fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los sustratos considerados.

En cuanto a la longitud del tallo en las plántulas de Criolla, se observaron tres grupos estadísticamente bien diferenciados (Tabla 3): 1) los de mayor longitud del tallo crecieron en los medios MSS y GS; 2) se obtuvieron tallos de longitud intermedia en MSMS y MSSIT y 3) las menores longitudes se encontraron en MSMSIT y GSIT. Se observó menor homogeneidad en longitud en las plántulas de Morita. Al igual que con las plántulas de Criolla, la mayor longitud media del tallo se obtuvo en las cultivadas en medio GS, pero con valores estadísticamente similares en las plantas cultivadas en MSS, MSMS y MSMSIT. Por el contrario, la menor longitud del tallo se cuantificó en las plántulas de los medios MSSIT y GSIT (Tabla 3). En consecuencia, considerando los resultados combinados para Criolla y Morita, los tallos más largos se obtuvieron (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) en sustratos sólidos (media de 6.60 cm) frente a SIT (media 5.21 cm) (tabla 4). Al comparar el comportamiento de ambas variedades de estevia y los tres sustratos (MS, MSM y G), independientemente del sistema de cultivo utilizado, el mejor desarrollo en longitud se encontró en los tallos cultivados en medio MS (media 6,33 cm), similar estadísticamente a la longitud media

alcanzada en G (5,9 cm) y menor (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) que la longitud de los tallos cultivados en MSM (media de 5,52 cm). En general, considerando los diferentes promedios para todos los sustratos tanto en sólidos como en SIT, se obtuvieron tallos más largos para Criolla (7.02 cm) (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) que Morita (4.77 cm).



Fig. 11 A



Fig. 11 B

Figura 11. Plantas de estevia a los 25 días de cultivo en sistema de inmersión temporal (A) y en medio gelificado con agar (B).

En la tabla 3 se puede observar que los explantos de Criolla desarrollados en los sustratos MSS, MSSIT y MSMSIT presentaron el mayor número (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) de yemas por explanto, 8.42; 8.24 y 8.02 respectivamente. Los cultivados en MSMS y GSIT arrojaron valores intermedios, 6.62 y 6.20 respectivamente, y el menor número de yemas se encontró en GS (5.56). Para las plántulas de Morita, al igual que con los resultados descritos para la variable de longitud, los resultados fueron menos homogéneos. Todos los explantos cultivados en medio sólido y MSMSIT produjeron un gran número (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) de yemas por explanto, siempre superior a 9.1, mientras que los desarrollados en MSSIT y GSIT, nunca superaron los 8.42. Se han observado diferencias entre los tres sustratos ensayados, 8.46 y 8.76 para MS y MSM, respectivamente, que presentaron valores similares y 7.33 para G (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) (Tabla 4). Sin embargo, no se detectaron diferencias entre los sistemas sólido (8.03) y SIT (8.12) como se aprecia en la citada Tabla 4. En la misma tabla se observa que las plántulas de Morita tuvieron un mayor número medio de yemas por planta 9.21, (test de Student, $p \leq 0.05$), que las de la variedad Criolla (7.18).

Tabla 4. ANOVA de tres vías

		Longitud tallo		Productividad		Número de brotes		Peso seco		Peso fresco		RGR		Contenido hídrico							
		Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.	Media	S.D.						
Medio de cultivo (M)	MS Total (N=192)	6.33	2.51	b	55.12	29.36	b	8.46	2.42	b	0.04	0.03	b	0.34	0.24	b	0.038	0.026	b	84.90	14.74
	MSM Total (N= 200)	5.52	2.25	a	49.84	31.67	ab	8.76	3.74	b	0.03	0.02	a	0.28	0.18	a	0.031	0.024	a	85.46	14.52
	G Total(N=200)	5.91	2.64	ab	43.54	25.58	a	7.33	2.77	a	0.04	0.03	b	0.34	0.23	b	0.038	0.025	b	86.47	10.06
Sistema (S)	Sólido Total (N=300)	6.60	2.69		54.31	28.76		8.23	2.91		0.04	0.03		0.33	0.19		0.038	0.025		87.04	10.74
	SIT Total (N=292)	5.21	2.04		44.40	29.06		8.12	3.28		0.04	0.03		0.30	0.24		0.034	0.026		84.17	15.31
Variedad (V)	Criolla Total (N=300)	7.02	2.46		51.78	26.32		7.18	2.18		0.05	0.03		0.40	0.24		0.040	0.026		87.23	9.19
	Morita Total (N=292)	4.77	1.95		47.00	31.95		9.21	3.53		0.03	0.02		0.23	0.16		0.031	0.024		83.97	16.27
Three-way ANOVA (modelo linear general) (p-valor)																					
Levene Test		0.000		0.000		0.000		0.000		0.000		0.168		0.000							
Efectos principales																					
Efecto del medio (M)		0.002		0.001		0.000		0.001		0.002		0.008		0.373							
Efecto del sistema (S)		0.000		0.000		0.537		0.132		0.012		0.039		0.004							
Efecto de la variedad (V)		0.000		0.022		0.000		0.000		0.000		0.000		0.001							
Interacciones																					
(M x S)		0.000		0.000		0.000		0.165		0.767		0.272		0.763							
(M x V)		0.001		0.000		0.000		0.000		0.024		0.001		0.092							
(S x V)		0.001		0.842		0.001		0.846		0.000		0.507		0.000							
(M x S x V)		0.107		0.133		0.073		0.038		0.002		0.185		0.004							
One-way ANOVA (general linear model) (p-valor)																					
Efectos de tratamientos combinados (VxSxM)		0.000		0.000		0.000		0.000		0.000		0.000		0.000		0.000		0.000		0.000	

En la misma variable, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (prueba no paramétrica de Tuckey (HSD)). Efecto significativo ($p \leq 0.05$) en negrita.

Como consecuencia de los resultados obtenidos para ambas variables, el producto de longitud por número de yemas, productividad, fue mayor (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) en las plántulas de Criolla cultivadas en sustratos MSS y MSSIT, con valores superiores a 59.8 mm, que los otros cuatro sustratos ensayados, donde nunca se superaron los 49.5 mm. Las plántulas de Morita cultivadas en MSS, GS y MSMSIT presentaron mayor productividad (superior a 54.3 mm), que, sin embargo, fue similar estadísticamente (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) a los niveles obtenidos para las plántulas cultivadas en MSMS. Las plántulas con menor productividad (menos de 35.6 mm) fueron las cultivadas en los sustratos GSIT y MSSIT. Los explantos cultivados en sustrato MS desarrollaron una alta productividad – 55.1– similar a la de los explantos cultivados en MSM (49.8) y menor (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) que los cultivados en el sustrato G (43.54 mm). En general, el sustrato sólido fue mejor (promedio de 54.31 mm, test de Student, $p \leq 0.05$) para la productividad del explanto que el SIT (promedio de 44.40 mm) (Figura 11) y se observaron diferencias entre la productividad de Criolla y Morita (promedios de 51.78 y 47.0 mm respectivamente) (Tabla 4).

Según la Tabla 3, las plántulas de Criolla alcanzaron el mayor peso fresco en el sustrato MSSIT (0.49 g), aunque estadísticamente similar a los pesos obtenidos en los demás sustratos con excepción de los desarrollados en MSMS y MSMSIT, con 0.33 g en ambos casos. El mayor peso fresco de las plántulas de Morita se registró en medio sólido. Por el contrario, se obtuvieron valores más bajos en MSSIT y MSMSIT, 0.14 y 0.17 g respectivamente. Las plántulas de Criolla también tuvieron un peso fresco promedio mayor (0.40 g) que las plántulas de Morita (0.23 g) (test de Student, $p \leq 0.05$). Estos resultados pueden explicar las diferencias encontradas cuando se comparó el peso fresco en los seis cultivos ensayados. MSM desarrolló las plántulas con el peso fresco más bajo (0.28 g) en ambas variedades, Criolla y Morita (test de Tuckey, $p \leq 0.05$), pero mientras que las plántulas de Morita cultivadas en sustratos MS y MSM usando SIT lograron un peso fresco bajo, las plántulas Criolla cultivadas en MS y G utilizando tanto el sólido como el SIT presentaron los pesos frescos más altos, lo que resultó en un peso fresco estadísticamente menor en el sistema SIT (0.30 g) que en condiciones sólidas (0.33 g) (test de Student, $p \leq 0.05$).

Los resultados del peso seco mantuvieron el mismo patrón que los del peso fresco. Sin embargo, los pesos secos más altos encontrados en plántulas cultivadas en

medio sólido fueron estadísticamente similares a las de las plántulas cultivadas en medio SIT (ambas con un peso seco medio de 0.04 g) (Tabla 4). De manera similar al peso fresco, las plántulas de Criolla presentaron los pesos secos más altos (0.05 g) en comparación con las plántulas de Morita (0.03 g) (test de Student, $p \leq 0.05$). MSM también produjo plántulas con menor peso seco (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) en ambas variedades (0.032 g) en comparación con MS y G (0.041 g y 0.040 g respectivamente) (Tabla 4). El alto peso seco encontrado en plántulas de Criolla desarrolladas en MSS (0.06 g) fue similar al cuantificado en GSIT (test de Tuckey, 0.05 g). No se observaron diferencias entre los pesos secos alcanzados en las plántulas de la variedad Morita en los diferentes sustratos ensayados (Tabla 3).

Durante los 25 días del experimento, el desarrollo diario (RGR) de las plántulas de Criolla fue mayor ($0.0398 \text{ gg}^{-1} \text{ día}^{-1}$) (test de Student, $p \leq 0.05$) que en las plántulas de Morita ($0.0317 \text{ gg}^{-1} \text{ día}^{-1}$) (Tabla 4). Esta diferencia puede explicarse por el mejor desarrollo de las plántulas de Criolla en medios MS tanto en condiciones sólidas como en SIT, y en GSIT (Tabla 3), mientras que la tasa de crecimiento relativo de las plántulas de Morita no se vio afectada por el sistema de cultivo utilizado en ninguna de los seis sustratos ensayados. Así, los mejores sustratos para ambas variedades fueron MS y G ($0.0379 \text{ gg}^{-1} \text{ día}^{-1}$) en ambos casos y el peor (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) MSM ($0.031 \text{ gg}^{-1} \text{ día}^{-1}$) (tabla 4). Cuando se consideraron todos los resultados, se encontraron diferencias (test de Student, $p \leq 0.05$) entre sólidos y SIT (0.0377 y $0.0338 \text{ gg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ respectivamente).

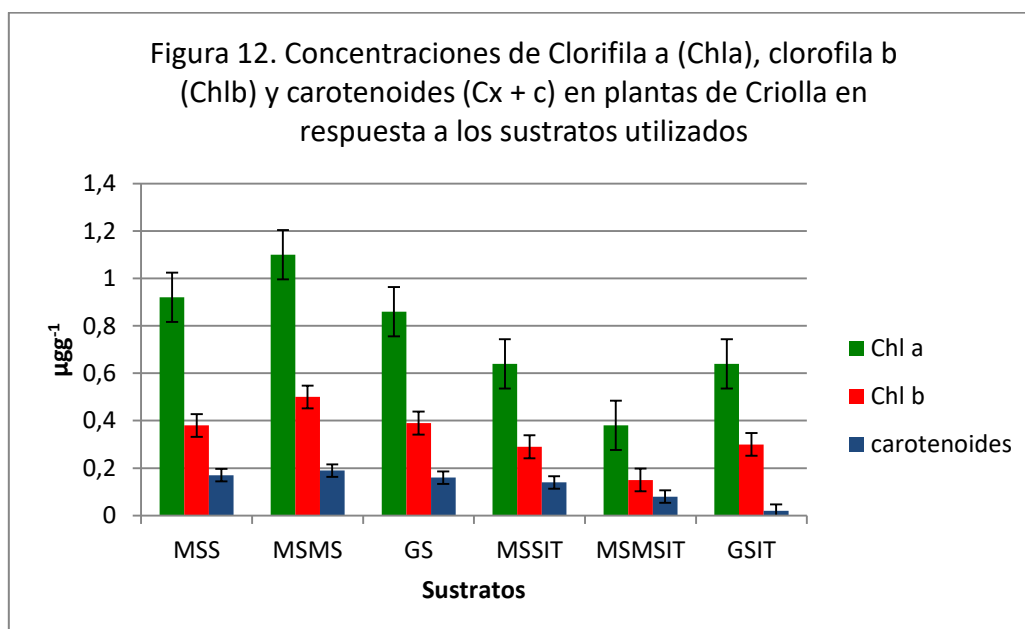
Si bien no se observaron diferencias estadísticas en el porcentaje de contenido de agua entre los tres sustratos utilizados (84.90, 85.50 y 86.47 para MS, MSM y G, respectivamente), las variaciones en peso fresco unidas a la mayor estabilidad en el peso seco en plántulas de Morita dieron lugar a un mayor (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) contenido de agua en plántulas de esta variedad cultivadas en MSS (88.98%) (Tabla 3). Este porcentaje fue similar a los obtenidos para MSMS, GS y GSIT (Tabla 3). Sin embargo, el bajo contenido de agua en plántulas de esta variedad desarrollada en MSMSIT dio lugar a una menor hidratación (test de Student, $p \leq 0.05$) en Morita (83.97%) en comparación con Criolla (87.23%) y en condiciones SIT (84.17%) en comparación con sustratos sólidos (87.03%) (Tabla 4). En cualquier caso, como ya se ha

indicado, no se identificaron signos de hiperhidricidad en ninguna de las plántulas ensayadas.

2.3.2.2 Pigmentos fotosintéticos

2.3.2.2.1 Variedad Criolla

La Figura 12 representa las concentraciones de clorofila a (Chla), clorofila b (Chlb) y carotenoides (Cx+c) en hojas completamente desarrolladas seleccionadas al azar de plántulas de Criolla, en respuesta a los diferentes sustratos.



Se encontraron diferencias (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) entre los contenidos de clorofila a (Figura 12) en respuesta a los sustratos ensayados. Las concentraciones más altas (test de Student, $p \leq 0.05$) se observaron en medios gelificados con agar (media de $0.87 \mu\text{g g}^{-1}$) en comparación con el sistema SIT ($0.59 \mu\text{g g}^{-1}$). Destacó el contenido de Chl a en plántulas que crecen en medios sólidos MS, especialmente aquellas desarrolladas en MSMS. Por el contrario, los contenidos más bajos de este pigmento se cuantificaron en plántulas que crecieron en solución nutritiva MSM en condiciones SIT (test de Tuckey, $p \leq 0.05$).

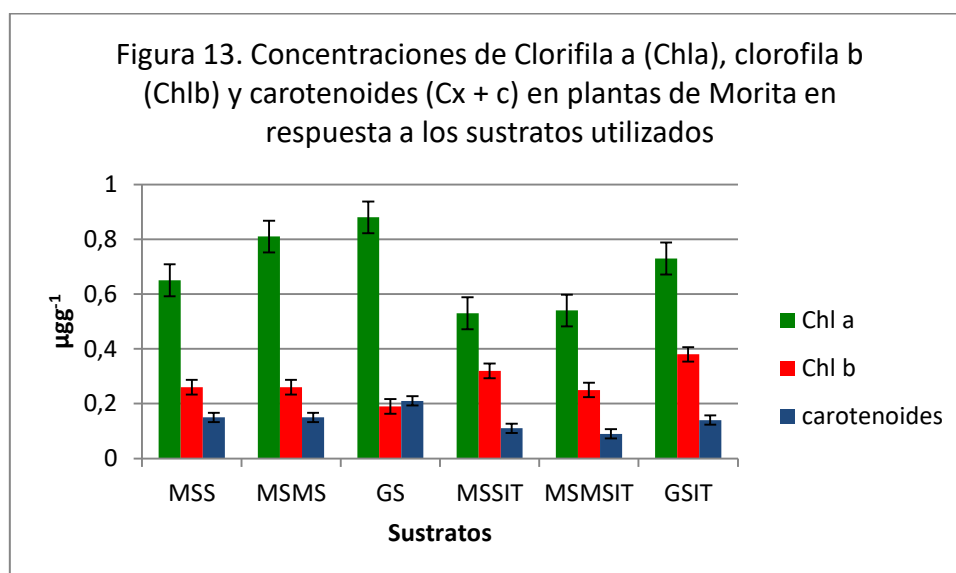
Los contenidos de Chl b, aunque con concentraciones más bajas, presentaron un patrón similar al de Chl a (Figura 12). Sin embargo, en este caso no se encontraron

diferencias entre los niveles de este pigmento para medios sólidos ($0.42 \mu\text{gg}^{-1}$) o SIT ($0.25 \mu\text{gg}^{-1}$). El contenido más bajo de clorofila b también se encontró en las plantas cultivadas en condiciones SIT usando el medio MSM ($0.15 \mu\text{gg}^{-1}$). Por el contrario, y al igual que lo comentado para la clorofila a, las concentraciones más altas de clorofila b ($0.5 \mu\text{gg}^{-1}$) se observaron en este medio, pero gelificado (test de Tuckey, $p \leq 0.05$).

Los carotenoides fueron los de menor concentración, siempre por debajo de $0.19 \mu\text{gg}^{-1}$ detectados en plántulas que crecen en sustrato MSMS, sin diferencias estadísticas con las desarrolladas en medios MS, GS y MSSIT. Por el contrario, los niveles de estos pigmentos descendieron significativamente, por debajo de $0.1 \mu\text{gg}^{-1}$ en las plántulas de Criolla de MSMSIT y GSIT (test de Tuckey, $p \leq 0.05$).

2.3.2.2.2 Variedad Morita

La Figura 13 representa las concentraciones de clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b) y carotenoides (Cx+c) en hojas de plántulas de Morita en respuesta a los sustratos ensayados.



Al igual que en el caso de Criolla, también se encontraron diferencias estadísticas (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) entre los niveles de pigmentos cuantificados entre tratamientos para plantas de esta variedad. Para Chl a (Figura 13) se hallaron

diferencias entre las plantas crecidas en GS ($0.88 \mu\text{gg}^{-1}$) y las que lo han hecho en MSSIT y MSMSIT (0.53 y $0.54 \mu\text{gg}^{-1}$ respectivamente) (test de Tuckey, $p \leq 0.05$). En consecuencia, las plantas desarrolladas en medios sólidos alcanzaron un mayor contenido de Chl a ($0.87 \mu\text{g}^{-1}$) que las cultivadas en condiciones SIT ($0.59 \mu\text{g}^{-1}$) (test de Student, $p \leq 0.05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los niveles de Chl a entre las plantas cultivadas en los tres medios (MS, 0.68 ; MSMS, 0.71 y GS, $0.78 \mu\text{gg}^{-1}$).

Las plantas de Morita desarrolladas en los sustratos MS y G ambos en SIT (0.32 y $0.38 \mu\text{gg}^{-1}$ respectivamente) contuvieron más Chl b que las cultivadas en los tres sólidos ($0.26 \mu\text{gg}^{-1}$ para MS y MSMS y $0.19 \mu\text{gg}^{-1}$ para GS) (test de Tuckey, $p \leq 0.05$).

En relación a los carotenoides (Cx+c) (Figura 13) la concentración más alta se cuantificó en las hojas de Morita creciendo en sustrato sólido G ($0.21 \mu\text{gg}^{-1}$) (test de Tuckey, $p \leq 0.05$). Se encontró una baja concentración de carotenoides en la planta desarrollada en el sustrato MSMSIT ($0.09 \mu\text{gg}^{-1}$) (test de Tuckey, $p \leq 0.05$), mientras que los otros medios ensayados alcanzaron valores similares, entre 0.14 y $0.11 \mu\text{gg}^{-1}$. Se detectaron diferencias entre los contenidos de carotenoides en situación sólida ($0.172 \mu\text{gg}^{-1}$) en relación a SIT ($0.097 \mu\text{gg}^{-1}$) (test de Student $p \leq 0.05$), pero con contenidos de carotenoides similares para los tres sustratos (MS 0.14 ; MSM 0.13 y G $0.13 \mu\text{gg}^{-1}$) independientemente de que fueran sólidos o líquidos.

No se encontraron diferencias entre los tres contenidos de pigmentos en plántulas de ambas variedades.

2.3.2.3. Peroxidación lipídica

En cuanto al contenido de MDA, no se observaron diferencias significativas entre los sustratos utilizados en condiciones sólidas (3.41 nmolg^{-1}) o medio SIT (4.06 nmolg^{-1}) (Tabla 5). Sin embargo, debido a los niveles de MDA cuantificados en las hojas de Criolla tanto en MSMSIT como en GSIT (Tabla 5), los niveles medios de MDA encontrados en esta variedad (4.28 nmolg^{-1}) fueron más altos que los de Morita (3.21 nmolg^{-1}) (t de Student $p \leq 0.05$).

Tabla 5. Comparación entre los valores medios de malondialdehído (MDA) obtenidos en la micropropagación de las variedades estevia en los sustratos ensayados.

Variedad	MDA (nmolg ⁻¹)					
	MSS	MSMS	GS	MSSIT	MSMSIT	GSIT
Criolla	3.69	3.93	2.77	5.14	4.59	5.53
Morita	2.98	4.12	2.99	3.22	2.64	3.27

2.3.2.4 Estado nutritivo

2.3.2.4.1 Macronutrientes

En general, no se observaron diferencias entre ambas variedades en cuanto a niveles de macro o micronutrientes. Solo los niveles de manganeso en hojas fueron mayores (test de Student $p \leq 0.05$) en las plántulas de Morita (411.45 mgkg⁻¹) que en las de la variedad Criolla (389.68 mgkg⁻¹). Sin embargo, el análisis de macronutrientes reveló diferencias estadísticas (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) entre los sustratos ensayados. Los porcentajes de nitrógeno fueron significativamente mayores en las plantas desarrolladas en MSS y MSMS, seguidas de los mismos sustratos de SIT (Tabla 6). El sustrato G presentó las concentraciones más bajas (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) de este elemento tanto en medio sólido como en SIT, aunque las concentraciones fueron estadísticamente mayores en el primero que en el segundo. Se observaron diferencias significativas en el contenido de nitrógeno (test de Student ($p \leq 0.05$)) entre sistemas sólidos y SIT: 5.12% y 4.33%, respectivamente.

Tabla 6. Niveles medios de macronutrientes en plantas de estevia cultivadas *in vitro* en los diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Macronutrientes											
	Nitrógeno		Fósforo		Potasio		Calcio		Magnesio		Hierro	
	(%)		(%)		(%)		(%)		(%)		(mgkg ⁻¹)	
	Cr.	Mor.	Cr.	Mor.	Cr.	Mor.	Cr.	Mor.	Cr.	Mor.	Cr.	Mor.
MSS	5.61e	5.68c	0.46c	0.36b	3.42d	3.13b	0.48c	0.49d	0.16a	0.14a	67.13a	121.30b
MSMS	5.44e	5.48c	0.51d	0.56d	3.99f	3.87d	0.69d	0.87e	0.2b	0.25e	94.40b	170.67c
GS	3.71b	4.67b	0.30b	0.41bc	2.15b	2.63a	0.41b	0.36b	0.16a	0.19c	63.53a	82.40a
MSSIT	5.06d	4.53b	0.26a	0.29a	3.17c	3.53c	0.42b	0.42c	0.16a	0.17b	120.30c	120.00b
MSMSIT	4.21c	5.13c	0.46d	0.42c	3.73e	3.47c	0.87e	0.88e	0.25c	0.22d	278.00d	279.33d
GSIT	3.24a	3.55a	0.24a	0.25a	1.97a	2.04a	0.31a	0.31a	0.16a	0.16b	74.90a	134.60b

Letras diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre cada macronutriente considerado para los sustratos ensayados. Cr.: Criolla; Mor; Morita

Respecto a los niveles de fósforo y potasio, las plántulas cultivadas en sustratos MSS, MSMS y MSMSIT presentaron los porcentajes más altos (test de Tuckey, $p \leq 0.05$). Por el contrario, las plántulas con menor contenido de fósforo y potasio fueron las cultivadas en GSIT y MSSIT. El nivel de fósforo registrado en hojas de plántulas cultivadas en medio sólido (0.43%) fue significativamente mayor (test de Student $p \leq 0.05$) que los encontrados en plántulas desarrolladas bajo condiciones SIT, (0.32%). El análisis foliar reveló la mayor concentración de calcio y magnesio en plántulas cultivadas en MSMSIT, aunque en las plántulas de Morita el mayor porcentaje (test de Tuckey $p \leq 0.05$) se encontró en medio MSMS (Tabla 6). Para ambas variedades, el mayor contenido de hierro (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) se obtuvo en las plántulas cultivadas en MSMSIT. En estas condiciones se acumuló más hierro en hojas, (171.25 mgkg⁻¹) que en medio sólido (108.21 mgkg⁻¹) (test de Student $p \leq 0.05$).

2.3.2.4.2 Micronutrientes

En relación a los micronutrientes (Tabla 7), con excepción del molibdeno, que presentó promedios mayores en hojas de Criolla, 12.98 mgkg⁻¹, que en Morita, 149.45 mgkg⁻¹, (test de Student $p \leq 0.05$), el resto de microelementos analizados no presentaron diferencias en sus contenidos para ambas variedades.

El nivel de boro fue mayor en las hojas de plántulas de Criolla cultivadas en medios MSMSIT y GSIT (test de Tuckey, $p \leq 0.05$). El patrón fue similar para la variedad Morita, pero en este caso se obtuvieron niveles análogos para ambos medios y también en condiciones sólidas. (Tabla 7).

Tabla 7. Niveles medios de micronutrientes en plantas de estevia cultivadas *in vitro* en los diferentes medios de cultivo.

Micronutrientes																
		Boro		Cobre		Azufre		Manganeso		Sodio		Molibdeno		Zinc		
		(mgkg ⁻¹)		(mgkg ⁻¹)		(mgkg ⁻¹)		(mgkg ⁻¹)		(mgkg ⁻¹)		(mgkg ⁻¹)		(mgkg ⁻¹)		
Medio de cultivo	Cr.		Mor.		Cr.		Mor.		Cr.		Mor.		Cr.		Mor.	
	MSS	54.0a	50.2a	2.8d	5.1d	0.39b	0.46cd	254.0b	269.7a	0.09d	0.07c	9.0a	114.0a	84.7a	114.0a	
MSMS	71.4b	101.3b	3.3e	5.1d	0.50 c	0.53e	336.3c	398.0b	0.09d	0.11d	13.0d	147.0b	103.0c	147.0b		
GS	78.0b	106.1b	1.7a	2.5a	0.31a	0.40ab	653.3f	620.7d	0.05c	0.07c	9.3ab	140.0b	110.0c	140.0b		
MSSIT	49.9a	53.8a	2.5c	3.0b	0.40b	0.43bc	227.6a	255.0a	0.02a	0.03a	11.8c	118.0a	101.0b	118.0a		
MSMSIT	101.4c	101.7b	4.1f	4.3c	0.48c	0.46d	381.6d	408.7b	0.04b	0.03a	24.6e	172.7c	173.7e	172.7c		
GSIT	95.2c	101.0b	2.2b	3.0b	0.37b	0.37a	485.3e	516.6c	0.04b	0.04b	10.2b	205.0d	163.7d	205.0d		

Letras diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre cada macronutriente considerado para los sustratos ensayados. Cr.: Criolla; Mor; Morita

El mayor contenido de cobre cuantificado en hojas de Criolla se obtuvo en las plántulas cultivadas en MSMSIT (test de Tuckey, $p \leq 0.05$). Sin embargo, en la variedad Morita estos contenidos fueron significativamente mayores (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) en plántulas cultivadas en MSS y MSMS. Las mayores concentraciones de azufre (test de Tuckey $p \leq 0.05$) se encontraron en las plántulas que crecieron en MSMS y MSMSIT, mientras que los contenidos más bajos se cuantificaron en las plántulas que crecieron en los sustratos GS y GSIT (Tabla 7). Los niveles más altos de manganeso se encontraron en plántulas de las dos variedades cultivadas en GS y los más bajos en MSMSIT (test de Tuckey, $p \leq 0.05$). También se observaron diferencias significativas (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) en el contenido de sodio, con valores máximos en plántulas propagadas en medios MSS y MSMS (test de Tuckey, $p \leq 0.05$). En este caso, la concentración de Na identificada en hojas de plántulas desarrolladas en condiciones

sólidas (0.082 mg/kg) fue mayor que en las cuantificadas en SIT (0.033 mgkg⁻¹) (test de Student p≤0.05). Para molibdeno y zinc, los valores más altos detectados en plántulas de Criolla correspondieron a las cultivadas en medio MSMSIT. Sin embargo, para las plántulas de Morita, los niveles más altos de ambos elementos encontraron en GSIT. Las hojas que se desarrollaron en SIT presentaron niveles más altos de zinc (158.82 mgkg⁻¹) que las de las plántulas cultivadas en sustratos sólidos (122.34 mgkg⁻¹) (test de Student p≤0.05).

2.4. Callogénesis

2.4.1. Material y métodos

2.4.1.1 Material vegetal y tratamientos

Se utilizaron como material de iniciación del callo explantos foliares de aproximadamente 0.5 cm² (Figura 14a) de plantas desarrolladas en condiciones asépticas, por estar ya estabilizadas en condiciones *in vitro*, de las variedades Criolla y Morita. Estos explantos se cultivaron en cámara de cultivo a 25±1°C de temperatura, tanto en condiciones de luz (30 μEm⁻² s⁻¹, 16 horas de fotoperiodo) como de oscuridad. En ambos casos en medio MS como medio base con adición de bencil-adenina (BA), ácido naftalen acético (ANA) y kinetina (Kin), solos o combinados según la siguiente tabla:

Tabla 8. Combinación de reguladores utilizados en el medio MS (mg l⁻¹)

Tratamientos	BA	ANA	Kin
1	2	2	-
2	2	1	-
3	-	1	1
4	-	1	2
5	-	2	2

Los medios se completaron con sacarosa 3% y agar (0.8%). El pH del medio se ajustó a 5.8 antes de añadir el agar. El medio se autoclavó a 121 °C, 1 atm de presión, durante 20 minutos. Todas las tareas de siembra se efectuaron bajo cabina de flujo

laminar AH-10. Los cultivos se realizaron en placas de Petri de 9 cm de diámetro con 35 cc de medio de cultivo cada una (Figura 14a).

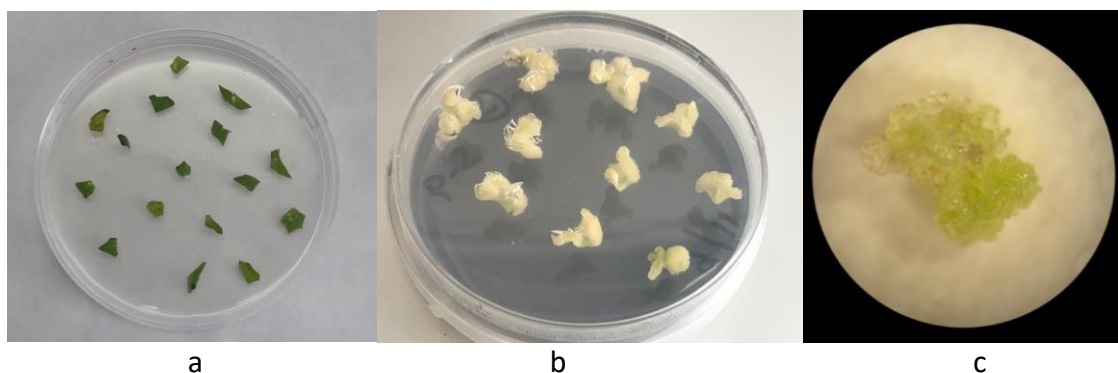


Figura 14. Explantos foliares iniciales (14a), desarrollo de callo (14b) y callo friable (14c)

El diseño experimental fue 5 placas x 5 tratamientos x 16 explantos foliares por placa, x 2 regímenes lumínicos (luz/oscuridad) x 2 variedades (Criolla/Morita): total 1600 explantos.

2.4.1.2 Parámetros considerados y tratamientos estadísticos

Se evaluó el proceso de callogénesis a los 40 días de cultivo considerándose los siguientes parámetros: Porcentaje de explantos que desarrollaron callo, estimación de la calidad y área del callo obtenido según la escala cualitativa propuesta por Kryvenki y cols. (2008) que comprende 5 grados.

- 1- Explanto muerto
- 2- Explanto vivo sin formación de callo
- 3- 25% del explanto con formación de callo
- 4- 50% del explanto con formación de callo
- 5- 100 del explanto con formación de callo.

También se determinó el peso fresco de los callos usando una balanza METTLER PJ 400.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el paquete estadístico SPSS v.25, con el que se calcularon estimadores de centralización,

dispersión y las comparaciones entre medias y porcentajes a través del cálculo ANOVA mediante test de Tuckey y de la prueba z (t de Student) respectivamente. En el caso de los porcentajes se utilizó la corrección de Bonferroni. La comparación de medias entre dos distribuciones se llevó a cabo usando la prueba t de Student del citado paquete informático utilizando el test de Levene para comprobar la homogeneidad de las varianzas.

2.4.2. Resultados

2.4.2.1 Inducción de callo

En la tabla 9 se indican los porcentajes medios de formación de callo a partir de explantos de ambas variedades en condiciones de luz y oscuridad tras 40 días de cultivo.

Tabla 9.- Porcentaje medio de explantos que han producido callo en condiciones de luz y oscuridad en cada una de las variedades tras 40 días de cultivo.

Tratamiento	Formación de callo (%) var. Criolla		Formación de callo (%) var. Morita	
	LUZ	OSCURIDAD	LUZ	OSCURIDAD
1	100	100	100	100
2	92.50	100	100	100
3	98.73	100	98.39	100
4	100	100	97.50	100
5	98.73	100	100	100
Total tratamientos	97.99	100	99.17	100

Se observa en esta tabla que, en general, los explantos de ambas variedades, tanto bajo iluminación como en oscuridad y en los tratamientos ensayados indujeron callo por encima del 92% y en bastantes casos todos tuvieron capacidad de calogénesis alcanzando, por tanto, el 100% de formación de callo. En consecuencia, no se encontraron diferencias significativas ni entre los porcentajes de callo entre ambas variedades para un mismo tratamiento, ni para una misma variedad según los tratamientos ensayados. Es destacable que cuando los explantos de ambas variedades se cultivaron en los mismos medios, pero en oscuridad todos desarrollaron callo.

2.4.2.2 Calidad del callo

En la tabla 10 se indican los valores medios de calidad de callo desarrollados por explantos de ambas variedades en condiciones de luz y en función de los tratamientos ensayados tras 40 días de cultivo.

Tabla 10.- Calidad de callo (según Kryvenki y cols. 2008) en cada una de las variedades estudiadas bajo iluminación en función del tratamiento ensayado.

Tratamientos	Variedad	
	Criolla	Morita
1	4.43	4.83
2	4.21	4.63
3	4.54	4.65
4	4.50	4.57
5	4.69	4.54

Según se observa en la tabla todos los callos obtenidos mostraron una calidad muy alta en condiciones de luz, tanto en el aspecto, color blanco amarillento y bastante friable (Figuras 14b y c), como cuando se ha aplicado la escala de Kryvenki y cols, por ello y por la similitud entre los valores observados no se encontraron diferencias estadísticas ni entre medios ni entre ambas variedades.

En la tabla 11 se recogen los valores medios de calidad de callo desarrollados por explantos de ambas variedades en oscuridad y en función de los tratamientos ensayados tras 40 días de cultivo.

Tabla 11.- Calidad de callo (según Kryvenki y cols. 2008) bajo oscuridad en función del tratamiento ensayado.

Tratamientos	Calidad de callo según variedad	
	Criolla	Morita
1	5.00 b B	5.00 b
2	5.00 b B	5.00 b
3	5.00 b B	5.00 b
4	4.84 a A	5.00 b
5	5.00 b B	5.00 b

Letras minúsculas distintas leídas en fila indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) entre ambas variedades para un mismo tratamiento. Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) para una misma variedad según el tratamiento ensayado.

Se observa en la tabla 11 un descenso significativo (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) de la calidad del callo en los explantos de la variedad Criolla cultivados en oscuridad en medio 4, 1 mg l^{-1} de ANA y 2 mg l^{-1} de Kin, con un valor de 4.84 frente al resto de tratamientos que alcanzaron el máximo de calidad, tanto en esta variedad como en Morita.

Los callos inducidos por los explantos tanto de Criolla como de Morita en oscuridad fueron de mayor calidad (test de Student $p \leq 0.05$) en todos y cada uno de los tratamientos, con medias de 4.97 y 5.00 respectivamente, que los desarrollados en luz, medias de 4.48 y 4.68 respectivamente para ambas variedades.

2.4.2.3 Peso fresco del callo

En la tabla 12 se indica el peso fresco medio de los callos obtenidos a partir de explantos de ambas variedades cultivados en **luz** durante 40 días en los diferentes medios propuestos.

Tabla 12.- Peso fresco medio (g) de callo bajo **iluminación** y en función de la variedad y del tratamiento ensayado.

Tratamientos	Peso fresco medio callo (g)	
	Criolla	Morita
1	0.253 a	0.242 a
2	0.248 a	0.231 a
3	0.269 a	0.216 a
4	0.239 b	0.179 a
5	0.223 a	0.228 a

Letras minúsculas distintas leídas en fila indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) entre ambas variedades para un mismo tratamiento.

Se observa en dicha tabla que los pesos alcanzaron un promedio de 0.233 g. en el total del ensayo, sin diferencias entre los obtenidos dentro de una misma variedad para los tratamientos ensayados. No obstante, los callos desarrollados en el tratamiento 4 a partir de explantos de la variedad Criolla tuvieron mayor peso (test de Student $p \leq 0.05$) que los de Morita, 0.239 y 0.179 g. respectivamente.

En la tabla 13 se indica el peso fresco medio de los callos obtenidos a partir de explantos de ambas variedades cultivados en **oscuridad** durante 40 días en los diferentes medios ensayados.

Tabla 13.- Peso fresco medio (g) de callo bajo oscuridad en función de la variedad y del tratamiento tras 40 días de cultivo ensayado.

Tratamientos	Peso fresco (g) del callo	
	Criolla	Morita
1	0.248 a A	0.366 b A
2	0.281 a AB	0.452 b B
3	0.300 a BC	0.394 b AB
4	0.342 a C	0.402 b AB
5	0.307 a BC	0.391 b AB

Letras minúsculas distintas leídas en fila indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) entre ambas variedades para un mismo tratamiento. Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) para una misma variedad según el tratamiento ensayado.

En esta tabla se observa una mayor heterogeneidad en los pesos que los descritos en condiciones de luz, resultando para todos los medios ensayados que los callos de la variedad Morita presentaron valores superiores (test de Student, $p \leq 0.05$) a los de Criolla. Por otro lado, se encontraron diferencias de pesos en función del medio utilizado. Los callos de la variedad Criolla cultivados en los medios 3, 4 y 5, carentes de BA, presentaron pesos altos (test de Tuckey, $p \leq 0.05$), aunque en el caso de los medios 3 y 5 el peso fue similar al del medio 2 que contenía 2 mg l^{-1} de BA y 1 mg l^{-1} de ANA. Por el contrario, en los callos de la variedad Morita se obtuvieron pesos mayores (test de Tuckey ANOVA, $p \leq 0.05$) en este medio 2, frente al medio 1, preparado con las dosis más elevadas de BA y ANA y carente de Kin, que presentó el menor peso de callos. Los medios 3, 4 y 5 presentaron pesos intermedios entre los dos citados.

2.5. Discusión

El éxito de cualquier procedimiento de cultivo *in vitro* depende en gran medida del medio utilizado. Idealmente, los medios deben optimizarse para las especies que se cultivarán, asegurando un correcto equilibrio y absorción de nutrientes. Como se indicó anteriormente, existe una extensa literatura sobre la mejora de la micropropagación de estevia que describe el uso de una variedad de sustratos. Sin embargo, esos estudios se han centrado principalmente en optimizar la dosis y la calidad de los reguladores del crecimiento. La presente tesis considera tres factores para incrementar la calidad y cantidad de plantas micropropagadas. El primer factor

son las variedades utilizadas. Se han seleccionado dos variedades comerciales (Criolla y Morita III). Los otros dos factores considerados han sido el sistema de cultivo (sólido y SIT) y medio (MS, MSM y G), con especial énfasis en su composición mineral. Así, los componentes orgánicos (sacarosa, vitaminas y reguladores del crecimiento) se han mantenido constantes (Tabla 1). Para comprender la influencia general del medio de cultivo (M), el sistema de cultivo (S) y la variedad (V) en la producción de plántulas de estevia y así distinguir los efectos e interacciones de estas tres variables en las plántulas, se han utilizado el Análisis de Componentes Principales (ACP) y el test ANOVA. Las interacciones entre los diseños experimentales han sido significativas para la mayoría de las variables. La prueba de Levene para cada variedad individual ha mostrado que las varianzas han sido generalmente no homogéneas, y, en consecuencia, es posible usar ANOVA unidireccional para probar la dependencia significativa del tratamiento de cada variable.

Se ha realizado un ANOVA de tres vías utilizando el Modelo Lineal General, que ha revelado que los tres factores diseñados han influido ($p \leq 0.05$) en una o más de las variables estudiadas en diferentes grados (Tabla 4). La posible asociación entre las diferentes variables se ha probado mediante el análisis de componentes principales rotados por Varimax (ACP). Los coeficientes de correlación entre cada componente principal y cada variable se muestran en la Tabla 14. Estos coeficientes muestran que el peso seco, el peso fresco, la RGR y la longitud del tallo se han asociado entre sí dentro del primer componente (CP1), mientras que el número de brotes por explanto se ha asociado con productividad dentro del segundo componente (CP2). El contenido de agua ha estado en un tercer componente (CP3). RGR ha sido negativo y débilmente asociado con el tercer componente. La productividad se ha asociado, también débilmente, con el primer componente. El análisis ha tenido en cuenta más del 84% de la varianza y se han encontrado comunalidades altas para todas las variables. Esto ha confirmado la relación entre la productividad y el número de brotes por explanto. Por tanto, la productividad dependía más del número de brotes por plántula que de la longitud del tallo.

La gráfica de puntuación del análisis de componentes principales (Figura 15) muestra las medias para cada tratamiento combinado de CP1 (39,58% de varianza) versus CP2 (25,47% de varianza). La longitud del tallo, el peso y la RGR se han asociado

con diferencias varietales (Criolla>Morita), mientras que el número de brotes y la productividad lo han hecho con el sistema de cultivo o medio de cultivo, aunque se han observado diferencias entre las variedades. Para Criolla, en ambos sistemas de cultivo, el número de brotes se ha asociado con el medio de cultivo (MS>MSM>G), mientras que en Morita la misma variable se ha asociado con el sistema de cultivo. Sin embargo, en SIT el orden ha sido (MSMSIT>GSIT>MSSIT), mientras que en condiciones sólidas no se han observado diferencias.

Tabla 14. Coeficientes de correlación entre cada variable y los tres factores resultantes del análisis de componentes principales rotados por Varimax, se han tomado en cuenta los valores propios y la varianza porcentual.

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Comunalidades
Peso seco	0.886	0.025	-0.302	0.877
Peso fresco	0.830	0.148	0.322	0.815
RGR	0.792	0.137	-0.400	0.807
Longitud del tallo	0.688	0.345	0.276	0.669
Nº de brotes por explato	-0.009	0.944	-0.064	0.895
Productividad	0.440	0.855	0.117	0.939
Contenido hídrico	-0.034	0.018	0.939	0.883
Valor propio	2.771	1.783	1.331	
Varianza (%)	39.582	25.472	19.011	
Varianza acumulada	39.582	65.054	84.065	

Método de extracción: ACP.

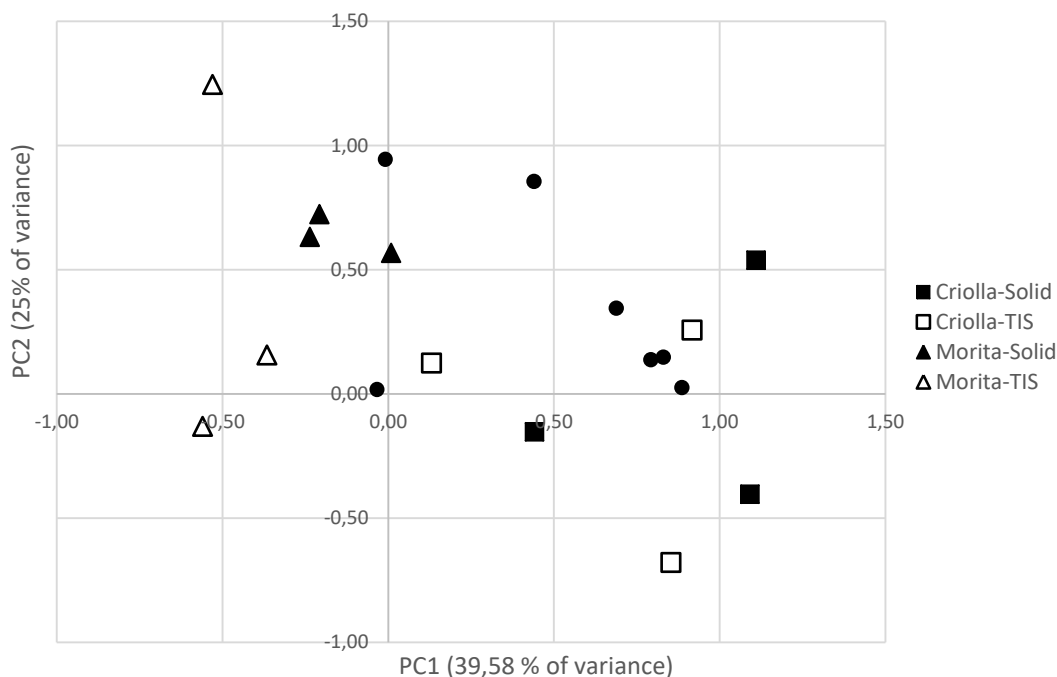


Figura 15. Gráfica de puntuaciones medias del análisis de componentes principales para cada tratamiento combinado (Cuadrados negros: Criolla con sistema sólido; Cuadrados blancos: Criolla con sistema de inmersión temporal (SIT); Triángulos negros: Morita con sistema sólido; Triángulo blanco: Morita con SIT. Círculo negro: Variables (Tabla 14) están subrayados.

De acuerdo con los valores parciales de Eta-cuadrado, el factor experimental con mayor incidencia ha sido la variedad ($\eta^2_p = 0.470$), seguido por el sistema de cultivo ($\eta^2_p = 0.139$) y, con menor incidencia, el medio de cultivo ($\eta^2_p = 0.070$).

La variedad (Criolla/Morita) ha influido en todas las variables propuestas. Las plántulas de Criolla han producido los valores más altos en todas las variables, excepto en el promedio de número de brotes por planta, con niveles mucho mayores en las plántulas de Morita (Tabla 4).

El sistema de cultivo ha influido en todas las variables con excepción del número de brotes y el peso seco. En los casos influenciados por el sistema de cultivo, los valores más altos siempre se han encontrado en el sistema sólido (Tabla 4).

Los medios de cultivo han influido en todas las variables con excepción del contenido de agua. Los mayores valores de longitud de tallo, productividad, número de brotes, peso fresco y RGR se han obtenido en MS. MSM ha sido estadísticamente similar a MS en productividad y número de yemas y G ha sido similar a MS en longitud

de tallo, peso fresco y seco y RGR. Así, según el análisis ANOVA se puede asumir que la mejor combinación de las tres variables para una adecuada micropropagación de las variedades de estevia consideradas ha sido Criolla en condiciones sólidas utilizando medio de cultivo MS.

Sin embargo, se pueden establecer ciertas consideraciones para cada variable estudiada (Tabla 4). En el caso de la longitud del tallo, la mejor combinación ha consistido en plántulas de Criolla cultivadas en medios sólidos MS o G. Los explantos de Morita han desarrollado el mayor número de brotes para plántulas en SIT usando MSM o MS. Las plántulas de Criolla han producido los pesos frescos y secos más altos; los mayores pesos frescos se han obtenido en plántulas de esta variedad cultivadas en MS o G en condiciones sólidas; los pesos secos más altos se han alcanzado en plántulas de Criolla desarrolladas en MSS y GS.

Así, para ambos pesos los contenidos de agua más bajos se han encontrado en plántulas de la variedad Morita cultivadas en MS y MSM en condiciones SIT. No se ha detectado alta acumulación de agua en hojas, en línea con la ausencia indicada de síntomas visuales de hiperhidricidad.

De los indicadores biométricos evaluados, el número de brotes por la longitud media del tallo, definido como productividad (Tallón y cols. 2012), y la evolución del crecimiento en el tiempo expresada como RGR, son de especial interés en la mejora de la micropropagación, especialmente con fines comerciales. Según nuestros resultados, la mejor combinación desde el punto de vista de la productividad ha sido Criolla cultivada en MS, tanto en condiciones sólidas como en SIT, pero las plántulas de Morita pueden lograr una productividad similar en MSMSIT. SIT puede fomentar un buen desarrollo con ambas variedades, pero el medio de cultivo es importante; los explantos de Criolla deben ser micropropagados en MS y Morita en MSM, mientras que las condiciones sólidas son adecuadas para Criolla y MS. Para RGR, la combinación óptima sería Criolla en condiciones sólidas o SIT usando MS o G. Sin embargo, los explantos de Morita han logrado un desarrollo similar en medio G sólido.

Según Chée (1986), la concentración de sulfato de manganeso en el sustrato debe reducirse para el cultivo *in vitro* de vid, ya que el manganeso es un cofactor en la oxidación del ácido indolacético (AIA) y también se ha descrito que cataliza la oxidación de los protectores de auxina, acelerando así oxidación y desactivación de AIA

por peroxidasa endógena. Así, este autor y otros como Troncoso y cols. (1990) encontraron una clara mejora en la caulogénesis en la vid fuertemente relacionada con la reducción del sulfato de manganeso.

En el presente estudio con estevia, la concentración muy baja de sulfato de manganeso suministrada por el medio G no ha mejorado sustancialmente la longitud de los brotes o el número de brotes por explanto, lo que indica que esta modificación del sustrato de cultivo no es generalizable a todas las especies y debe testarse antes de su aplicación *in vitro*. El buen desarrollo logrado en los sustratos sólidos aquí cuantificados contrasta con el hallazgo descrito por autores como Kuria y cols. (2008), quienes reportaron un menor crecimiento de plántulas de patata en medio sólido en comparación con líquido como resultado de una menor absorción de nutrientes del sustrato.

Ante la ausencia de raíz en los primeros días del establecimiento de los explantos en el cultivo líquido, el transporte dentro de la planta se produce a través del xilema. Este efecto se ve favorecido por los estomas continuamente abiertos, circunstancia característica del sistema de micropropagación (De Klerk y Wijnhoven, 2005), consecuencia de una alta humedad relativa en el recipiente de cultivo. Al contrario de lo que se podía esperar, a pesar de la fácil asimilación del medio líquido, no han sido las plántulas en biorreactor las que han presentado el mayor contenido de agua en sus células. Esto explica por qué no se han observado síntomas de hiperhidricidad en las plántulas micropropagadas en este sistema con medio líquido.

La acumulación de clorofilas y carotenos en plantas se correlaciona directamente con el estado de desarrollo fisiológico de las mismas debido a la influencia de estos pigmentos en la actividad fotosintética para cubrir la demanda metabólica de las células activas (Samanta y cols. 2017). En términos de la calidad de las plantas *in vitro* cuando se analizaron los contenidos de clorofila a, b y carotenoides se encontraron niveles más bajos de estos pigmentos en plantas cultivadas en biorreactor. Es conocido que en presencia de sacarosa los niveles de estos pigmentos decrecen. Aunque ambos sistemas de cultivo contaron con 20 g^l⁻¹ de sacarosa en el sustrato, la capacidad de absorción de nutrientes, incluida la sacarosa, en el medio líquido es más efectiva que en el sólido como indican Vidal y Sánchez (2019), quienes al cultivar eucalipto en RITA® encontraron mayores tasas fotosintéticas cuando

eliminaron la sacarosa del medio. Por otro lado, Chakrabarty y cols. (2007) señalaron que en sistema SIT el patrón de manzano M9 EMLA presentó una tasa de agotamiento de la sacarosa muy baja, por lo que la acción de la sacarosa fue más prolongada incidiendo negativamente en la presencia de pigmentos como se ha indicado. Posada y cols. (2015) indicaron que cuando no había azúcar en el medio, las plantas de papaya produjeron significativamente más clorofila y carotenos. Jo y cols. (2009) indicaron que plantas cultivadas en medios con sacarosa mostraron reducida actividad fotosintética probablemente debido a la presencia de una fuente de energía suficiente (azúcar). Franck y cols. (2006) concluyeron que la sacarosa juega un papel central en el mecanismo que media el control de la regulación disminuyendo la fotosíntesis. Según Azcon-Bieto (1983) el descenso de sustrato para la enzima Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa (Rubisco) debido a la acumulación de azúcares solubles en las hojas podría provocar la inhibición de fotosíntesis. Aunque, el contenido de clorofila no sea un indicador directo relacionado con la capacidad fotosintética (Fujiwara y cols. 1992), permite estimar el estado del aparato fotosintético (Seon y cols. 2000; Isah y cols. 2022). En consecuencia, los resultados obtenidos sobre concentración de pigmentos sugieren que las variaciones en los mismos están más relacionadas con el sistema de cultivo (sólido o TIS) que a la variedad o al medio a pesar de las ligeras diferencias detectadas para estas dos últimas variables.

Teniendo en cuenta que el MDA es el resultado de la descomposición de los ácidos grasos insaturados en la membrana celular, su nivel se correlaciona directamente con el estrés oxidativo como se ha indicado. A pesar de los altos niveles de MDA detectados en las hojas de las plántulas Criolla, promedio de 4.28 nmol g^{-1} , con un máximo de 5.53 en el medio GSIT (Tabla 5), éstos han sido similares a los reportados por Hajihashemi y Ehsanpour (2013) como normales (4.9) para las plántulas de estevia cultivadas *in vitro* en sustrato MS. Por tanto, esto sugiere que los tratamientos y el sistema de cultivo utilizados no dañaron las células de estevia.

En la literatura actual se pueden encontrar muchas publicaciones sobre esteviósidos y rebaudiósidos de plántulas de estevia cultivadas *in vitro*. Sin embargo, parece que el estado nutricional de las hojas de plantas micropropagadas ha atraído poco interés y, hasta nuestro conocimiento, no existe bibliografía relacionada con este tema, a excepción de la publicación derivada de esta tesis (Vilariño y cols. 2021). Por

esta razón, los niveles de nutrientes aquí aportados se consideran muy útiles para establecer un estado nutricional estándar de gran interés para futuros estudios referidos en la micropropagación de estevia. Los resultados reportados aquí indican que los valores de nitrógeno estuvieron en el rango de 3.24 a 5.68%. Estos contenidos están claramente relacionados con las composiciones del sustrato (Tablas 1 y 2), $r = 0.7544$ ($p \leq 0.01$). Deng y col. (2012) encontraron en explantos de *Fraxinus mandshurica* que la absorción de nitrógeno, tanto en forma amónica como nítrica, se vio favorecida en medios de cultivo gelificados con agar en comparación con los cultivados en SIT, de manera similar a los resultados aquí obtenidos para ambas variedades. Los niveles de fósforo variaron entre 0.56 y 0.24%, asimismo correlacionados directamente con su contenido en el sustrato ($r = 0.7521$, $p \leq 0.01$) con un alto contenido en plántulas cultivadas en medio sólido. El contenido de potasio en las hojas que osciló entre el 3.99 y el 1.97% presenta la correlación más fuerte con el contenido de sustrato ($r = 0.9649$, $p \leq 0.01$), lo que indica que una dosis casi tres veces añadida al sustrato de MSM puede ser adecuada para un buen desarrollo *in vitro* de las plántulas de estevia. El contenido de K en las hojas de ambas variedades fue levemente mayor en sustratos sólidos (3.18%) que cuando se cultivaron las plántulas en biorreactor (2.96%). De manera similar al potasio, los niveles de calcio, que han estado entre 0.31 y 0.88%, muestran una correlación muy fuerte con el calcio adicionado a los sustratos ($r = 0.9134$, $p \leq 0.01$). George y cols. (2008) indicaron que las concentraciones de calcio en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* tienden a ser proporcionales a las del suelo. Aunque Deng y cols. (2012) reportaron mejor absorción de Ca en el sistema de inmersión temporal para plantas *in vitro* de *Fraxinus mandshurica*, en el presente trabajo no se detectaron diferencias entre el contenido de Ca en sustratos sólidos y SIT, (0.53% para ambos). Los niveles de magnesio oscilaron entre 0.14 y 0.25% y también estuvieron claramente relacionados con el suministro de Mg en los sustratos ($r = 0.8911$, $p \leq 0.01$). Se encontró una alta variabilidad en los niveles de hierro en hojas según los diferentes tratamientos ensayados, con un máximo de 129.33 mgkg^{-1} en plántulas que crecieron en MSMSIT y un mínimo de 63.53 mgkg^{-1} en GS. Sin embargo, se mantiene la correlación directa con el Fe en los sustratos ($r = 0.7118$, $p \leq 0.05$). Como se describió anteriormente, las plántulas que crecieron en SIT alcanzaron niveles de Fe más altos en las hojas que las que se desarrollaron en medios sólidos. Castro–González

y col. 2019, encontraron igualmente esta variabilidad en plantas de estevia cultivadas en SIT con medios suplementados con diferentes concentraciones de nanopartículas (AgNPs), oscilando entre $143 \mu\text{g g}^{-1}$ y $289 \mu\text{g g}^{-1}$ de Fe.

Las concentraciones de manganeso en hojas oscilaron entre 227.6 mgkg^{-1} y 653.3 mgkg^{-1} . Este ha sido el único elemento significativamente correlacionado de manera inversa con su concentración en los sustratos ($r = -0.8653$, $p \leq 0.01$). Este resultado puede explicarse por el antagonismo entre el contenido de K en el sustrato y de Mn en las hojas indicado por Tavares y cols. (2014) que encontraron una disminución significativa de Mn en hojas de *Aechmea blanchetiana* micropropagadas en medio con altos niveles de K. De acuerdo con este antagonismo, nuestros resultados indican una correlación inversa similar entre el K agregado al medio y la concentración de Mn en las hojas ($r = -0.8252$, $p \leq 0.01$). No se detectaron diferencias en el contenido de Mn en hojas de Criolla y Morita (422.0 y 379.1 mgkg^{-1} respectivamente). Los niveles de azufre variaron entre 0.53 y 0.31% en plántulas de Morita que crecen en MSMS y en plántulas de Criolla que se desarrollaron en GS, respectivamente. No se observaron diferencias entre los sistemas sólido y biorreactor (0.43 y 0.42% , respectivamente).

Según Etienne y Berthouly (2002), el tiempo de inmersión, ya sea la duración o la frecuencia, es un parámetro decisivo para la eficiencia del SIT. Sin embargo, otros autores (Colmenares y Giménez, 2003) no encontraron mejoras significativas en el cultivo vinculadas a variaciones en el tiempo de inmersión. Aunque este aspecto no se examinó en esta Tesis, debe revisarse como un camino para mejorar aún más la micropropagación de estevia en sistemas de inmersión temporal.

Aunque el resultado de la prueba de ACP ha establecido la mejor combinación de factores (variedad, sustrato y sistema de cultivo) para obtener resultados óptimos, merece la pena señalar que nuestros resultados muestran que los explantos de estevia, independientemente de la variedad, poseyeron una notable capacidad para el cultivo *in vitro*, independientemente del sistema de cultivo o medio utilizado.

Como conclusión, en respuesta al conjunto de preguntas planteadas en la introducción de este capítulo, la eficiencia de la micropropagación de estevia podría mejorarse mediante el uso de sustratos y sistemas de cultivo alternativos sin ningún efecto negativo para el estado fisiológico de las plántulas, extensible para las dos

variedades probadas. Asimismo, se ha obtenido nueva e interesante información sobre la composición de macro y micronutrientes de las plántulas resultantes.

Como se ha indicado en la Introducción (Apartado 1.3.1.2.) existe un importante número de trabajos que estudian la acción de diferentes medios y balances de reguladores de crecimiento, generalmente auxinas y citoquininas, sobre el proceso de calogénesis tanto a partir de trozos de tallo como, principalmente, de hojas de estevia. En esta Tesis se utilizó el medio MS para la inducción y desarrollo de callos a semejanza de la gran mayoría de los estudios publicados donde se viene empleando este medio en estevia como también se ha indicado anteriormente. No obstante, algunos autores en la década de los años 80 (Lee y cols. 1982; Ferreira y Handro, 1987; 1988) usaron el medio de Linsmaier y Skoog (LS) (1965) tanto para la iniciación de callo a partir de discos de hoja, como para el cultivo de células de estevia, aunque en estos trabajos solo se indicaron descripciones cualitativas del aspecto de los callos obtenidos. Keshvari y cols. 2018 indujeron callos de estevia como paso previo al proceso de embriogénesis somática, usando también medio MS y, además, medio B5 (Gamborg y cols. 1976).

Del estudio detenido de estos y otros autores se ensayaron en la presente Tesis los reguladores y concentraciones indicados con los que se han obtenido un porcentaje medio de inducción de callo muy alto, 98.6%. Con máximo del 100% cuando al medio se le ha adicionado 2 mg l^{-1} tanto de BA como de ANA y un mínimo de 96.9 con la misma dosis de BA y 1 mg l^{-1} de ANA sin diferencias estadísticas entre el porcentaje obtenido en los cinco medios ensayados. El porcentaje medio de formación de callo también ha sido similar en los explantos de ambas variedades, 97.99% y 99.17% para Criolla y Morita respectivamente. Son resultados muy similares a los aportados por Bondarev y cols. 1998 donde concluyeron que cuando el medio contuvo 0.1 mg l^{-1} o más de ANA o 2,4-D y 0.05 de BA o kinetina se alcanzó el 100% de callo y muy superiores a los referenciados por Sairkar y cols. 2009 que indicaron como el mejor balance de reguladores 2 mg l^{-1} de 2,4D + 1 mg l^{-1} de kinetina con un 88% callos con las mejores características, seguido por el balance de 2 mg l^{-1} de 2,4-D sólo o en combinación con 1.5 mg l^{-1} de kinetina, con un 72%. Los peores resultados los encontraron con dosis inferiores a 1 mg l^{-1} de 2,4-D. Kumari y Chandra (2015) obtuvieron resultados similares, 85.5% de inducción de callo, cultivando discos de hoja

de estevia en medio con kinetina mas ácido indol acético (AIA) con concentraciones de 1.5 mg l^{-1} de cada uno de ellos. También Mathur y Shekhawat (2013) alcanzaron porcentajes elevados de inducción de callo a partir de discos de hoja 98, 100, 74.4 y 91.1% con las combinaciones en mg l^{-1} de 2 BA: 1 ANA; 2 BA: 2 ANA; 2 BA: 3 ANA y 3 BA: 3 ANA respectivamente. Asimismo Yücesan y cols. (2016) obtuvieron una buena inducción de callo, aunque no aportaron porcentajes, a partir de trozos de tallo en medio MS con kinetina y BA a concentraciones de 1 y 2 mg l^{-1} . Por otro lado, los porcentajes finales alcanzados en el presente trabajo lo fueron en un tiempo relativamente corto, 40 días, aunque ya a los 22 días se observó una callogénesis muy avanzada, tiempo algo superior al aportado por Keshvari y cols. (2018) que consideraron el mejor tratamiento para la inducción de callos el medio MS con 1 mg l^{-1} ANA + 1 mg l^{-1} BA con un tiempo mínimo para su formación de 18 días. Por su parte, Razavi y cols. (2019) evaluaron la formación de callos con fotoperiodo 16/8 (1000 lux) a los 40 días y reportaron que la combinación ANA/BA ($1:0.5 \text{ mg l}^{-1}$) fue significativamente ($p \leq 0.05$) más efectiva que otras combinaciones hormonales como: ANA/Kin, AIB/Kin, AIB/BA, 2,4-D/BA y 2,4-D/Kin. La mayor cantidad de callo se obtuvo en medio suplementado con 1.5 mg l^{-1} de ANA y 2 mg l^{-1} BA de con un peso fresco de 2.70 g.

La calidad de los callos obtenidos bajo iluminación, evaluada según la escala de Kryvenki y cols. 2008 que oscila entre 0 y 5, también fue muy elevada, siempre superior a 4.2 observado en el tratamiento con 2 mg l^{-1} de BA + 1 mg l^{-1} de ANA para explantos de Criolla y un máximo de 4.83 en el de 2 mg l^{-1} de BA y ANA en el caso de los de Morita, sin diferencias estadísticas entre los tratamientos ensayados como se ha indicado en las tablas 11 y 12. El cultivo, tanto de discos de hoja como de trozos de tallo de estevia para la obtención de callo, se ha venido haciendo en la práctica totalidad de los trabajos existentes en la bibliografía en condiciones de luz. Solamente Bondarev y cols. 1998, utilizaron la oscuridad para el proceso de callogénesis con unos resultados óptimos como ya se ha indicado. En consecuencia, en la presente Tesis se han ensayado las diferentes combinaciones de fitorreguladores propuestas tanto en condiciones de luz como de oscuridad. Los resultados aportados indican que los resultados en oscuridad fueron óptimos con un porcentaje del 100% de callo en ambas variedades y en todos los tratamientos ensayados (Tabla 9). Asimismo, la calidad del

callo fue superior (test de Student, $p \leq 0.05$) en condiciones de oscuridad frente a luz en los explantos de la variedad Criolla (4.97 y 4.48 respectivamente, valores medios de todos los tratamientos), mientras que no ocurrió lo mismo en el caso de la variedad Morita donde, aunque la calidad del callo fue máxima en oscuridad (5) frente a la de luz (4.68) no se encontraron diferencias estadísticas entre ambos valores. Este resultado abre las posibilidades, en el caso de estevia, a obtener un callo óptimo en condiciones de oscuridad con la consiguiente reducción del gasto energético (Figura 14b).

Según algunos autores (Bondarev y cols. 1998; Singh y cols. 2014) el peso fresco se considera un indicador óptimo del crecimiento del callo. En la presente Tesis el peso fresco del callo ocupó un rango entre los 0.18 g. de Morita en condiciones de luz en medio con 2 mg l^{-1} de BA y 1 mg l^{-1} de ANA y los 0.45 en esta misma variedad en el mismo medio pero en condiciones de oscuridad (tabla 13) demostrando de nuevo que la oscuridad indujo mejores callos que la luz, incluso con mayor efectividad que los propios medios utilizados. Esta afirmación queda reforzada al comparar los valores medios de pesos de todos los medios de cultivo, siempre superiores (test de Student, $p \leq 0.05$) en el caso de oscuridad (0.30 g) frente a luz (0.25 g) para callos de Criolla y 0.40 frente a 0.22 para los de Morita respectivamente, como asimismo se indicó en la citada tabla. Estos valores son similares a los aportados por Bondarev y cols. 1998 que obtuvieron en oscuridad callos con pesos frescos de 0.46 y 0.41 g usando una mezcla de 2 mg l^{-1} de ANA, 2 de BA y 4 mg l^{-1} de ANA combinados con 1 mg l^{-1} de BA respectivamente, reseñando que siempre que han incluido 2,4-D los pesos frescos han sido inferiores a 250 mg. La comparación entre el peso fresco del callo en ambas variedades unificando todos los tratamientos y condiciones de luz y oscuridad indicaron un mayor peso (test de Student $p \leq 0.05$) de la variedad Morita (0.32 g) que de Criolla (0.26). Es preciso reseñar que Keshvari y cols. 2018 obtuvieron mayores pesos frescos de callo, 1.2 g, partiendo de discos de hoja de estevia pero no cultivados en medio MS, sino en B5 suplementado con 1 mg l^{-1} de 2,4-D + 1 mg l^{-1} de BA.

En resumen, los resultados obtenidos muestran que tras 40 días de cultivo en las condiciones ensayadas se produjeron porcentajes de formación de callo cercanos al 100% independientemente de las condiciones de luz y oscuridad, mejores calidades de callo respecto a friabilidad y peso fresco en condiciones de oscuridad y en presencia de

ANA y la concentración más alta de Kinetina, con una ligera mejor respuesta en todos los parámetros medidos en los callos obtenidos de hojas de la variedad Morita.

2.6. Bibliografía

Abahmane, L. 2020. A comparative study between temporary immersion system and semi-solid cultures on shoot multiplication and plantlets production of two Moroccan date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties in vitro. *Notulae Scientia Biologicae* 12(2):277-288. DOI: 10.15835/nsb12210610

Ahmad N., Fazal H., Zamir R., Khalil S.A. and Abbasi B.H. 2011. Callogenesis and shoot organogenesis from flowers of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *Sugar Tech* 13:174–177.

Alvarenga S. y Salazar T. 2015. Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoni en sistemas de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales* 36 (3): 50-57.

Álvarez-Robles, M.J., López-Orenes, A., Ferrer, M. A. and Calderón A. A. 2016. Methanol elicits the accumulation of bioactive steviol glycosides and phenolics in *Stevia rebaudiana* shoot cultures. *Industrial Crops and Products* 87: 273–279

Aman N., Hadi F., Khalik S.A., Zamir R. and Ahmad N. 2013. Efficient regeneration for enhanced steviol glycosides production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *C R Biol* 336:486–492.

Ávalos García A. y Pérez-Urria E. 2009. Metabolitos secundarios en plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145. Universidad Complutense. Madrid.

Azcón-Bieto, J. (1983). Inhibition of Photosynthesis by Carbohydrates in Wheat Leaves. *Plant Physiology*, Vol. 73 (3): 681–686. <https://doi.org/10.1104/pp.73.3.681>

Benelli C. and De Carlo A. 2018. In vitro multiplication and growth improvement of *Olea europaea* L. cv Canino with temporary immersion system (Plantform™). *3 Biotech*, 8, 317. DOI: 10.1007/s13205-018-1346-4.

Bhojwani S.S. and Dantu P.K. 2013. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer, London. <http://dx.doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>

Bondarev N., Reshetnyak O., Nosov, A. 2002. Features of Development of *Stevia rebaudiana* Shoots Cultivated in the Roller Bioreactor and their Production of Steviol Glycosides. *Planta Medica*, 68, 759–762 (2002). DOI: 10.1055/s-2002-33809

Bondarev N.I., Nosov A.M., Kornienko A.V. 1998. Effects of exogenous growth regulators on callusogenesis and growth of cultured cells of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Russ J Plant Physiol* 45:888–892

Cantos M., Arroyo-García R., García J.L., Lara M., Morales R., López M.Á., Gallardo A.,

- Ocete C.A., Rodríguez Á., Valle J.M., Vaca R., González-Maestro M., Bánáti H. and Ocete R. 2017. Current distribution and characterization of the wild grapevine populations in Andalusia (Spain). *Comptes Rendus Biologies*, 340, 164–177. DOI: 10.1016/j.crvi.2017.01.004
- Casaccia J. y Álvarez E. 2006. Recomendaciones técnicas para una producción sustentable del Ka'a He'e (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) en el Paraguay. Manual Técnico No 8. Caacupé (Paraguay).
- Castro-González C. G., Sánchez-Segura L., Gómez-Merino F. C. and Bello-Bello, J. J. 2019. Exposure of stevia (*Stevia rebaudiana* B.) to silver nanoparticles in vitro: transport and accumulation. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10.
- Colmenares M. and Giménez C. 2003. Multiplicación in vitro *Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. *Revista Facultad de Agronomía (Caracas)*, 20, 468–477.
- Chakrabarty D., Dewir Y.H., Hahn E.J., Datta S.K. and Paek, K.Y. 2007. The dynamics of nutrient utilization and growth of apple root stock 'M9 EMLA' in temporary versus continuous immersion bioreactors. *Plant Growth Regul.*, 51, 11–19.
- Chatsudthipong V. and Muanprasat C. 2009. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & therapeutics*, 121, 41–54. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2008.09.007
- Chée R. and Pool R.M. 1987. Improved inorganic media constituents for in vitro shoot multiplication of *Vitis*. *Scientia Horticulturae (Amsterdam)*, 32, 85–95 (1987). DOI: 10.1016/0304-4238(87)90019-7
- Chée R. 1986. In vitro culture of *Vitis*: the effects of light spectrum, manganese sulfate and potassium iodide on morphogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 7, 121–134 (1986) DOI: 10.1007/BF00043036
- Das A., Gantait S. and Mandal, N. 2011. Micropropagation of an elite medicinal plant: stevia rebaudiana Bert. *Int. J. Agric. Res.* 6, 40–48.
- De Klerk G.J. and Wijnhoven F. 2005. Water retention capacity of tissue-cultured plants: Performance of leaves from in vitro germinated mungbean seedlings. *Propagation of Ornamental Plants*. 5, 14–18 (2005).
- Deng Z., Chu J., Wang Q. and Wang L. 2012. Effect of different carbon sources on the accumulation of carbohydrate, nutrient absorption and the survival rate of Chinese Ash (*Fraxinus mandshurica*) explants in vitro. *African Journal of Agricultural Research*, 7, 3111–3119. DOI: 10.5897/AJAR11.1870
- Dhindsa R.S. and Matowe W.W. 1981. Drought tolerance in two mosses: Correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*, 32, 79–91 (1981). DOI: 10.1093/jxb/32.1.79
- Dubois G.E. 2000. Non-nutritive sweeteners, in: Francis, F.J. (Ed.), *Encyclopedia of Food Science & Technology*. John Wiley & Sons, Inc, New York.

Dwivedi S., Alam A. and Shekhawat G. S. 2016. Antioxidant response of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Angiosperms; Asteraceae) during developing phase of suspension cell culture. *Plant Science Today* 3(2): 115-123. <http://dx.doi.org/10.14719/pst.2016.3.2.227>

Epstein E.1972. *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*. John Wiley & Sons, Inc, New York.

Esra U., Ozyigit Y. and Turgut K. 2015. The effect of different pollination methods on seed € yield and germination features in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Turk. Tarım. Araştırmalar Derg.* 2, 114–117

Etienne H. and Berthouly M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 69, 215–231 (2002). DOI: 10.1023/A:1015668610465

Ferreira C.M. and Handro W. 1988. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* through leaf explants from adult plants” *Planta Medica*, 54 (2): 157-160, 1988

Ferreira C.M. and Handro W. 1987. Some morphogenetic responses in leaf explants of *Stevia rebaudiana* cultured in vitro. *Revta brasil. Bot.* 10:113-116.

Franck N., Vaast P., Génard M. and Dauzat, J. 2006. Soluble sugars mediate sink feedback down-regulation of leaf photosynthesis in field-grown *Coffea arabica*. *Tree Physiol.* 26:517-525.

Fujiwara S., Minaka N., Iwahashi H., Someya J. and Nishikawa S. 1992. Genes for the large and small subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase constitute an operon on the plastosome of the marine haptophyte *Pleurochrysis carterae*. *Photosynthesis research* 34 (1) , pp.178-178

Gamborg O. L., Murashige T., Thorpe T. A. and Vasil I. K. 1976. Plant tissue culture media.”*In vitro*” 12: 473.

George E.F., Hall M.A., De Klerk G.J. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients, in: George, E.F., Hall, M.A., Klerk, G.-J. De (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer Netherlands, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-1-4020-5005-3_3

Gupta E., Purwar S., Sundaram S., Tripathi P. and Rai G. 2016. Stevioside and Rebaudioside A Predominant Ent-Kaurene Diterpene Glycosides of Therapeutic Potential: a Review. *Czech Journal of Food Sciences.* 34 (4): 281-299.

Hajihashemi S. and Ehsanpour A. 2013. Influence of exogenously applied paclobutrazol on some physiological traits and growth of *Stevia rebaudiana* under in vitro drought stress. *Biologia (Bratisl)*, 68, 414–420. DOI: 10.2478/s11756-013-0165-7

- Handro W. and Ferreira C.M. 1989. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii: Production of natural Sweeteners. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 7. Medicinal and aromatic Plants II* 8ed. By Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag Berlin.
- Harris R.E. and Mason E.B. 1983. Two machines for in vitro propagation of plants in liquid media. *Can. J. Plant Sci.* 63: 311-316.
- Hazarika B. N. 2006. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. *Sci Hort* 108: 105–120.
- Hossain M., Shamim Kabir A., Jahan T., Hasan M. 2008. Micropropagation of Stevia. *International Journal of Sustainable Crop Production*, 3, 1–9.
- Hossain Z., López -Climent M.F., Arbona V., Pérez-Clemente R.M. and Gómez-Cadenas A. 2009. Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage *Journal of Plant Physiology* 166(13): 1391-1404.
- Hu M., Shi Z., Zhang Z., Zhang, Y. and Li H. 2012. Effects of exogenous glucose on seed germination and antioxidant capacity in wheat seedlings under salt stress. *Plant Growth Regulation* vol 68 (2). 177: 188. DOI 10.1007/s10725-012-9705-3
- Ibrahim I.A., Nasr M.I., Mohammed B.R., El-Zefzafi M.M. 2008a. Plant growth regulators affecting in vitro cultivation of *Stevia rebaudiana*. *Sugar Tech*, 10, 254–259. DOI: 10.1007/s12355-008-0045-6
- Ibrahim I.A., Nasr M.I., Mohammed B.R., El-Zefzafi, M.M.: Nutrient factors affecting in vitro cultivation of *Stevia rebaudiana*. *Sugar Tech*, 10, 248–253 (2008b). DOI: 10.1007/s12355-008-0044-7
- Imtiaz S., Sarim F.M. and Khalil S.A. 2020. Comparison of various explants on callogenesis in *Stevia Rebaudiana*. *Bioscience Research* 17 (3): 1858-1864.
- Isah T. 2022. In vitro rejuvenation of nodal segment explants for clonal propagation of *Rauvolfia serpentina* (L). Benth ex Kurz. *Plants*, 11
- Ivanova M., Van Staden J. 2009. Nitrogen source, concentration, and NH₄⁺:NO₃⁻ ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 99, 167–174. DOI: 10.1007/s11240-009-9589-8
- Jain P., Kachhwaha S. and Kothari, S. L. 2014. Chloroplast ultra structure, photosynthesis and enzyme activities in regenerated plants of *Stevia rebaudiana* (Bert.) as influenced by copper sulphate in the medium, 52 (September), 898–904.
- Javed R., Yucesan B. and Gurel E. 2017. Differential effects of plant growth regulators on physiology, steviol glycosides content, and antioxidant capacity in micropropagated tissues of *Stevia rebaudiana*. *Biologia* 72/10:1156-1165.

Jo, E.A., Kumar R.T., Hahn E. J., Paek K. 2009. In vitro sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 96:307-315.

Keshvari T., Najaphy A., Kahrizi D. and Zebarjadi A. 2018. Callus induction and somatic embryogenesis in *Stevia* as a medicinal plant. *Cellular and Molecular Biology.* 46-49. <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2018.64.2.9>

Khalil S.A., Zamir R. and Ahmad N. 2014. Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21, 566–573. DOI: 10.1016/j.sjbs.2014.02.005

Kobayashi N.I., Saito T., Iwata N., Ohmae Y., Iwata R., Tanoi K. and Nakanishi, T.M.. 2013. Leaf senescence in rice due to magnesium deficiency mediated defect in transpiration rate before sugar accumulation and chlorosis. *Physiol. Plant.* 148, 490-501.

Kryvenki M., Kosky R. G., Guerrero D., Domínguez M. y Reyes, M. 2008. Obtención de callos con estructuras embriogénicas de *Stevia rebaudiana* Bert. en medios de cultivo semisólidos. *Biotecnología Vegetal*, 8(2), 91–98.

Kumar M. S.; Kumara S.M.; Kumar M.S., Lokesh P., Balasubramanya S. and Anuradha M. 2015. Analgesic, Anti-inflammatory, Anti-lipoxygenase Activity and Characterization of Three Bioactive Compounds in the Most Active Fraction of *Leptadenia reticulata* (Retz.) Wight & Arn. - A Valuable Medicinal Plant. *IRANIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL RESEARCH.* Vol 14 (3) 933-942.

Kumari, M. and Chandra, S. 2015. Stevioside glycosides from in vitro cultures of *Stevia rebaudiana* and antimicrobial assay. *Barz. J. Bot* 38 (4):761-770.

Kuria P., Demo P., Nyende A.B. and Kahangi E.M. 2008. Cassava starch as an alternative cheap gelling agent for the in vitro micro-propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 7, 301–307. DOI: 10.5897/AJB07.389

Lee K.R., Park J.R., Choi B.S., Han J.S., Oh Sang L. and Yamada Y. 1982. Studies on the callus culture of *Stevia* as a new sweetening source and formation of stevioside. *Hanguk Sikp, um Kwahakhoe Chi Korean* 14 (2): 179–183.

Leonard S, Uchendu E., Traber M. and Reed, B. 2010. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. *Plant Cell Rep* 29:25–35.

Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148:350-382.

Linsmaier E.M. and Skoog, F. (LS). 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18:100-127.

Lucho, S.R., do Amaral, M.N., Lopez-Orenes, A., Kleinowski, A.M., do Amarante, L., Ferrer, M.A., Calderón, A.A. and Braga, E.J.B. 2019. Plant Growth Regulators as Potential Elicitors to Increase the Contents of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity in Stevia Plants. *Sugar Tech* 21(4):696–702.

Lyakhovkin A.G., Long T.D., Titov D.A. and Anh M.P. 1993. Cultivation and utilization of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Agricultural Publishing House, Hanoi.

Magangana T.P., Stander M.A. and Makunga N.P. 2018. Effect of nitrogen and phosphate on in vitro growth and metabolite profiles of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 134, 141–151. DOI: 10.1007/s11240-018-1407-8

Mali A.B., Joshi M. and Kulkarni V. 2015. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of *Stevia rebaudiana* Leaves. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4, 678–685.

Mathur S. and Shekhawat G.S. 2013. Establishment and characterization of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) cell suspension culture: an in vitro approach for production of stevioside. *Acta Physiol Plant* 35(3), pp.931-939. doi.10.1007/s11738-012-1136-2.

Megeji N.W., Kumar J.K., Singh V., Kaul V.K. and Ahuja P.S. 2005. Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. *Current Science*, 88, 801–804.

Mohammadi-Sichani M., Karbasizadeh V., Aghai F. and Mofid M.R. 2012. Effect of different extracts of *Stevia rebaudiana* leaves on *Streptococcus mutans* growth. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 4731–4734. DOI: 10.5897/JMPR11.1622

Murashige T. and Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Natali R Mustafa N.R., Ward de Winter W., Frank van Iren F. and Robert Verpoorte R. 2011. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature protocols* 6 (6): 715-742.

Orona-Tamayo D., Valverde M.E., Paredes-López O. 2019. Bioactive peptides from selected latin american food crops – A nutraceutical and molecular approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 1949–1975. DOI:10.1080/10408398.2018.1434480.

Pandey S. 2018. Morphology, chemical composition and therapeutic potential of *Stevia rebaudiana*. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, 05, 2260–2266. DOI: 10.5281/zenodo.1217075

Pierik R.L.M.1987. In Vitro Culture of Higher Plants. Springer Netherlands, Dordrecht (1987).DOI: 10.1007/978-94-009-3621-8

Posada L., Yenny, Padrón G., Romelio, Gonzalez J., Rodríguez R., Norman O., R.B. Barbón R. and Kosky R. 2015. Effects of different culture conditions (photoautotrophic, photomixotrophic) and the auxin indole-butyric acid on the in vitro acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Red Maradol) plants using zeolite as support. African Journal of Biotechnology, 14(35), 2622–2635. <http://doi.org/10.5897/AJB2015.14814>

Radić S., Vujčić V., Glogoški M., Radić-Stojković M. 2016. Influence of pH and plant growth regulators on secondary metabolite production and antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* (Bert). Periodicum Biologorum, 118, 9–19. DOI: 10.18054/pb.2016.118.1.3420

Ramírez-Mosqueda M.A., Iglesias-Andreu L.G., Ramírez-Madero G. and Hernández-Rincón E.U. 2016. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. in temporary immersion systems and evaluation of genetic fidelity. South African Journal of Botany, 106, 238–243. DOI: 10.1016/j.sajb.2016.07.015

Rathore S., Singh N., Singh S.K. 2013.Role of sucrose and season on rapid in vitro regeneration for two *Stevia* genotypes. Global Journal of Bioscience and Biotechnology, 2, 150–153.

Razavi S. M., Zahri F. and Abedini, M. 2019. Tissue Culture and Production of Volatile Secondary Metabolites from Callus of *Stevia rebaudiana* at Different Combination of Plant Growth Regulators. Journal of Plant Process and Function, 7(28), 51–60.

Redondo-Gómez S., Mateos-Naranjo E., Davy A.J., Fernandez-Muñoz F., Castellanos E.M., Luque T. and Figueroa M.E. 2007. Growth and Photosynthetic Responses to Salinity of the Salt-marsh Shrub *Atriplex portulacoides*. Annals of Botany, 100, 555–563.. DOI: 10.1093/aob/mcm119.

Sacco, E., Mascarello, C., Pamato, M., Musso, V., Ruffoni, B. 2015. Evaluation of temporary immersion system for in vitro propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Acta Horticulturae 1083, 327–334.

Samanta T., Kotamreddy J.N.R., Ghosh B.C. and Mitra A. 2017. Changes in targeted metabolites, enzyme activities and transcripts at different developmental stages of tea leaves: a study for understanding the biochemical basis of tea shoot plucking. Acta Physiol Plant 39:11. DOI:10.1007/s11738-016-2298-0

Sairkar P., Chandravanshi M. K., Shukla N. P. and Mehrotra N. N. 2009. Mass production of an economically important medicinal plant *Stevia rebaudiana* using in vitro propagation techniques. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 3(4): 266-270.

Shahzad A., Shaheen A., M. Kozgar M.I., Sahai A. and Sharma S. 2013. Phytoactive Compounds from In Vitro Derived Tissues. M. Shahid y cols. (eds.), Recent Trends in

Biotechnology and Therapeutic 1 Applications of Medicinal Plants. DOI 10.1007/978-94-007-6603-7_1, Springer Science+Business Media Dordrecht

Sharma N., Gauchan D.P., Dhakal A., Luitel A., Shakya S. and Shakya R. 2015. Establishment of Regenerative Callus, Cell Suspension System and Molecular Characterization of *Stevia Rebaudiana* Bertoni for the Production of Stevioside in In Vitro. International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology (IJRASET). Vol 3. III. 133-143.

Souza R., Rodrigues L.; Bernardes, L. E., Santos Barbeta, M. F., Silva da Veiga M. and Andreia M. 2019. Iron oxide nanoparticle phytotoxicity to the aquatic plant Lemna minor: effect on reactive oxygen species (ROS) production and chlorophyll a/chlorophyll b ratio. ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH.VL 26 (23): 24121-24131.

Seon J., Cui Y., Kozait T. and Paek K. 2000. Influence of in vitro growth conditions on photosynthetic competence and survival ration of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. Plant Cell Tissue Organ Cult. 64: 135-142.

Singh P; Dwivedi P. and Atri, N. 2014. In Vitro Shoot Multiplication of Stevia and Assessment of Stevioside Content and Genetic Fidelity of the Regenerants. Sugar Tech 16 (4): 430-439.

Sivaram L., Mukundan U. 2003. In vitro culture studies on Stevia rebaudiana. In Vitro Cell Development Biology Plant, 39, 520–523 (2003).DOI:10.1079/IVP2003438

Sofa A., Dichio B., Xiloyannis C. and Masia A. 2004. Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. Plant Science, 166(2), 293–302. DOI 10.1007/s11356-019-05713-x

Sugiura A., Tao R., Murayama H. and Tomana T. 1986. In vitro propagation of Japanese persimmon. HortScience 21, 1205–1207.

Tallón C.I., Porras I. and Pérez-Tornero O. 2012. Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators. In Vitro Cell Development Biology - Plant, 48, 488–499 (2012). DOI: 10.1007/s11627-012-9457-9

Tavares A.R., Kanashiro S., Jocys T., Ribeiro R.C.S. and Gonçalves A.N. 2014. Effect of potassium on the contents of micronutrients on in vitro culture of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). Acta Horticulturariae, 201–206. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1025.29>

Thiyagarajan M. and Venkatachalam P. 2012. Large scale in vitro propagation of Stevia rebaudiana (Bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. Industrial Crops Production, 37, 111–117. DOI: j.indcrop.2011.10.037

Troncoso A., Villegas A., Mazuelos, C. and Cantos M. 1990. Growth and mineral composition of grape-vine rootstock cultured in vitro with different levels of ammonium nitrate, in: van Beusichem, M.L. (Ed.), Plant Nutrition — Physiology and Applications. Springer Netherlands, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-94-009-0585-6_110

Vidal N. and Suárez C. 2019. Use of bioreactor systems in the propagation of forest trees. Eng Life Sci. 2019;19:896–915.

Vilariño S, Florido M.C., García J.L. and Cantos M. 2021. Nutritional Status of Micropropagated Plantlets of Two Varieties of *Stevia rebaudiana* Bert. under Different Culture Conditions. Int J Environ Sci Nat Res. 29(2): 556263. DOI:10.19080/IJESNR.2021.29.556263

Villegas A., Mazuelos C., Troncoso A. 1992. Influence of N-NO₃ and N-NH₄ on the mineral composition of grape-vine rootstocks cultured in vitro. Acta Horticulturae, 119–122. DOI: 10.17660/ActaHortic.1992.300.13

Vives K., Andújar I., Lorenzo J.C., Concepción O., Hernández M., Escalona M. 2017. Comparison of different in vitro micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor (BIT®). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 131, 195–199. DOI: 10.1007/s11240-017-1258-8

Waters B.M. 2011. Moving magnesium in plant cells. New Phytol. 190, 510-513.

Welander M. 2011. Teknisk utveckling av bioreaktorer för storskalig mikroförökning. slutredovisning av partnerskapsprojekt 2008-2010. Alnarp.

Welander M., Persson J., Asp H. and Zhu, L.H. 2014. Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. Scientia Horticulturae, 179, (24): 227-232.

Wiszniewska A., Muszyńska E., Hanus-Fajerska E., Smoleń S., Dziurka M. and Dziurka K. 2017. Organic amendments enhance Pb tolerance and accumulation during micropropagation of *Daphne jasminea*. Environmental Science and Pollution Research, 24, 2421–2432. DOI: 10.1007/s11356-016-7977-2

Wong S.H., Knight J.A., Hopfer S.M., Zaharia O., Leach Ch.N.Jr. and Sunderman W.Jr. 1987. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. Clinical Chemistry 32(2): 214-220.

Yücesan B., Buyukgocmen R., Mohammed A., Sameeullah, M., Altug C. Gurel, S. and Gurel E. 2016. An efficient regeneration system and steviol glycoside analysis of *Stevia rebaudiana* Bertoni, a source of natural high-intensity sweetener. In vitro cellular & developmental biology-PLANT 52:330-337.

Zawadzka, M. and Orlikowska, T. 2006. The influence of FeEDDHA in red raspberry cultures during shoot multiplication and adventitious regeneration from leaf explants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 85, 145–149.

Capítulo 3

**Uso de elicitors para incrementar la
producción *in vitro* de metabolitos
secundarios de *Stevia rebaudiana*
cultivada en sistema sólido y
biorreactor**

3. Capítulo 3. Uso de elicitores para incrementar la producción *in vitro* de metabolitos secundarios de *Stevia rebaudiana* cultivada en sistema sólido y biorreactor.

3.1. Introducción

3.1.1. Elicitación

Como ya se ha indicado, los elicitores son los compuestos químicos que pueden estimular las respuestas al estrés en las plantas, potenciando una mayor síntesis y acumulación de metabolitos secundarios.

Durante las últimas décadas se han venido utilizando una amplia variedad de sistemas *in vitro* para la inducción de metabolitos secundarios mediante elicitores. En una revisión reciente llevada a cabo por Niazian y Sabbatini (2021) se citan hasta 7 tipos de explantos capaces de generar metabolitos secundarios cubriendo prácticamente todos los órganos, tejidos y células vegetales, lo que indica la alta capacidad de la planta para la producción de estas sustancias si se cultivan en las condiciones adecuadas. Aunque el cultivo *in vitro* de células y raíces transformadas con *Agrobacterium* ha venido siendo el más utilizado para la obtención de metabolitos secundarios (Giri y Zaheer, 2016), más recientemente los autores ya citados, Niazian y Sabbatini (2021), señalan que para la producción de metabolitos secundarios en plantas medicinales, aromáticas y ornamentales se usan principalmente el cultivo de callos y brotes como fuentes de explantos, seguidos de cultivo celular y raíces transformadas (Figura 16).

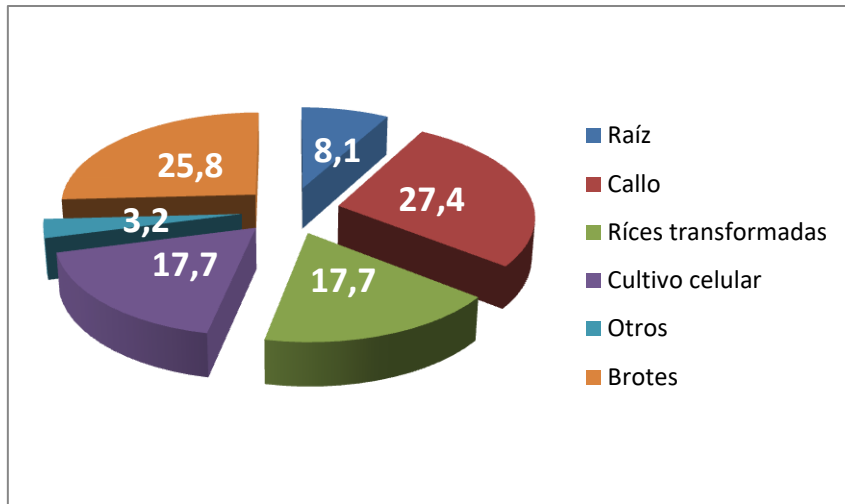


Figura 16.- Frecuencia general del uso de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* utilizados en experimentos de elicitación para la producción de metabolitos secundarios. (Niazian y Sabbatini, 2021).

Como también se ha indicado los elicitores se pueden clasificar en bióticos y abióticos, los bióticos tienen un origen natural e incluyen polisacáridos, quitina y pectina, bien producidos por patógenos como *Pseudomonas putida*, *Bacillus polymixa*, *Azobacter chroococcum* (Basharat y cols. 2021) o por la misma planta. Las fitohormonas se consideran elicitores bióticos siendo los jasmonatos (JA), el ácido salicílico (SA) y el ácido giberélico (GA) los más usados por su eficacia (Nabi y cols. 2021). Estos autores indican que tanto JA como SA son moléculas señalizadoras primarias usadas en la planta como defensa como respuesta a los daños causados por ataques de patógenos o herbívoros. La elicitación con ambas fitohormonas es responsable de la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS, de Reactive Oxygen Species). Esta generación de ROS en la planta por la acción de JA y SA se debe a la disrupción de la homeostasis celular. Cuando los niveles de ROS exceden los mecanismos de defensa, se podría decir que la célula se encuentra en un estado de estrés oxidativo. Aunque todas las ROS a altas concentraciones son extremadamente dañinas para organismos, cuando se encuentran en concentraciones bajas actúan como mensajeros secundarios en una amplia variedad de procesos celulares incluyendo la tolerancia a estreses medioambientales ya citada.

La mejora de la respuesta a estrés salino utilizando el ácido salicílico y su influencia en la germinación fue reportada con anterioridad. Bouallègue y cols. 2019 describen como el tratamiento con ácido salicílico (0.1 mM) tuvo efectos beneficiosos sobre el porcentaje de germinación en altas concentraciones de sal. Este tratamiento

redujo el efecto inhibitorio del estrés salino sobre el porcentaje de germinación de semillas de lenteja, y además indujo la elongación de la raíz primaria.

La respuesta de un sistema *in vitro* a los elicitores depende de varios factores como la concentración de elicitores. Zafar y cols. 2017, encontraron que una concentración de 0.15 mM de $AlCl_3$ añadida a un medio de cultivo de callo de hojas de *Rauvolfia serpentina*, no solo mejoró la producción de reserpina, alcaloide utilizado para el control de la hipertensión, sino que también aumentó la biomasa del callo. Otro factor importante es la edad del subcultivo, aunque depende en gran medida del tipo de material vegetal utilizado. Así para cultivo de raíces transformadas genéticamente de *Withania somnifera* tratados con metil jasmonato (MeJA) y SA, Sivanandhan y cols. (2013), señalaron como edad idónea 40 días para obtener las mayores concentraciones de metabolitos secundarios de uso común en la medicina tradicional india. Algún tiempo menor, 20 días, determinaron Namdeo y cols. (2002) como óptimo en el cultivo celular de *Cataranthus roseus* para producir ajmalicina, alcaloide también usado por su actividad antihipertensiva. La composición del medio de cultivo también juega un papel fundamental para los procesos de elicitación. Generalmente los medios más usados en este ámbito, según Nabi y cols. 2021, son MS, ARM (Anderson Rhododendron Medium), B5 y MMT (Murashige-Tucker Medium). Niazian y Sabbatini, 2021, destacaron al medio MS como el más usado (92% de los trabajos referenciados) seguido muy de lejos del B5 con un 6.7% de uso. Para finalizar, el tiempo de permanencia en contacto con el elicitores también puede ser destacable, aunque en la mayor parte de los ensayos publicados usando la técnica de cultivo *in vitro*, al estar incluido el elicitores en el medio de cultivo el tiempo de contacto suele ser función de la producción del metabolito buscado.

El ácido jasmónico y sus derivados se conocen colectivamente como jasmonatos (JA) (Ho y cols. 2020). La biosíntesis de JA ocurre en el plasto, peroxisoma y citoplasma por la acción de varios enzimas. El ácido linolénico, precursor del JA se libera en la membrana plastidial por activación de las fosfolipasas debido al estrés. Este estrés provoca que el JA se transforme en MeJA por la sustitución de un H del ácido jasmónico por un grupo metilo. Siendo el producto final el jasminol isoleucina que es la forma bioactiva del JA presente en bajas concentraciones en el citoplasma (Ho y cols. 2020, Nabi et al., 2021. Figuras 17 y 18).

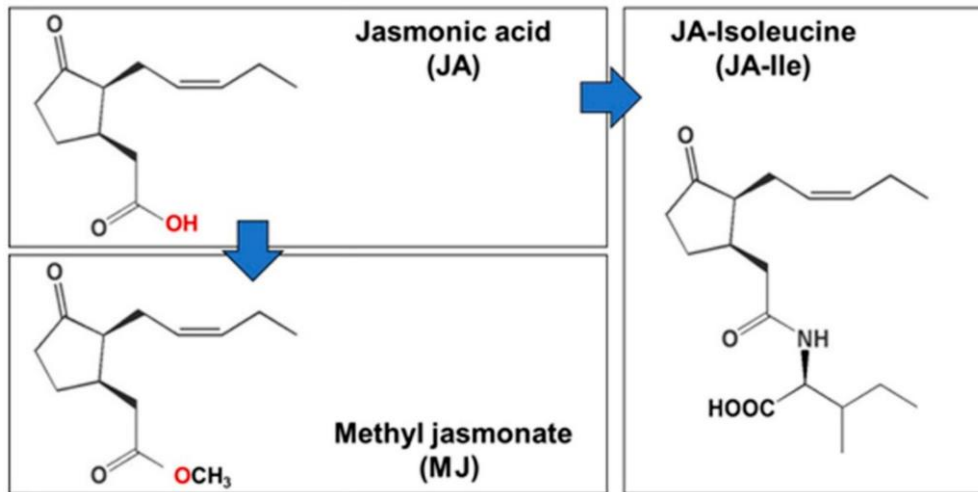


Figura 17.- Ácido jasmónico y metil jasmonato (De Ho y cols. 2020).

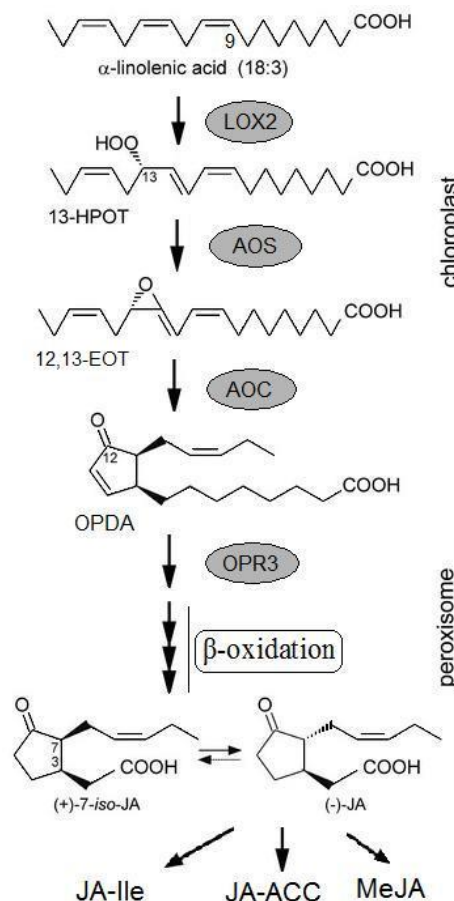


Figura 18.- Esquema de la ruta de biosíntesis de Jasmonatos en *A. thaliana* (De Delker y cols. 2006). : LOX2: lipoxigenasa 2, AOS: aleno oxido sintasa, AOC: alleno oxido ciclasa, and OPR3: 12-oxofitodienoato reductasa 3; 13-HPOT: ácido 13S-hidroperoxi-9Z,11E,15Z-octadecatrienoico, 12,13-EOT: ácido 12,13-epoxioctadecatrienoico, OPDA: ácido 12-oxofitodienoico, JA: jasmonatos, JA-Ile: jasmonoyl-isoleucina, JA-ACC: ácido jasmonoyl-1-amino-1-ciclopropano carboxílico, y MeJA.

Como se viene exponiendo, se conoce que el ácido jasmónico (JA) y sus precursores participan en muchos procesos fisiológicos en el crecimiento de las plantas, y especialmente son intermediarios de las respuestas de éstas al estrés biótico y abiótico. En consecuencia, la aplicación exógena de jasmonatos se viene utilizando ampliamente como elicitores en nuevas técnicas para la hiperacumulación de metabolitos secundarios como elicitación dentro de sistemas de cultivo *in vitro* (Giri y Zaheer, 2016). Kaminska (2021) citó hasta 21 tipos de explantos capaces de generar metabolitos secundarios usando jasmonatos. El proceso de elicitación conduce a una interconexión entre jasmonatos y sus receptores presentes en la membrana plasmática, lo que acarrea una serie de respuestas de defensa de las células, incluida la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) e inducción de enzimas de protección frente al estrés oxidativo. Esto también conduce a la síntesis y acumulación de moléculas señalizadoras y la consiguiente regulación de la expresión génica implicada en la producción de metabolitos secundarios. El metil jasmonato (MeJA) es el elicitador más utilizado, ya que produce una acusada acumulación de metabolitos en cultivos de células y órganos vegetales (Thakur y cols. 2019). Giri y Zaheer, 2016 notificaron que el MeJA fue el elicitador químico más utilizado (60% de los trabajos) en el sistema de cultivo *in vitro*, seguido de SA y JA (aproximadamente 15 y 10%, respectivamente). Por todo ello, se ha encontrado en la bibliografía un número muy amplio de trabajos (Thakur y cols. 2019) donde se utiliza el MeJA para la obtención de un extenso número de metabolitos secundarios como antocianinas, estilbeno y resveratrol (Zhang y cols. 2002; Curtin y cols. 2003; Xu y cols. 2015; Taurino y cols. 2015) y otros compuestos fenólicos de interés, tanto medicinal como industrial (Mendoza y cols. 2018 y Sellapan y cols. 2018).

3.1.1.1 Elicitación en plantas micropropagadas

Varios autores han usado los brotes como material de partida en los trabajos de obtención *in vitro* de metabolitos mediada por elicitores (Figura 16). Así Zaheer y Giri, (2015) obtuvieron 3.4 veces más de andrografólido, diterpeno de interés en investigación sobre señalización celular y tratamiento de algunas enfermedades, de brotes de *Andrographis paniculata* en medio MS con adición de 20 μ M de SA y JA.

Asimismo, Wungsintaweekul y cols. (2012), obtuvieron 3 veces más del opioide mitraginina a partir de brotes de *Mitragyna speciosa* usando el medio WPM (McCown Woody Plant medium) con 10 μM de MeJA. Coste y cols. (2011) cultivaron brotes de varias especies del género *Hypericum* en medio MS con adición de SA y MeJA (50 μM) y multiplicaron por más de 13 la producción de derivados de la floruglucina usada en fármacos para paliar enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

Respecto a estevia, con el fin de mejorar el contenido de metabolitos secundarios en plantas micropropagadas, Bayraktar y cols. (2016) cultivaron explantos nodales en medio WPM que contenía como elicitores alginato, hidrolizado de caseína, pectina, extracto de levadura, MeJA, SA o quitosano con el objetivo de aumentar el contenido de esteviósido y rebaudiósido A. Las plantas obtenidas presentaron un buen desarrollo tanto aéreo como radicular y, de acuerdo con los resultados de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), los tratamientos con alginato y extracto de levadura, aumentaron la producción de esteviósido en comparación con el control, mientras que el rebaudiósido A aumentó en plantas tratadas solamente con alginato. Para examinar si se mejora la producción de metabolitos secundarios en plantas de estevia micropropagadas, Moharramnejad y cols. 2019, cultivaron microplantas también en medio WPM gelificado y suplementado por separado con MeJA y SA. Los máximos de crecimiento de los brotes, regeneración de las raíces y acumulación de biomasa fresca y seca se obtuvieron con 50 μM de SA. Las actividades y niveles más altos de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos se observaron con 100 μM de SA. Los análisis mediante HPLC mostraron que las aportaciones de 50 μM de MeJA y 100 μM de SA mejoraron la producción de esteviósido. Rasouli y cols. 2021 examinaron el efecto del quitosano, extracto de levadura y MeJA añadido a medio MS suplementado con 2 mg l^{-1} de BA, sobre la multiplicación de brotes *in vitro* y el contenido de glicósidos de estevia. Los resultados mostraron que todos los elicitores aumentaron significativamente la multiplicación de brotes en comparación con el medio basal solo. El contenido total de glicósidos aumentó con la adición de 100 mg l^{-1} de MeJA, 200 mg l^{-1} de quitosano y 50 mg l^{-1} de extracto de levadura en un 60%, 44% y 40%, respectivamente. Las concentraciones de esteviósido y rebaudiósido A aumentaron con la adición de las concentraciones citadas de MeJA y quitosano. Además, estos elicitores mejoraron significativamente la relación rebaudiósido

A/esteviósido. Algunos autores usaron como método de elicitación la eliminación de algunos nutrientes básicos del medio de cultivo induciendo un estrés nutricional. Ahmad y cols. 2021 eliminaron el Ca y el Mg del medio MS y obtuvieron un incremento tanto en crecimiento, como en los contenidos de glucósidos de esteviol, de antioxidantes no enzimáticos, de fenoles y flavonoides totales, de capacidad antioxidante y poder reductores totales, así como en la actividad de captación de radicales libres DPPH en comparación con el tratamiento de control. Las cantidades significativamente más altas de rebaudiósido A y esteviósido las obtuvieron en un medio con solo deficiencia de Ca.

Por otro lado, la micropropagación, ofrece la posibilidad de controlar todas la variables implicadas, por lo que permite estudiar el efecto de un único factor en el desarrollo de la planta micropropagada. Por lo tanto, es un sistema óptimo para confirmar como un determinado elicitor actúa sobre la evolución de la planta elicitada, permitiendo comprobar la incorporación del mismo desde el medio, sus efectos sobre el desarrollo de la planta o, incluso, la inducción interna de los propios elicitores además del principal objetivo es decir, la exudación de metabolitos al medio de cultivo.

3.1.1.2 Elicitación en callo

El cultivo *in vitro* de callo con elicitores es la estrategia más utilizada para la obtención *in vitro* de metabolitos (Figura 16). Las publicaciones sobre el tema hacen mención a varios avances en la obtención de sustancias de interés, entre ellas el ácido betulínico producido a partir de callos de diferentes especies del género *Ocimum* usando medio MS con 200 μM de MeJA (Pandey y cols. 2015). El uso de MeJA (10-40 μM) con medio MS más 2,4-D y kinetina incrementó la tasa de crecimiento de callo de *Dianthus caryophyllus* para obtención de aceites esenciales (eugenol) (Matter y cols. 2017). Ram y cols. (2013) cultivaron callos de *Rosa hybrida* con MeJA (0.5 μM) y salicílico en medio EM (Yamamoto y cols. 1989) con buenos resultados en la obtención de antocianina. Por otro lado, Pi y cols. (2010) cultivaron callos de *Camptotheca acuminata* usando SA (100 μM) junto a MeJA y metales pesados en medio MS y lograron aumentar hasta 25 veces la producción de camptotecina, sustancia con acción

antitumoral. De estos trabajos se desprende que el uso del medio de cultivo MS con MeJA y SA viene siendo el más frecuente en el cultivo de callos para producción de metabolitos secundarios.

El proceso de elicitación también se ha usado en callos obtenidos de trozos de hojas de estevia para determinar el efecto del ácido salicílico y MeJA (10 y 100 mM de ambos), sobre la síntesis de esteviósidos concluyendo que los callos cultivados a 28° C con 100 mM de ácido salicílico aumentaron la producción de esteviósido en 9.8 veces en comparación con las hojas de plantas cultivadas en condiciones de invernadero (Mejía-Espejel y cols. 2018). La concentración de rebaudiósido A exhibió los valores más altos (34.6 veces más altos que en las hojas) al aplicar 10 mM de ácido salicílico. Golkar y cols. (2019), estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de ácido salicílico (0.25, 0.5 y 0.75 mg^l⁻¹) y nanopartículas de plata (Ag NP) (15, 30, 45 y 60 mg^l⁻¹) en medio MS sobre el crecimiento de callos así como la posibilidad de producción de glicósidos de esteviol. La concentración de 0.75 mg^l⁻¹ de SA indujo la mayor tasa de crecimiento del callo (0.1 cm/día). Asimismo, la dosis de 45 mg^l⁻¹ de AgNP condujo a la mayor cantidad de esteviósido (32.34 mgg⁻¹ de peso seco de callo) y la de 0.25 mg^l⁻¹ de SA produjo de la mayor cantidad de rebaudiósido A (3.40 mgg⁻¹ de peso seco de callo).

3.1.1.3 Cultivo celular

Como se ha indicado en la Figura 16 los cultivos celulares, aunque con sus limitaciones, se han utilizado en aproximadamente el 18% de trabajos sobre obtención de metabolitos secundarios mediante cultivo *in vitro* con el concurso de elicitors (Niazian y Sabbatini, 2021). Recientemente Cai y cols. (2017) utilizando cultivos celulares de *Changium smyrnioides* en medio MS con MeJA (100 μM), multiplicaron por 40 la producción de xantotoxina y bergapteno, furanocumarinas de uso en enfermedades cutáneas. La capsaicina es una oleorresina de sabor picante que producen las plantas del género *Capsicum* para alejar a los herbívoros y que tiene aplicación, tanto alimentaria como analgésica y anticancerígena. La producción de esta sustancia se ha multiplicado 3.7 veces a partir de cultivos celulares de *Capsicum chinense* en medio MS con 100 μM de SA (Kehie y cols. 2016). La máxima producción de flavonoides se obtuvo por Ali y cols. (2015) cultivando suspensiones celulares de

Artemisia absinthium en medio MS con 5 μM de MeJA y JA. Gumerova y cols. (2015) encontraron que el MeJA en concentraciones bajas (0.01 y 0.1 μM) en medio B5 con 2,4-D, AIA, ANA y kinetina produjo mayor acumulación mayor biomasa en cultivos celulares de *Fagopyrum tataricum* pero la embriogénesis somática resultó inhibida después de la transferencia a un medio libre de reguladores. La producción de tebaína, alcaloide presente en el opio y químicamente similar a la codeína y morfina, se multiplicó por 45 cuando se cultivaron suspensiones celulares de *Papaver bracteatum* en medio MS con MeJA (100 μM) (Zare y cols. 2014). En estos trabajos se observa que el medio MS con, adición en la mayoría de los casos de MeJA, es de uso muy frecuente en la producción de metabolitos en cultivos celulares.

A pesar de este relativamente alto número de trabajos sobre elicitación usando cultivos celulares de diferentes especies, sorprendentemente no se han encontrado prácticamente referencias sobre el uso de elicitores en cultivos celulares de estevia. Solamente se cuenta con una bibliografía relativamente antigua, concretamente Striedner y cols. (1991), que usaron ácido giberélico (GA_3) en medio MS para cultivar suspensiones celulares con una rápida producción de esteviósido, que se detectó un día después de la adición de la giberelina y alcanzó su concentración máxima después de una semana. Sin embargo, cuando utilizaron el medio sin GA_3 el esteviósido tardó de dos a siete semanas en producirse y en mucha menos concentración que otros metabolitos secundarios

3.1.2. Caracterización de los metabolitos secundarios obtenidos.

Existen diferentes metodologías de análisis para la detección, identificación y cuantificación de los compuestos obtenidos con el uso de elicitores. Las determinaciones más básicas están basadas principalmente en cambios en la absorbancia del extracto por la adición de un reactivo específico y suelen presentar una baja selectividad ya que son varias las familias de compuestos que contribuyen a la señal monitorizada; por lo que no se puede obtener información individual de los compuestos presentes en el extracto. Se requiere en todos los casos realizar una recta

de calibrado con un único patrón genérico para todos los compuestos que relacione la absorbancia con la concentración de los compuestos.

Algunas de estas metodologías proporcionan el contenido total en la muestra de una familia de compuestos concreta, como por ejemplo, en el caso de la presente Tesis, fenoles. El método de Folin-Ciocalteu (F-C) se utiliza para determinar la cantidad total de antioxidantes fenólicos en compuestos vegetales. Se basa en la capacidad de los compuestos fenólicos de reaccionar con el reactivo F-C a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico. El ácido fosfomolibotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que se mide para evaluar el contenido de polifenoles. El mecanismo de acción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse asimismo como un método de medida de la actividad antioxidante total. La cuantificación de la coloración azulada se realiza en base a una recta patrón de ácido gálico.

Como se ha comentado, estos análisis sin separación previa no proporcionan información de los compuestos individuales que constituyen la muestra analítica, aunque sí son útiles para obtener información global de la misma y en estudios comparativos entre diferentes tipos de muestras vegetales. Para una caracterización más específica se usa la cromatografía líquida de alta resolución –HPLC por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography- y la Espectrometría de masas (MS). La MS es una técnica ampliamente utilizada en el estudio de muestras vegetales, esta técnica se fundamenta en la ionización y detección de los iones formados por los analitos presentes en la muestra, todo ello encadenado mediante el desplazamiento diferencial de las moléculas ionizadas. Además, la MS permite la fragmentación de las moléculas ionizadas, lo que es de gran utilidad en su estudio estructural.

La introducción de una etapa de separación previa a la detección de los metabolitos es de gran importancia cuando se pretende cuantificar compuestos individuales o identificar los que forman parte de la muestra. Para este fin la técnica más empleada es la cromatografía, donde los compuestos a analizar se distribuyen entre una fase móvil (un líquido (LC) o un gas (GC)) y una estacionaria (el relleno de la

columna cromatográfica). La separación se produce en función de la afinidad de los compuestos hacia cada fase.

Se ha comprobado que una reducción en el diámetro interno de la columna aumenta la sensibilidad debido a que se produce una menor supresión de la ionización en acoplamiento LC-MS y una mayor resolución cromatográfica. Las columnas con un relleno apolar, generalmente sílice, presentan una fuerte interacción con compuestos de baja y media polaridad, mientras que las de relleno polar son más eficaces para la separación de compuestos polares.

3.2. Objetivos

El objetivo de este capítulo es doble, de un lado la inducción de compuestos de interés farmacológico en diferentes tipos de cultivo de estevia mediante la participación de elicitores y de otro la caracterización y cuantificación de dichos compuestos.

3.3. Material y Métodos

3.3.1. Elicitación en plantas micropropagadas

3.3.1.1 Material vegetal y diseño experimental

Como material vegetal, y de manera similar a la metodología indicada en el apartado 2.3.1.1, se aislaron explantos uninodales de 1-2 cm de longitud con dos yemas axilares de plántulas cultivadas previamente *in vitro* de la variedad Criolla, que se subcultivaron tanto en medio solidificado con agar, como en sistema de inmersión temporal (SIT) en biorreactores Plantform. El sustrato utilizado fue el medio G, MS modificado como ya se ha señalado, con las mismas dosis de vitaminas, reguladores y sacarosa indicadas en la tabla 1. Como elicitores se añadieron por separado MeJA y ácido salicílico, en concentración de 50 μM de cada uno de ellos (11.2 mg l^{-1} y 7 mg l^{-1} respectivamente). En el caso del medio sólido también se usó 7 g l^{-1} de agar. Asimismo,

en todas las situaciones, el pH se ajustó a 5.7 antes de la esterilización en el autoclave. Los diferentes medios de cultivo, control sin elicitores, con salicílico y con MeJA se distribuyeron en tubos de ensayo de 150x25 cm (10 ml por tubo) para condiciones sólidas. En el caso de los tratamientos SIT en biorreactores Plantform se usaron 500 ml de sustrato por biorreactor.

Una vez distribuido el medio de cultivo, los tubos de ensayo se cerraron con tapones de polipropileno translúcido y los biorreactores con su tapa correspondiente e inmediatamente se esterilizaron en autoclave durante 20 min (120°C, 1 atm de presión). Una vez esterilizados los medios, en el caso del medio sólido se estableció, siempre en cabina de flujo laminar horizontal, un explanto por tubo de ensayo siendo el total 48 tubos para el control libre de elicitores y 24 para cada uno de los tratamientos con MeJA y salicílico. En el caso de los biorreactores Plantform, se usaron 25 explantos por biorreactor y se utilizaron 4 biorreactores por tratamiento, por tanto, el diseño final fue de 100 explantos para el control sin elicitores, 100 para el caso del MeJA y 100 para ácido salicílico. Los cultivos se incubaron en cámara de crecimiento a 26 ± 1 °C, $30 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante 16 h. de fotoperiodo. En el caso de los biorreactores Plantform, el intercambio de gases esterilizados mediante filtros se controló según lo descrito en el apartado 2.3.1.1 y Figura 9.

La duración del ensayo fue de 45 días en todos los casos.

El material vegetal obtenido, tanto en medio sólido como en biorreactor se conservó a -20°C para la posterior determinación de metabolitos secundarios.

3.3.1.2 Parámetros considerados

Para estudiar el efecto de los elicitores en el caso de la plantas micropropagadas en ambos sistemas de cultivo se cuantificó la supervivencia y, en el caso de los tubos de ensayo se midió a los 15, 30 y 45 días de cultivo el tamaño de la parte aérea en centímetros, el número de brotes, ramificaciones y raíces por explanto, la longitud de las raíces y el peso fresco de la planta completa. En las plantas cultivadas en los biorreactores, ante las características de este tipo de cultivo, solamente se pudo medir el peso fresco de 10 de las plantas tomadas al azar a los 45 días, empleando en todos los casos una balanza METTLER PJ 400.

3.3.1.3 Análisis estadístico

Para la correcta interpretación de los datos obtenidos se usó el paquete estadístico informático IBM SPSS Statistics V.25 con el que se calcularon los estimadores de centralización, dispersión y la comparación entre medias a través del cálculo ANOVA mediante test de Tuckey. La comparación entre porcentajes se efectuó usando la prueba z (t de Student) del mismo paquete informático utilizando la corrección de Bonferroni. La comparación de medias entre dos distribuciones se llevó a cabo usando la prueba t de Student del citado paquete informático utilizando el test de Levene para comprobar la homogeneidad de las varianzas.

3.3.2. Elicitación en callos y cultivos celulares

3.3.2.1 Material vegetal y diseño experimental

Basados en los resultados obtenidos en el cultivo de callo ya descrito, se siguieron subcultivando callos procedentes de los obtenidos anteriormente (apartado 2.4.2.1). Para ello, se tomaron trozos de callo de aproximadamente 1 cm² que cultivaron en medio MS solidificado con agar (8 gl⁻¹) con adición de 25 gl⁻¹ de sacarosa y 100 mg l⁻¹ de inositol, 0.5 mg l⁻¹ de BA, 0,5 mg l⁻¹ de 2,4-D, 1 mg l⁻¹ de GA₃ y 0.5 gl⁻¹ de ácido ascórbico. El GA₃ se adicionó tomando como base los trabajos de Ferreira y Handro (1987 y 1988) lo que proporcionó una mayor friabilidad de los callos obtenidos.

Se distribuyeron 80 ml de medio de cultivo en frascos de 450 ml y, una vez cerrados, se llevaron a autoclave para su esterilización durante 20 min (120°C, 1 atm de presión). Finalizada la esterilización se mantuvieron los frascos en cámara fría hasta su utilización. En cabina de flujo laminar se sembraron 10 trozos de callo, previamente cultivados *in vitro* como se ha indicado, en cada uno de los frascos. Posteriormente se llevaron los frascos a cámara de cultivo en condiciones de oscuridad y a una temperatura de 24±1°C.

Para las suspensiones celulares el medio líquido constó de las sales de MS con 25 gl⁻¹ de sacarosa y 100 mg l⁻¹ de inositol más los reguladores BA y 2,4-D (0.5 y 2 mg l⁻¹

respectivamente y con antioxidantes 0.5 g l^{-1} de ácido ascórbico y 0.5 g l^{-1} de ácido cítrico. 25 ml de este medio se llevaron a matraces de 250 cc (Figura 19a). después del proceso de autoclavado descrito. Trozos de los callos friables de 200 gramos producidos en los ensayos anteriores se llevaron a dichos matraces y cubiertos con un plástico negro, para procurar la ausencia de luz, donde se cultivaron durante 10 días en agitador orbital a 120 rpm en cámara de cultivo a $24 \pm 1^\circ\text{C}$.



Figura 19. Matraces para cultivos celulares (a) y células vivas (b)

Para la detección de las células vivas se usó la técnica de Robledo-Paz y cols. (2006) con una solución de tinción de 2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolio 1% en tampón fosfato 50 mM a pH 5.8, según el siguiente protocolo:

- a. Tomar $500 \mu\text{l}$ de cultivo y transferirlo a un eppendorf de 1.5 ml.
- b. Centrifugar a 500g durante 2 min.
- c. Retirar sobrenadante y añadir 1 ml de la solución de tinción descrita
- d. Incubar durante 20 h en oscuridad y bajo agitación a 25°C
- e. Observar al microscopio

3.3.3. Caracterización de los metabolitos secundarios obtenidos

3.3.3.1 Material vegetal y diseño experimental

Se usaron las plantas micropropagadas, tanto en medio sólido como en biorreactor. En el caso del medio sólido para el correspondiente análisis se tomaron 36 muestras de las plantas desarrolladas en el control y 18 de las crecidas en cada uno de los elicitores ensayados, en total 72 muestras. Para estudiar los metabolitos obtenidos en medio líquido en biorreactor se tomaron 3 muestras de cada uno de los 4 frascos de los tratamientos propuestos, control, ácido salicílico y MeJA, es decir un total de 12 muestras. Las muestras se congelaron y fueron posteriormente liofilizadas en un liofilizador de sobremesa VirTis Sentry 2.0 (SP Scientific). En el caso del desarrollo en biorreactor también se analizaron los medios de cultivo. Para ello, el sustrato de cultivo de cada uno de los 12 frascos empleados en el ensayo, 4 control, 4 con SA y 4 con MeJA fue congelado y liofilizado como se describió anteriormente.

3.3.3.2 Procedimientos analíticos

3.3.3.2.1 Determinación del índice de fenoles totales

3.3.3.2.1.1 Plantas micropropagadas en medios con elicitores

Se obtuvieron extractos del material vegetal de la variedad Criolla procedente de la micropropagación de yemas, tanto en medio sólido como en biorreactor, mediante el tratamiento de 50 mg de peso fresco del material vegetal de cada una de las muestras con 1.5 ml de acetona 80% y, posteriormente la mezcla se homogeneizó en mortero. El extracto obtenido se vertió en eppendorf de 1.5 ml que se sometió inmediatamente a una ultracentrifugación de 10 minutos a 10000 rpm. Posteriormente el índice de fenoles totales en el extracto se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu puesto a punto para esta Tesis a partir del propuesto García Martínez y cols. (2015). Esta determinación se basa en la interacción de los polifenoles con el reactivo Folin activado con el carbonato de sodio. La reacción entre el reactivo Folin y los polifenoles se realiza en medio básico. Como resultado da un rango de coloración azul, cuyo máximo de absorción es a una longitud de onda de 765 nm. La

intensidad del color es proporcional a la concentración de polifenoles. El protocolo seguido fue:

- a. Tomar 100 μl del sobrenadante y llevar a recipientes de vidrio de 25 cc con tapón de rosca.
- b. Añadir 2 ml de agua tipo ELIX y 1 ml de reactivo Folin-Ciocalteu.
- c. Agitar vigorosamente en Vortex.
- d. Adicionar 5 ml de de carbonato sódico (Na_2CO_3) al 20%.
- e. Añadir 1.9 ml de agua ELIX hasta alcanzar los 10 ml de volumen final.
- f. Determinar la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm en cubeta de cuarzo.

3.3.3.2.1.2 Determinación en suspensión celular

Tras el cultivo del material vegetal en el medio líquido se determinó el índice de fenoles totales en el filtrado por la metodología descrita, aunque modificada según el siguiente protocolo:

- a. Añadir 0.375 ml del medio de cultivo a eppendorf de 1.5 ml.
- b. Añadir 37.5 μl de reactivo Folin-Ciocalteu.
- c. Añadir 112.5 μl de carbonato sódico (Na_2CO_3) al 20%.
- d. Tras homogeneizar en Vortex mantener las muestras en oscuridad durante una hora.
- e. Transcurrido este tiempo añadir 0.975 ml de agua Milli-Q hasta alcanzar un volumen final de 1.5 ml.
- f. Centrifugar 7 minutos a 15000 rpm para eliminar la turbidez del medio por la posible presencia de carbonato cálcico, que presumiblemente aparece al reaccionar el cloruro cálcico del medio MS con el carbonato sódico utilizado en la reacción.
- g. Determinar la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm.

Para determinar los valores de absorbancia se efectuó una extrapolación con equivalentes de ácido gálico para lo que preparó una recta de calibrado elaborada con

concentraciones de 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20 y 22 mg l⁻¹ de ácido gálico según la siguiente tabla 15.

Tabla 15.- Preparación de la curva patrón de ácido gálico a partir de una disolución concentrada de 100 mg l⁻¹.

Reactivos	Concentración (mg l ⁻¹) de la curva patrón de ácido gálico (100 mg l ⁻¹)											
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
Ácido gálico (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0	2.2
Agua (ml)	10	9.8	9.6	9.4	9.2	9	8.8	8.6	8.4	8.2	8	7.8

Los liofilizados obtenidos tanto de material micropropagado como de cultivos celulares se trasladaron a la empresa INNOPLANT S.A. para su detección y cuantificación siguiendo la metodología de Sánchez-Rodríguez y cols. (2012). Se tomaron 5 mg de cada liofilizado que se sometieron a análisis cromatográficos en una columna Luna C18 (150 × 1,0 mm, tamaño de partícula de 3 µm; Phenomenex, Macclesfield, Reino Unido). La fase móvil estuvo constituida por dos solventes: agua (ácido acético al 1%) (A) y acetonitrilo (B), partiendo de B al 5% y usando un gradiente para obtener 50% a los 30 min, 80% a los 37, manteniendo el 80% durante 5 min, y volviendo a las condiciones iniciales a los 45 min. El caudal fue de 20 µl min⁻¹ y el volumen de inyección de 3 µl. Los datos espectrales de todos los picos se acumularon en el rango de 200 a 400 nm y los cromatogramas se registraron a 320 y 340 nm. Los flavonoides se cuantificaron como quercetina-3-rutinósido (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.), y los ácidos fenólicos, derivados del ácido sinápico y ferúlico, como ácido sinápico (Sigma). Los análisis de HPLC-PAD-MSn/ESI se llevaron a cabo en un equipo Agilent HPLC 1200 series equipado con un detector de matriz de diodos y un detector de masas en serie (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). El HPLC constaba de una bomba binaria (modelo G1376A), un muestreador automático (modelo G1377A) refrigerado a 4 °C (modelo G1330B), un desgasificador (modelo G1379B) y un detector de matriz de fotodiodos (modelo G1315D). El sistema de HPLC fue controlado por el software ChemStation (Agilent, v. B.01.03-SR2). El detector de masas era un espectrómetro de trampa de iones Bruker (modelo HCT Ultra) equipado con una interfaz de ionización por electropulverización y estaba controlado por el software LCMSD (Agilent, v. 6.1). Las condiciones de ionización fueron 300 °C y 4,0 kV para temperatura capilar y voltaje, respectivamente. La presión del nebulizador y el caudal de nitrógeno fueron 5,0 psi y 3

l min⁻¹, respectivamente. La masa de barrido completo cubrió el rango de m/z 100 hasta m/z 1200 y la masa objetivo se ajustó a 350. Se realizaron experimentos de fragmentación inducida por colisión en la trampa de iones usando helio como gas de colisión, con ciclos de aumento de voltaje de 0,3 hasta 2 V. Los datos de espectrometría de masas se adquirieron en el modo de ionización negativa.

La identificación de los picos se obtuvo analizando los cromatogramas de iones extraídos de la corriente de iones a valores m/z correspondientes a los iones [M-H]⁻ de los compuestos individuales investigados, así como su fragmentación. La cuantificación de los analitos identificados se realizó por detección HPLC-PDA utilizando el método de patrón externo con gráficos de calibración, en función de la concentración basada en el área del pico, detectada a la longitud de onda correspondiente a su máxima absorbancia (320 nm para ácidos fenólicos y 360 nm para flavonoides).

3.4. Resultados

3.4.1. Elicitación en plantas micropropagadas.

3.4.1.1 Supervivencia

En la tabla 16 se indican los porcentajes de supervivencia de los explantos de Criolla establecidos en medio sólido y SIT (biorreactor Plantform) tratados con los elicitores ensayados.

Tabla 16. Porcentajes de supervivencia de explantos de la variedad Criolla cultivados en medio control y con elicitores en sistema sólido y biorreactor (SIT).

Tratamiento	control		Ácido salicílico		MeJA	
	N	%	N	%	N	%
Sólido	48	100	24	100	20	83.3
Biorreactor (SIT)	100	100	100	100	100	100

En cuanto a supervivencia, es decir explantos que se desarrollaron bien ya sea formando tallo, raíz o ambos, al final del ensayo se obtuvo un porcentaje de supervivencia medio de los dos sistemas muy alto, 97.2%. En el caso de los biorreactores fue del 100% independientemente del tratamiento control o con algunos

de los elicitores usados. En el caso del cultivo sólido en tubo de ensayo solamente se perdieron cuatro explantos en el tratamiento con MeJA, lo que representa el 83.3% de plantas supervivientes sin significación estadística respecto al resto.

3.4.1.2 Evolución de la biometría en plantas micropropagadas en medio sólido

En la tabla 17 se indica la longitud media del tallo en plantas de Criolla a los 15 días de cultivo en medio control y con los elicitores ensayados.

Tabla 17.- Longitud tallo (cm) de plantas de la variedad Criolla a los 15 días de iniciado el ensayo con elicitores medio sólido.

Tratamientos	N	Media (cm)	Signif.
control	47	2.3702	B
salicílico	24	2.0583	B
MeJA	20	0.8450	A

Letras diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos ensayados.

Se observa en la tabla que la longitud del tallo alcanzada por las plantas a los 15 días de cultivo fue menor (test de Tuckey $p \leq 0.05$) en las desarrolladas en medio con MeJA, donde no llegaron a 1 cm. Por el contrario, en el control y en el medio con salicílico las plantas superaron los 2 centímetros de longitud de la parte aérea.

En la tabla 18 se indica el número medio de yemas en plantas de Criolla a los 15 días de cultivo en medio control y con los elicitores ensayados.

Tabla 18.- Número medio de yemas de plantas de la variedad Criolla a los 15 días de iniciado el ensayo con elicitores en medio sólido.

Tratamientos	N	Media	Signif.
control	47	3.70	C
salicílico	24	3.00	B
MeJA	20	2.05	A

Letras diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos ensayados.

En la tabla 18 se observa diferencias estadísticamente significativas (test de Tuckey $p \leq 0.05$) entre el número medio de yemas de cada tratamiento, destacaron las

plantas que no estuvieron en presencia de elicitor con 3.7 yemas por planta, seguidas de las tratadas con salicílico y correspondió el menor número de yemas a las tratadas con MeJA con algo más de 2 yemas por planta.

En la tabla 19 se indica el número medio de ramificaciones laterales en plantas de Criolla a los 15 días de cultivo en medio control y con los elicitores ensayados.

Tabla 19.- Número medio de ramificaciones laterales de plantas de la variedad Criolla a los 15 días de iniciado el ensayo con elicitores en medio sólido.

Tratamientos	N	Media	Signif.
control	47	1.60	B
salicílico	24	1.54	B
MeJA	20	1.10	A

Letras diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos ensayados

Al igual que ocurriera en el caso de las yemas indicado en la tabla 19 se observa un menor número de ramificaciones (test de Tuckey $p \leq 0.05$) en las plantas tratadas con MeJA (1.1), mientras no se encuentran diferencias entre el número de ramificaciones en las plantas del control y del tratamiento con salicílico.

Respecto a la emisión radicular a los 15 de iniciado el ensayo, solamente se han observado raíces en 6 (12.7%) de los explantos cultivados en el control con una media de 2.5 raíces por planta y una longitud media de 0.73 cm.

En la tabla 20 se indica la longitud media del tallo en plantas de Criolla a los 30 días de cultivo en medio control y con los elicitores ensayados.

Tabla 20.- Longitud tallo (cm) de plantas de la variedad Criolla a los 30 días de iniciado el ensayo con elicitores en medio sólido.

Tratamientos	N	Media	Signif.
control	48	9.63	C
salicílico	24	5.56	B
MeJA	20	2.95	A

Letras diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos ensayados

Se observa en la tabla 20 que tras 30 días de cultivo se ampliaron las diferencias entre las longitudes medias de las plantas en los tres tratamientos ya observadas a los

15 días. Así, hay diferencias significativas (test de Tuckey $p \leq 0.05$) en las medias de las plantas control, 9.63 cm, las de salicílico y las de MeJA que no llegaron a los 3 cm de media.

En la tabla 21 se indica el número medio de yemas en plantas de Criolla a los 30 días de cultivo en medio control y con los elicitores ensayados.

Tabla 21.- Número medio de yemas de plantas de la variedad Criolla a los 30 días de iniciado el ensayo con elicitores en medio sólido.

Tratamientos	N	Media	Signif.
control	48	7.56	B
salicílico	24	5.54	A
MeJA	20	4.20	A

Letras diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos ensayados

También las plantas desarrolladas en el control presentaron un mayor número medio de yemas (test de Tuckey $p \leq 0.05$) con 7.56 frente a las de ambos tratamientos con elicitores.

En la tabla 22 se indica el número medio de ramificaciones laterales en plantas de Criolla a los 30 días de cultivo en medio control y con los elicitores ensayados.

Tabla 22.- Número medio de ramificaciones laterales de plantas de la variedad Criolla a los 30 días de iniciado el ensayo con elicitores en medio sólido.

Tratamientos	N	Media	Signif.
Control	48	1.73	AB
Salicílico	24	1.88	B
MeJA	20	1.40	A

Letras diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos ensayados

El mayor número medio de ramificaciones laterales se correspondió con las plantas tratadas con salicílico (tabla 22), superior (test de Tuckey $p \leq 0.05$) al obtenido con MeJA. Las plantas cultivadas en el control presentaron un número intermedio.

Solamente se encontraron raíces en 9 plantas de los tratamientos control (19.1%), con una media de 3 raíces por planta y una longitud media de raíz de 2.04 cm y en una de las crecidas en medio con MeJA es decir, con un porcentaje de

enraizamiento y desarrollo bajo, 5%, una media de 1 raíz por planta y longitud de 0.8 cm.

En la tabla 23 se indica la longitud media del tallo en plantas de Criolla al final del ensayo, 45 días de cultivo, en medio control y con los elicitores ensayados.

Tabla 23.- Longitud tallo (cm) de plantas de la variedad Criolla a los 45 días de iniciado el ensayo con elicitores en medio sólido.

Tratamientos	N	Media	Signif.
control	48	12.72	C
salicílico	24	9.01	B
MeJA	20	4.93	A

Letras diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos ensayados

Al final del ensayo, como se observa en la tabla 23, hay una clara diferencia (test de Tuckey $p \leq 0.05$) entre la longitud media alcanzada por las plantas desarrolladas en cada uno de los tratamientos. El mayor desarrollo de la parte aérea se correspondió con las plantas cultivadas en ausencia de elicitores, que superaron ampliamente los 12 cm, las crecidas en el medio con ácido salicílico alcanzaron los 9 cm, mientras que las del medio MeJA no llegaron a los 5 cm.

En la tabla 24 se indica el número medio de yemas en plantas de Criolla a los 45 días de cultivo en medio control y con los elicitores ensayados.

Tabla 24.- Número medio de yemas de plantas de la variedad Criolla a los 45 días de iniciado el ensayo con elicitores en medio sólido

Tratamientos	N	Media	Signif.
control	48	11.40	C
salicílico	24	9.21	B
MeJA	20	5.20	A

Letras diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos ensayados

A los 45 días desde la siembra las plantas presentaron también diferencias significativas en cuanto al número de yemas entre las medias de los tres tratamientos

(test de Tuckey $p \leq 0.05$) manteniéndose la tendencia comentada hasta ahora de clara superioridad de las plantas control, superior a 11, frente a las tratadas con elicitores donde el MeJA indujo un menor desarrollo de yemas que el ácido salicílico.

En la tabla 25 se indica el número medio de ramificaciones laterales en plantas de Criolla a los 45 días de cultivo en medio control y con los elicitores ensayados.

Tabla 25.- Número medio de ramificaciones laterales de plantas de la variedad Criolla a los 45 días de iniciado el ensayo con elicitores en medio sólido.

Tratamientos	N	Media	Signif.
control	48	1.90	AB
salicílico	24	2.25	B
MeJA	20	1.40	A

Letras diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos ensayados

Como se observa en la tabla 25 se mantuvo la tendencia en el número medio de ramificaciones laterales ya comentada para los 30 días de cultivo con un número superior, 2.25, de ramificaciones en las plantas desarrolladas en ácido salicílico (test de Tuckey $p \leq 0.05$) y 1.4 en las de MeJA, permaneciendo intermedio el número de ramificaciones en el control sin elicitores.

Respecto al desarrollo de raíces, al final del ensayo el ácido salicílico no indujo raíz en ningún caso, sin embargo el MeJA promovió hasta un 25% de plantas con raíz, superior, aunque no estadísticamente al cuantificado en las plantas control con un 22.9%. No obstante, tanto el número medio de raíces por planta como la longitud media de éstas del control, 4.54 y 3.26 cm fueron superiores (t Student $p \leq 0.05$) a esos mismos parámetros del MeJA 1.4 y 1.06 respectivamente.

En la tabla 26 se indica el peso fresco medio (gr) de plantas de Criolla a los 45 días de cultivo en medio control y con los elicitores ensayados.

Tabla 26.- Peso medio fresco (gr) de plantas de la variedad Criolla a los 45 días de iniciado el ensayo con elicitores en medio sólido

Tratamientos	N	Media	Signif.
control	47	0.63	B
salicílico	23	0.29	A
MeJA	17	0.27	A

Letras diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos ensayados

Los pesos frescos medios de las plantas de los diferentes tratamientos al final del ensayo (tabla 26) confirman la mayor biomasa de las plantas desarrolladas en el control (test de Tuckey $p \leq 0.05$) frente a las crecidas en los medios con elicitores.

3.4.1.3 Evolución de la biometría en plantas micropropagadas en biorreactor

La supervivencia de los explantos desarrollados en medio líquido en biorreactor fue en todos los casos del 100%.

En cuanto al desarrollo radicular, al final del ensayo los porcentajes de enraizamiento fueron estadísticamente diferentes (t Student, $p \leq 0.05$) 47.05%, 88.89% y 17.64% para plantas control, con ácido salicílico y MeJA respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre el número de raíces en plantas cultivadas en medio control, 1.75; salicílico, 3.13 y MeJA 1.33. No obstante, la longitud de las raíces de las plantas desarrolladas en medio con salicílico fue superior (test de Tuckey, $p \leq 0.05$), 3.63 cm a las medidas en las de MeJA, 0.93 cm, mientras que las desarrolladas en salicílico mostraron una longitud intermedia 1.60 cm.

Como se ha indicado en el capítulo de material y métodos (3.3.1.2) en el caso de las plantas tratadas con y sin elicitores en medio líquido se cuantificó el peso fresco al final del ensayo, 45 días. Los resultados se indican en la tabla 27.

Tabla 27.- Peso medio fresco (gr) de plantas de la variedad Criolla a los 45 días de iniciado el ensayo con elicitores en biorreactor Plantform.

Tratamientos	N	Media	Signif.
control	12	0.45	B
salicílico	12	0.24	A
MeJA	12	0.25	A

Letras diferentes leídas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos ensayados

Se observa en la tabla 27 que también en los biorreactores se dieron las mismas tendencias que en el medio sólido respecto al efecto de los elicitores sobre la biomasa de la planta. Las plantas desarrolladas en medio sin elicitores mostraron un mayor peso fresco (test de Tuckey $p \leq 0.05$) que las desarrolladas en medio tanto con ácido salicílico como con MeJA. Cuando se comparan ambos sistemas de cultivo se constata que las plantas desarrolladas en biorreactor presentaron un peso fresco similar (t Student, $p \leq 0.05$) a las de medio sólido tanto en las plantas del medio control (0.445 y 0.63 gramos respectivamente) como en las de ácido salicílico (0.24 y 0.29 gramos) y MeJA (0.25 y 0.27 gramos).

3.4.2. Caracterización de los metabolitos secundarios obtenidos

3.4.2.1 Plantas micropropagadas

3.4.2.1.1 Índice de fenoles totales en plantas

En la tabla 28 se indican los contenidos de fenoles totales en mgg^{-1} de peso fresco, obtenidos por el método Folin, en las plantas de la variedad Criolla micropropagadas en medio sólido con los elicitores ácido salicílico y MeJA.

Tabla 28.- Índice de fenoles totales (mgg^{-1} pf) en plantas micropropagadas en medio sólido con elicitores.

Tratamientos	N	Media	Signif.
control	36	0.109	A
Salicílico	18	0.249	B
MeJA	18	0.233	B

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos.

Como se puede observar en la tabla 28 los tratamientos con elicitores multiplicaron por dos el contenido de fenoles (test de Tuckey $p \leq 0.05$) respecto a las plantas desarrolladas en medio sin elicitores, sin diferencias estadísticas entre los contenidos obtenidos con los dos elicitores usados.

En la tabla 29 se indican los contenidos de fenoles totales en mgg^{-1} de peso fresco, obtenidos por el método Folin, en las plantas de la variedad Criolla micropropagadas en medio líquido en biorreactor con los elicitores ácido salicílico y MeJA.

Tabla 29.- Índice de fenoles totales (mgg^{-1} pf) en plantas micropropagadas en medio líquido (biorreactor) con elicitores.

Tratamientos	N	Media	Signif.
control	12	0.137	B
salicílico	12	0.097	A
MeJA	12	0.130	B

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos.

A diferencia de lo observado en la tabla 28, en esta tabla 29 se comprueba que en las plantas cultivadas en el medio líquido en biorreactor no existieron diferencias significativas entre el nivel de fenoles cuantificado en el control y cuando se le adicionó al medio MeJA siendo significativamente menor el contenido encontrado en las plantas desarrolladas en medio con salicílico (0.097 mgg^{-1} pf). Comparando ambas tablas se observa que el contenido en fenoles fue menor en el cultivo en biorreactor

(0.121 mg/g pf) que en el medio sólido (0.197 mg/g pf) (Student t= 2.61, $p \leq 0.05$). No obstante, no se encontraron diferencias significativas para ambos tipos de cultivo cuando se comparan los valores medios de fenoles totales tanto entre los controles (Student t= 3.73), como entre los tratamientos con MeJA o salicílico Student t= 4.02 y 2.82 respectivamente).

3.4.2.1.2 Índice de fenoles totales en medio de cultivo

3.4.2.1.2.1 Biorreactor Plantform

En la tabla 30 se incluyen los contenidos de fenoles totales, obtenidos por el método Folin, en medio líquido (biorreactor Plantform) con la inclusión de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tabla 30.- Fenoles totales (mg de equivalentes ácido gálico) obtenidos por el método Folin, en medio líquido (biorreactor) en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos elicitores	N	Media
Control	12	79.163
salicílico	12	83.806
MeJA	12	81.641

Se observa en la tabla 30 un incremento de fenoles totales respecto al control, aunque sin diferencias estadísticamente significativas, tanto cuando se usa el MeJA, incremento de 1.48 mg, como con el ácido salicílico, 4.64 mg.

3.4.2.1.2.2. Cultivo de callos y suspensiones celulares

En la tabla 31 se indican los pesos secos (mgml^{-1}) de los filtrados obtenidos de los diferentes cultivos celulares (Figura 19b) en medio con los elicitores ensayados.

Tabla 31.- Pesos secos de los filtrados de células desarrolladas en medio control y con los elicitores MeJA y ácido salicílico.

Tratamientos	N	Medias
control	9	2.71
MeJA	6	3.39
salicílico	9	2.78

Como se observa en la tabla, aunque hubo una tendencia a aumentar los pesos frescos de las células cuando se añadieron al medio elicitores, 2.71 mg/ml para el control frente a 3.02 de media de ambos elicitores, no existen diferencias estadísticas entre ambos parámetros (test de Tuckey), como tampoco existen diferencias entre los pesos secos de las células en cualquiera de los medios utilizados.

En la tabla 32 se incluyen los contenidos de fenoles totales, obtenidos por el método Folin, en suspensiones celulares con la inclusión de MeJA y ácido salicílico en el medio de cultivo.

Tabla 32.- Fenoles totales (mg de equivalentes ácido gálico) obtenidos por el método Folin, en suspensiones celulares en presencia de MeJA y ácido salicílico en el medio de cultivo.

Tratamientos elicitores	N	Medias
Control	6	26.618
salicílico	2	28.390
MeJA	3	34.717

Al igual que ocurriera en el caso de los biorreactores, se observa en la tabla 32 un incremento de fenoles totales respecto al control, tanto cuando se usa el MeJA, 34.72 mg, como con el ácido salicílico, 28.39 mg. Aunque también estos incrementos no son estadísticamente significativos respecto al control.

Sí existen diferencias significativas (t Student, $p \leq 0.05$) en favor de los valores medios de fenoles obtenidos en los biorreactores, valor medio de 81.54 mg de equivalentes ácido gálico, respecto a los obtenidos en los cultivos celulares, 29.91 mg.

3.4.2.2 Determinación y cuantificación de fenoles en biorreactor y cultivo celular

3.4.2.2.1 Biorreactores Plantform

En la tabla 33 se incluyen los contenidos de fenoles totales, obtenidos por HPLC, en biorreactores Plantform con la inclusión de los elicitores ensayados.

Tabla 33.- Fenoles totales (mg/100g PF) obtenidos por HPLC en biorreactores en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Significación
Control	29.790	A
Salicílico	60.804	A
MeJA	661.236	B

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos (N=4).

Se observa en la tabla 33 que la adición al medio de cultivo de MeJA aumenta hasta casi 11 veces (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) la concentración de fenoles totales respecto a la inducida por el ácido salicílico y más de 22 veces respecto al medio en ausencia de elicitores. No se encuentran diferencias significativas entre los fenoles generados por el ácido salicílico y el control.

La separación y caracterización de los fenoles totales cuantificados por HPLC en el sustrato de los biorreactores indicados en la tabla anterior han dado como resultado los compuestos fenólicos descritos en las siguientes tablas.

En la tabla 34 se indican los contenidos del ácido clorogénico (ácido 3-O cafeoilquínico; 3-CQA), también conocido como ácido neoclorogénico según la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Abrankó y Clifford, 2017) (Figura 20) obtenidos en biorreactores Plantform con la inclusión de MeJA y ácido salicílico en el medio de cultivo.

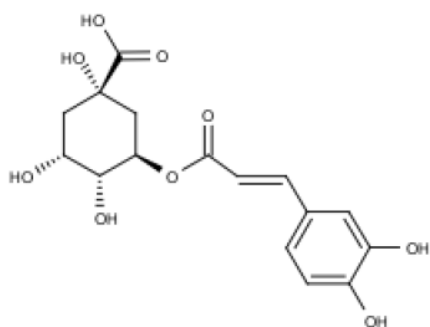


Figura 20 Estructura del ácido clorogénico (3 CQA)

Tabla 34.- Contenido de ácido 3 cafeoilquínico (3-CQA) (mg/100g PF) analizado mediante HPLC en biorreactores en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Medias	Signif.
Control	0.217	A
Salicílico	0.220	A
MeJA	9.483	B

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos (N=4 para cada uno de los tratamientos).

Como se aprecia en la tabla los contenidos de 3-CQA inducidos por el MeJA son muy superiores, más de 43 veces, (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) a los obtenidos con salicílico y en ausencia de elicitores.

Los análisis efectuados indican la presencia de compuestos derivados del ácido clorogénico, aún no identificados cuyos contenidos se muestran en las tablas siguientes.

Tabla 35.- Contenidos de los derivados 1 a 6 de ácido clorogénico (mg/100g PF) analizados mediante HPLC en biorreactores en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Derivados de CQA	Tratamientos	Media	Signif.
1	Control	3.023	A
	Salicílico	7.661	B
	MeJA	25.864	C
2	Control	2.901	A
	Salicílico	4.066	B
	MeJA	8.6166	C
3	Control	3.164	A
	Salicílico	11.975	B
	MeJA	46.562	C
4	Control	2.998	A
	Salicílico	6.894	B
	MeJA	22.185	C
5	Control	2.951	A
	Salicílico	5.444	B
	MeJA	15.230	C
6	Control	4.272	A
	Salicílico	6.075	A
	MeJA	7.833	A

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos (N=4 para cada uno de los tratamientos).

En la tabla 35 se observa que la liberación de los derivados 1 a 5 del CQA está significativamente incrementada (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) en los medios con elicitores respecto al control, especialmente en los que contienen MeJA que multiplican en más de 14 veces sus contenidos frente a los obtenidos sin elicitores en el caso del derivado 3; en más de 8 veces en el caso del derivado 1 o en más de 7 en el 4. Sin embargo, los contenidos de los derivados 1 a 5 inducidos por el ácido salicílico no superan en ningún caso las 3.7 veces que se observan en el derivado 3. En el caso del derivado de CQA 6, aunque se mantienen las tendencias ya comentadas, las diferencias no son estadísticamente significativas como se observa en la tabla 35.

Como consecuencia de la tabla 35 el número total de derivados del ácido clorogénico también presentan las mismas diferencias significativas en favor de los inducidos por la presencia de MeJA y ácido salicílico en el medio respecto al control

(test de Tuckey, $p \leq 0.05$, tabla 36), aunque la liberación de compuestos promovida por el MeJA triplica siempre a la promovida por el ácido salicílico.

Tabla 36.- Contenidos totales de los derivados del ácido clorogénico (mg/100g PF) analizados por HPLC en biorreactores en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	19.315	A
Salicílico	42.301	B
MeJA	126.521	C

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos (N=4 para cada uno de los tratamientos).

Otros de los compuestos detectados y cuantificados mediante HPLC es el ácido ferúlico (ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil) propil-2-enoico) (Figura 21), ácido hidroxicinámico abundante en la pared celular de la célula vegetal.

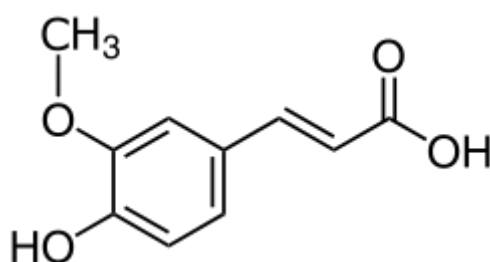


Figura 21 Estructura del ácido ferúlico

En la tabla 37 se indican los contenidos totales de ácido ferúlico cuantificados por HPLC en los medios de cultivo de biorreactores Plantform con y sin elicitores tras 45 días de crecimiento de estevia.

Tabla 37.- Contenidos de ácido ferúlico (mg/100g PF) analizados por HPLC en biorreactores en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	2.989	A
Salicílico	3.146	A
MeJA	479.246	B

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) entre tratamientos (N=4 para cada uno de los tratamientos).

Se observa en la tabla un contenido de este ácido hasta 160 veces superior (test de Tuckey, $p \leq 0.05$), cuando el medio contiene MeJA. En el caso del ácido salicílico también se potencia la síntesis de ácido ferúlico aunque de forma mucho menos evidente que en el caso del MeJA y, en consecuencia, sin diferencia significativa respecto al control.

La elicitación con ácido salicílico y MeJA en medio de cultivo de estevia en biorreactores produce también naringenina chalcona (2', 4,4', 6'-tetrahidroxichalcona) (Figura 22) con dos hexosas. La naringenina chalcona es precursora de una amplia variedad de flavonoides. Los contenidos obtenidos se expresan en la tabla 38.

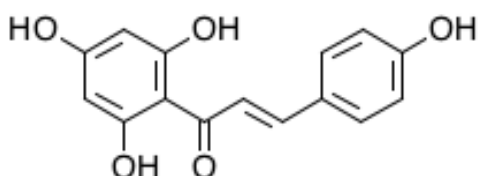


Figura 22 Estructura de la naringenina chalcona

Tabla 38.- Contenidos de naringenina chalcona con dos hexosas (mg/100g PF) analizados por HPLC en biorreactores en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	2.972	A
Salicílico	6.079	B
MeJA	18.275	C

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos (N=4 para cada uno de los tratamientos).

Se observa en la tabla 38 una presencia de naringenina chalcona dihexosa significativamente mayor (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) en los medios con elicitors frente al medio control. Al igual que ocurriera en anteriores compuestos descritos el MeJA potencia de manera especialmente eficiente la presencia de este compuesto tanto frente al control (superior a 6 veces), como frente al ácido salicílico (superior a 3 veces). También los medios con ácido salicílico duplican el contenido de naringenina chalcona dihexosa frente a los medios sin elicitors.

Los resultados obtenidos de los análisis efectuados indican también una presencia importante de ácido p-cumárico (ácido (E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico o ácido 4-hidroxicinámico) que se indica en la tabla 39. El ácido p-cumárico, cuya estructura se presenta en la figura 23, es el isómero más abundante de los tres del ácido cumárico, otro ácido hidroxicinámico componente importante de la lignina.

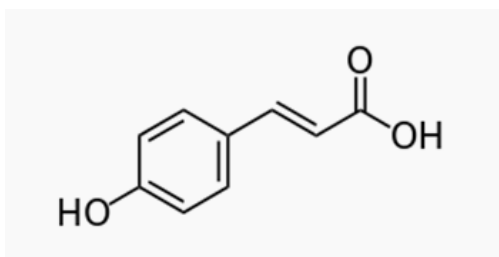


Figura 23 Estructura del ácido p-cumárico

Tabla 39.- Contenidos de ácido p-cumárico (mg/100g PF) analizados por HPLC en biorreactores en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	3.027	A
Salicílico	7.740	B
MeJA	26.245	C

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos (N=4 para cada uno de los tratamientos).

Se observa en la tabla 39 unos contenidos de ácido p-cumárico muy superiores (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) en medios con los elicitores ensayados frente al control. Los niveles de este ácido obtenidos con MeJA superan en 8 veces los obtenidos en medio sin ningún elicitor y en más de 3 a los obtenidos con ácido salicílico. Así mismo en los medios con ácido salicílico se detecta el doble de ácido p-cumárico producido por las plantas de estevia respecto al control.

El Kaempferol (3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona) (Figura 24), es un flavonol aislado de diferentes fuentes vegetales.

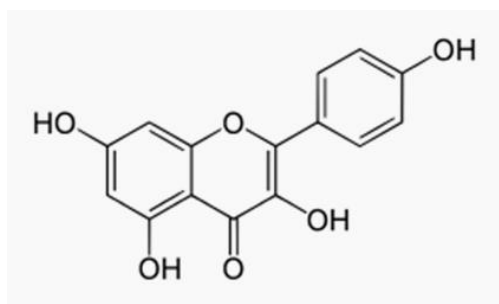


Figura 24 Estructura del Kaempferol

En los diferentes medios de cultivo de estevia analizados se detectan dos formas de Kaempferol, el Kaempferol rutinósido pentosa (Figura 25) y el Kaempferol 3 rutinósido (Figura 26). Por un lado, se cuantifican cantidades altas del Kaempferol rutinósido pentosa (Figura 25) como se indica en la tabla 40.

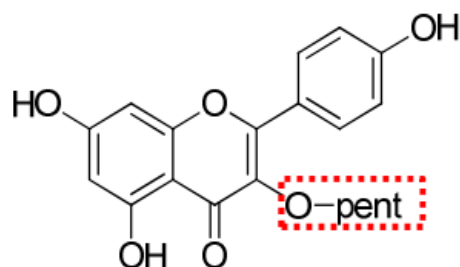


Figura 25 Estructura del Kaempferol rutinósido pentosa

Tabla 40.- Contenidos de Kaempferol rutinósido pentósido (mg/100g PF) analizados por HPLC en biorreactores en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	1.242	A
Salicílico	1.289	B
MeJA	1.470	C

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) entre tratamientos (N=4 para cada uno de los tratamientos).

Se observa en la tabla 40 la acción positiva (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) tanto del ácido salicílico como del MeJA en la síntesis de Kaempferol rutinósido pentósido frente a los medios sin elicitores. Esta acción es mucho más marcada en el caso del

MeJA con diferencias estadísticas (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) en los niveles de este flavonol respecto a los inducidos por el ácido salicílico y por el control.

La otra forma de Kaempferol detectada es el Kaempferol 3 rutinósido (Kaempferol 3-O- β -D-rutinósido) (7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-3-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-yl]oxioxan-2-yl]oxi-3, 5-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)chromen-4-ona) (Figura 26). Este glucósido de flavonol de sabor amargo se encuentra en los rizomas de varios helechos (Baek y cols. 1994).

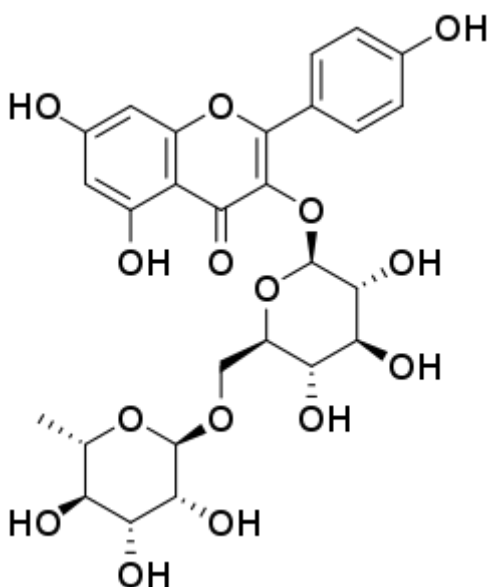


Figura 26. Estructura del Kaempferol 3-O- β -D-rutinósido

En la tabla 41 se indican los valores de Kaempferol 3-O- β -D-rutinósido detectados en los ensayos de elicitors considerados.

Tabla 41.- Contenidos de Kaempferol 3-O- β -D-rutinósido (mg/100g PF) analizados por HPLC en biorreactores en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	0.0286	B
Salicílico	0.0291	B
MeJA	0.0001	A

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos (N=4 para cada uno de los tratamientos).

En el caso del Kaempferol 3-O- β -D-rutinósido no se observa, Tabla 41, un efecto positivo de la presencia de elicitors en el medio de cultivo, incluso la adición de MeJA

reduce la inducción de este compuesto significativamente (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) frente a los medios sin elicitores y con ácido salicílico que no presentan diferencias entre sí respecto al contenido de este derivado del Kaempferol.

3.4.2.2.2 Cultivos celulares

3.4.2.2.2.1 Un subcultivo

En la tabla 42 se incluyen los contenidos de fenoles totales, obtenidos por HPLC, en cultivos celulares procedentes de callo con la inclusión de los elicitores ensayados.

Tabla 42.- Fenoles totales (mg/100g PF) obtenidos por HPLC en cultivos celulares procedentes de callo en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	161.769	A
Salicílico	498.840	B
MeJA	144.311	A

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.1$) entre tratamientos (N=3, control; N=4, Salicílico y N=5, MeJA).

Se observa en la tabla 42 que la adición al medio de cultivo de ácido salicílico triplica (test de Tuckey, $p \leq 0.1$) la concentración de fenoles totales respecto a las obtenidas con MeJA y en el control, sin diferencias estadísticas entre los valores cuantificados en estos dos últimos tratamientos.

En la tabla 43 se indican los contenidos de ácido 3-CQA (mg/100g PF) obtenidos por HPLC en cultivos celulares de estevia procedentes de callo en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tabla 43.- Contenidos de ácido 3-CQA (mg/100g PF) analizados mediante HPLC en cultivos celulares procedentes de callo en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media
Control	0.219
Salicílico	0.236
MeJA	0.226

Como se observa en la tabla 43 la adición de elicitores al medio no estimula la síntesis de ácido 3 cafeoilquínico en los medios de cultivo de estevia con unos valores muy similares, alrededor de los 0.23 mg/100g de peso fresco en los tres casos.

En la tabla 44 se indican los valores medios de compuestos derivados de los ácidos clorogénicos en cultivos celulares procedentes de callo.

Tabla 44.- Contenidos de los derivados 1 a 6 de ácido clorogénico (mg/100g PF) analizados mediante HPLC en cultivos celulares procedentes de callo en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Derivados de CQA	Tratamientos	Media	Signif.
1	Control	21.466	A
	Salicílico	78.302	B
	MeJA	23.531	A
2	Control	8.033	A
	Salicílico	21.726	B
	MeJA	7.517	A
3	Control	42.128	A
	Salicílico	146.193	B
	MeJA	38.204	A
4	Control	20.225	A
	Salicílico	66.232	B
	MeJA	18.490	A
5	Control	13.976	A
	Salicílico	43.421	B
	MeJA	12.866	A
6	Control	8.041	A
	Salicílico	3.712	A
	MeJA	3.504	A

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.1$) entre tratamientos (N=3, control; N=4, Salicílico y N=5, MeJA).

En la tabla 44 se observa que la presencia de los derivados 1 a 5 del CQA aumenta significativamente (test de Tuckey, $p \leq 0.1$) en los medios que contienen ácido salicílico que triplican y en algún caso, como el del derivado 3, casi cuadruplican sus contenidos frente a los obtenidos en el control o con MeJA en el medio de cultivo. En el caso del derivado 6 de CQA, es la ausencia de elicitores la que incrementa sus niveles aunque, como se indica en la tabla, las diferencias no son estadísticamente

significativas. En ningún caso, a excepción del derivado 1 y sin significación estadística, la participación del MeJA supera al control en la inducción de los compuestos reseñados.

Como consecuencia de la tabla 45 el número total de derivados del ácido clorogénico también presentan las mismas diferencias significativas en favor de los inducidos por la presencia de ácido salicílico en el medio respecto al control y al que se ha añadido MeJA (test de Tuckey, $p \leq 0.1$).

Tabla 45.- Contenidos totales de los derivados del ácido clorogénico (mg/100g PF) analizados por HPLC cultivos celulares procedentes de callo en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	116.413	A
Salicílico	359.657	B
MeJA	102.047	A

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.1$) entre tratamientos (N=3, control; N=4, Salicílico y N=5, MeJA).

En la tabla 46 se indican los contenidos de ácido ferúlico cuantificados por HPLC en los medios de cultivo de células a partir de callos de estevia cultivados con y sin elicitores.

Tabla 46.- Contenidos de ácido ferúlico (mg/100g PF) analizados por HPLC en cultivos celulares procedentes de callo en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Medias
Control	3.077
Salicílico	3.967
MeJA	3.481

(N=3, control; N=4, Salicílico y N=5, MeJA).

Como se indica en esta tabla no se observan diferencias estadísticas entre los contenidos de este ácido en función de la presencia de elicitores. En el caso del ácido

salicílico también se potencia la síntesis de ácido ferúlico aunque sin diferencias significativas respecto al resto de tratamientos.

La presencia de elicitores en medio de cultivo de células de estevia procedentes de callo produce naringenina chalcona cuyos contenidos medios se expresan en la tabla 47.

Tabla 47.- Contenidos de naringenina chalcona dihexosa (mg/100g PF) analizados por HPLC cultivos celulares procedentes de callo en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	16.712	A
Salicílico	53.408	B
MeJA	15.328	A

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.1$) entre tratamientos (N=3, control; N=4, Salicílico y N=5, MeJA).

Se observa en la tabla 47 una presencia de naringenina chalcona dihexosa más de tres veces superior (test de Tuckey, $p \leq 0.1$) en el medio con ácido salicílico, tanto frente al medio control, como frente al medio con MeJA.

Los resultados obtenidos de los análisis efectuados indican también que los valores medios de ácido p-cumárico se triplican (test de Tuckey, $p \leq 0.1$) en presencia de ácido salicílico en el medio (tabla 48) respecto a los obtenidos en el control y con MeJA.

Tabla 48.- Contenidos de ácido p-cumárico (mg/100g PF) analizados por HPLC cultivos celulares procedentes de callo en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	23.870	A
Salicílico	79.539	B
MeJA	21.771	A

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.1$) entre tratamientos (N=3, control; N=4, Salicílico y N=5, MeJA).

En la tabla 49 se indican los valores medios de Kaempferol rutinósido pentósido en cultivos celulares de estevia en los medios y elicitores ensayados.

Tabla 49.- Contenidos de Kaempferol rutinósido pentósido (mg/100g PF) analizados por HPLC cultivos celulares procedentes de callo en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Significación
Control	1.447	A
Salicílico	1.992	B
MeJA	1.426	A

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.1$) entre tratamientos (N=3, control; N=4, Salicílico y N=5, MeJA).

Se observa en la tabla 49 la acción positiva (test de Tuckey, $p \leq 0.1$) del ácido salicílico en la síntesis de Kaempferol rutinósido pentósido frente al resto de tratamientos.

En la tabla 50 se indican los valores de Kaempferol 3-O- β -D-rutinósido detectados en los ensayos de elicitores considerados.

Tabla 50.- Contenidos de Kaempferol 3-O- β -D-rutinósido (mg/100g PF) analizados por HPLC en cultivos celulares procedentes de callo en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Medias
Control	0.0325
Salicílico	0.0404
MeJA	0.0310

(N=3, control; N=4, Salicílico y N=5, MeJA)

No se observan diferencias estadísticas entre los contenidos de este glucósido de flavonol en función de la presencia de elicitores (tabla 50), con unos valores medios de 0.035 mg/100g de peso fresco.

3.4.2.2.2 Varios subcultivos

En la tabla 51 se incluyen los contenidos de fenoles totales, obtenidos por HPLC, en cultivos celulares tras sucesivos subcultivos con la inclusión de los elicitores ensayados.

Tabla 51.- Fenoles totales (mg/100g PF) obtenidos por HPLC en cultivos celulares tras sucesivos subcultivos en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	31.235	A
Salicílico	83.919	A
MeJA	1209.388	B

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos (N=3, control; N=3, Salicílico y N=2, MeJA).

Se observa en la tabla 51 que la adición al medio de cultivo de MeJA aumenta en más de 14 veces (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) la concentración de fenoles totales respecto a la inducida por el ácido salicílico y en más de 38 en relación al medio en ausencia de elicitores. No se encuentran diferencias significativas entre los niveles de fenoles generados por el ácido salicílico y el control.

En la tabla 52 se indican los valores de ácido 3 cafeoilquínico, 3-CQA, en cultivos celulares tras varios subcultivos con la inclusión de los elicitores ensayados.

Tabla 52.- Contenido de ácido 3 cafeoilquínico (3-CQA) (mg/100g PF) obtenidos por HPLC en cultivos celulares tras varios subcultivos en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Medias	Signif.
Control	0.215	A
Salicílico	0.224	A
MeJA	11.141	B

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.1$) entre tratamientos (N=3, control; N=3, Salicílico y N=2, MeJA).

Como se aprecia en la tabla los contenidos de 3-CQA inducidos por el MeJA son muy superiores, casi 50 veces, (test de Tuckey, $p \leq 0.1$) a los obtenidos con salicílico y en ausencia de elicitores.

En la tabla 53 se indican los valores medios de compuestos derivados de los ácidos clorogénicos en cultivos celulares procedentes de sucesivos subcultivos.

Tabla 53.- Contenidos de los derivados 1 a 5 de ácido clorogénico (mg/100g PF) analizados mediante HPLC en cultivos celulares procedentes de varios subcultivos en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Derivados de CQA	Tratamientos	Media	Significación
1	Control	39.581	A
	Salicílico	111.688	A
	MeJA	1012.716	B
2	Control	3.140	A
	Salicílico	4.943	A
	MeJA	27.469	B
3	Control	4.940	A
	Salicílico	18.640	A
	MeJA	189.836	B
4	Control	3.784	A
	Salicílico	9.841	A
	MeJA	85.527	B
5	Control	3.454	A
	Salicílico	7.330	A
	MeJA	55.769	B

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos (N=3, control; N=3, Salicílico y N=2, MeJA).

En la tabla 53 se observa que la liberación de los derivados 1 a 5 del CQA está significativamente incrementada (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) en los medios que contienen MeJA que multiplican entre 10, caso del derivado 3, y más de 5 veces, caso del 2, sus niveles frente a los obtenidos con ácido salicílico. Estos aumentos son bastante mayores cuando se compara el efecto del MeJA con el control, entre 38, derivado 3, y cerca de 9 veces, derivado 2. No se encuentran diferencias significativas entre los valores obtenidos con ácido salicílico y sin elicitores como se observa en la tabla 53.

En la tabla 54 se observa que el número total de derivados ácido clorogénico también presentan las mismas diferencias significativas, ya descritas para cada derivado en la tabla 53, en favor de los inducidos por la presencia de MeJA, frente a los

niveles cuantificados con ácido salicílico, más de 7 veces menores, y en el control (menores de 23 veces) (test de Tuckey, $p \leq 0.05$, tabla 54).

Tabla 54.- Contenidos totales de los derivados del ácido clorogénico (mg/100g PF) analizados por HPLC en cultivos celulares procedentes de sucesivos subcultivos en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	19.275	A
Salicílico	59.229	A
MeJA	459.872	B

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos (N=3, control; N=3, Salicílico y N=2, MeJA).

En la tabla 55 se indican los contenidos totales de ácido ferúlico en cultivos celulares de estevia procedentes de varios subcultivos con y sin elicitores.

Tabla 55.- Contenidos de ácido ferúlico (mg/100g PF) analizados por HPLC en cultivos celulares procedentes de varios subcultivos en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	2.890	A
Salicílico	3.379	A
MeJA	564.470	B

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.1$) entre tratamientos (N=3, control; N=3, Salicílico y N=2, MeJA).

Se observa en la tabla 55 un contenido de este ácido significativamente mayor, hasta 195 veces superior, al obtenido en el control y 167 frente a los cuantificados en el medio con salicílico (test de Tuckey, $p \leq 0.1$), cuando el medio contiene MeJA.

En la tabla 56 se indican los niveles de naringenina chalcona con dos hexosas obtenidos en presencia de elicitores en medio de cultivo de células de estevia procedentes de sucesivos subcultivos.

Tabla 56.- Contenidos de naringenina chalcona dihexosa (mg/100g PF) analizados por HPLC cultivos celulares procedentes de varios subcultivos en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	3.598	A
Salicílico	8.429	A
MeJA	68.798	B

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.01$) entre tratamientos (N=3, control; N=3, Salicílico y N=2, MeJA).

Se observa en la tabla 56 una presencia de naringenina chalcona dihexosa muy elevada (test de Tuckey, $p \leq 0.01$) en el medio con MeJA, tanto frente al medio control, superior en 19 veces, como frente al medio con ácido salicílico, superior en más de 8 veces.

En la tabla 57 se observa que los valores medios de ácido cumárico son 9 veces superiores (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) a los obtenidos con ácido salicílico en el medio y más de 25 veces a los obtenidos en el medio sin elicitores.

Tabla 57.- Contenidos de ácido p-cumárico (mg/100g PF) analizados por HPLC cultivos celulares procedentes de sucesivos subcultivos en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	3.976	A
Salicílico	11.305	A
MeJA	102.885	B

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos (N=3, control; N=3, Salicílico y N=2, MeJA).

En la tabla 58 se indican los valores medios de Kaempferol rutinósido pentósido en cultivos celulares de estevia obtenidos tras repetidos subcultivos en los medios y elicitores ensayados.

Tabla 58.- Contenidos de Kaempferol rutinósido pentósido (mg/100g PF) analizados por HPLC cultivos celulares procedentes de varios subcultivos en presencia de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	1.252	A
Salicílico	1.323	A
MeJA	2.221	B

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos (N=3, control; N=3, Salicílico y N=2, MeJA).

Se observa en la tabla 58 la acción positiva (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) del MeJA, que duplica los niveles obtenidos con salicílico y sin elicitores en la síntesis de Kaempferol rutinósido pentósido.

En la tabla 59 se indican los valores de Kaempferol 3-O- β -D-rutinósido detectados en los ensayos de elicitores considerados en medio de cultivo celular tras los sucesivos subcultivos efectuados.

Tabla 59.- Contenidos de Kaempferol 3-O- β -D-rutinósido (mg/100g PF) analizados por HPLC en cultivos celulares procedentes de varios subcultivos en presencia de ácido salicílico y MeJA.

Tratamientos	Media	Signif.
Control	0.0291	B
Salicílico	0.0292	B
MeJA	0.0012	A

Letras mayúsculas leídas en columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos (N=3, control; N=3, Salicílico y N=2, MeJA).

A diferencia de los compuestos anteriormente descritos, en este caso los niveles obtenidos con ácido salicílico y sin elicitores de este glucósido de flavonol son muy superiores, más de 24 veces, (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) a los obtenidos con MeJA.

Para finalizar en la tabla 60 se comparan los compuestos detectados y cuantificados en biorreactores Plantform y los obtenidos en los cultivos celulares, tanto procedentes de un primer subcultivo de callo como de sucesivos subcultivos.

Tabla 60.- Comparación entre los valores medios de fenoles (mg/100gPF) cuantificados en medio de cultivo celular y medio de cultivo de plantas completas (Plantform) de estevia.

Compuestos detectados	Biorreactores Plantform	Cultivo celular
Fenoles totales	250.61 A	298.32 A
Ácido 3 cafeoilquínico	3.13 A	1.32 A
TOTAL DERIV. CQA	62.71 A	172.67 B
DERIV. CQA 1	12.18 A	36.95 B
DERIV. CQA 2	5.20 A	11.39 B
DERIV. CQA 3	20.57 A	67.63 B
DERIV. CQA 4	10.69 A	31.50 B
DERIV. CQA 5	7.88 A	21.19 B
DERIV. CQA 6	6.06 A	3.89 A
Ácido Ferúlico	161.80 A	59.51 A
Naringenina-Chalcona-Dihexosa	9.11 A	25.70 B
Ácido p-Cumárico	12.33 A	37.51 B
Kaempferol-Rutinósido-pentósido	1.33 A	1.58 B
Kaempferol 3-O-β-D-rutinósido	0.02 A	0.03 B

Letras diferentes leídas en fila indican diferencias significativas entre ambos tipos de cultivo. (t Student, $p \leq 0.05$). (N=12, Biorreactores Plantform; N=20, Cultivos celulares).

Aunque para el total de los compuestos detectados no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, todos los derivados de los ácidos clorogénicos, excepto el ácido 3 cafeoilquínico y el derivado 6, presentan valores superiores (t Student, $p \leq 0.05$), en los cultivos celulares respecto a los biorreactores. También son superiores en los cultivos celulares los niveles de Naringenina Chalcona dihexosa, ácido p-cumárico, Kaempferol-Rutinósido-pentósido y Kaempferol 3-O-β-D-rutinósido. Es notable el nivel de ácido ferúlico, casi tres veces superior, obtenido en biorreactor en relación al obtenido en los cultivos celulares ensayados, aunque los test estadísticos realizados no indican diferencias significativas.

3.5. Discusión

Los resultados obtenidos en la presente tesis indican un efecto negativo de los dos elicitores usados, ácido salicílico y metil jasmonato en el crecimiento de las plantas cultivadas tanto en medio sólido como en biorreactores Plantform. Este efecto

negativo de los elicitores sobre el desarrollo de las plantas era esperable ya que éstas los producen en condiciones de estrés como se ha indicado repetidamente, lo que concuerda con Koo y cols. (2020), que afirman que altos niveles de ácido salicílico, superior a 1 mM y dependiendo de la especie, regulan negativamente el desarrollo y crecimiento de la planta. Metwally y cols. (2003) ya indicaron que concentraciones de 0.5 mM de salicílico redujeron el peso fresco del tallo de cebada en un 22%. Bagautdinova y cols. (2022) señalaron que el efecto del ácido salicílico en el desarrollo radicular, ha sido ampliamente reportado, demostrando un efecto dependiente de la concentración del mismo en la longitud de la radícula/raíz primaria en especies como pepino y frijol. En el presente trabajo se han encontrado respuestas opuestas al ácido salicílico en la iniciación y desarrollo del sistema radicular con ausencia de enraizamiento en los explantos del medio sólido y un porcentaje cercano al 90% en los de biorreactores. Estos autores destacaron la influencia tanto del genotipo como de la dosis y la interacción del ácido salicílico con otras hormonas (ejemplo, auxinas), en la respuesta de la planta a la exposición al SA y plantearon que cambios morfológicos mediados por SA, como la reducción de la formación de raíces laterales, el enraizamiento adventicio mejorado, la nodulación, la lignificación de la pared celular y el cierre plasmodésmico van dirigidos a impedir directamente la invasión de patógenos en la raíz o facilitar el crecimiento de la planta en condiciones adversas. Según Pasternak y cols. (2019), a niveles bajos, el SA actúa como un regulador del desarrollo radicular, mientras que a niveles altos, actúa como una hormona del estrés. Esta doble función se explica por el hecho de que el shikimato, precursor tanto del IAA como del SA, puede actuar activando el desarrollo de la planta o el modo de protección indistintamente (Pérez – Llorca y cols. 2019).

Al analizar la adición de jasmonatos durante la micropropagación de plantas Kamińska (2021) aportó una amplia bibliografía sobre los efectos de estos compuestos y sus derivados, con funciones tanto promotoras como inhibidoras del desarrollo. Los resultados aportados en esta tesis indican que el MeJA fue el que procuró los efectos más negativos en el desarrollo, sobre todo de la parte aérea a partir de explantos de la variedad de estevia Criolla. Generalmente se presupone que el ácido jasmónico prioriza la defensa. Lakehal y Bellini (2021) indican que el papel de los jasmonatos parece ser dependiente de la especie y otros factores como su relación con los

reguladores endógenos y exógenos, por ejemplo el equilibrio crecimiento-defensa de jasmonatos y ácido giberélico (GA₃) debe considerarse durante el análisis del efecto de los jasmonatos en la efectividad de la propagación, así el crecimiento vegetal inhibido como resultado del tratamiento con AJ probablemente esté relacionado con la supresión de la vía mediada por GA₃ (Hou y cols. 2013; Nguyen y cols. 2019). Otro factor muy importante a destacar es la concentración de AJ en el medio. Cho y cols. (2007) determinaron que el incremento de la dosis de jasmonato inhibió el crecimiento de plantas de arroz, incluso en presencia de 1 μM de AJ, la elongación de la raíz se redujo al doble respecto al control, como también se ha encontrado en este trabajo. En concentraciones de hasta 0.05 μM el AJ aumentó el peso seco de brotes, hojas y raíces desarrollados a partir de explantos de nudos individuales y el número de hojas de *Brassica oleracea* cultivadas en medio MS, sin embargo en concentraciones más altas (1.25–6. μM) el ácido jasmónico inhibió el crecimiento del explanto (Toro y cols. 2003). El MeJA en concentraciones de 0,1 a 1,0 μM también aumentó el peso fresco del explanto, pero en concentraciones más altas disminuyó el número de brotes de tabaco a partir de explantos desarrollados en medio MS suplementado con BA e IAA (Kamińska, 2021). Los análisis histológicos realizados por Biondi y cols, 2001 indicaron que la pérdida de la capacidad de regeneración de los explantos de tabaco en respuesta al tratamiento con MeJA se debió a una fuerte hipertrofia de las células y la desaparición de los meristemoides. En *Arabidopsis thaliana*, el crecimiento foliar inhibido como resultado del tratamiento con MeJA 50 μM se manifestó en la reducción tanto del número como del tamaño celular (Noir y cols. 2013). Miclea y cols. (2020) utilizaron JA y SA para elicitar plantas de *Lavandula angustifolia* Mill cultivadas en medio MS sólido y reportaron que la producción de brotes por explanto fue relativamente alta cuando se cultivaron en presencia de SA, comparable a la obtenida con el medio control. Por el contrario, la producción de brotes fue significativamente menor en los medios que contenían AJ, excepto para 0,1 mg l⁻¹ de AJ+CA (carbón activado). Resultado similar encontramos aquí en las plantas de Criolla cultivadas en medio sólido, donde el tratamiento con 50 μM de JA produjo significativamente (test de Tuckey, p≤0.05) menos brotes laterales (1.40) que el control (1.90) y el tratamiento con 50 μM de SA (2.25). Para los autores anteriores las mediciones correspondientes a

15 mg l⁻¹ SA se ubicaron consistentemente entre las más pequeñas para todos los parámetros evaluados.

Ho y cols. (2020) evaluaron el efecto del metil jasmonato sobre la biomasa y la producción de metabolitos secundarios en el cultivo de raíces adventicias de *Polygonum multiflorum* y *Echinacea purpurea*. El tratamiento con MeJA inhibió el crecimiento de raíces en ambas plantas medicinales después de 7 días de tratamiento. La biomasa, medida en términos de peso seco se redujo un 5.8% en *P. multiflorum* y un 22.97% de *E. purpurea*. En nuestro caso, el peso fresco disminuyó (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) en los tratamientos tanto en medio sólido como en biorreactores, así como el número de brotes laterales en el medio sólido elicitado con MeJA y SA para la variedad Criolla. Por el contrario, con la dosis de MeJA aplicada, encontramos emisión de raíces en medio sólido en un 25 % de las plantas. Xu y cols. (2020) indicaron que el JA y el etileno responden en las plantas a cambios ambientales y esto puede transmitirse a la señalización de auxinas, el principal regulador del desarrollo de las raíces. Al respecto, Zhang y cols. (2019) en su estudio del efecto de las heridas en plantas, concluyeron que las mismas inducen la producción de JA en explantos de hojas en *Arabidopsis thaliana* y activan la expresión del factor de respuesta al etileno (ERF109), que a su vez aumenta la expresión de la antranilato sintasa $\alpha 1$ (ASA1) dentro de las 2 h posteriores al desprendimiento de la hoja. ASA1 induce la biosíntesis de auxina y, por tanto, promueve el enraizamiento de los explantos.

En cuanto a la longitud de los brotes en medios elicitados con MeJA, Rasouli y cols. (2021), manifestaron que con la adición de MeJA, (300 mg l⁻¹), se obtuvieron brotes de estevia significativamente más cortos en comparación con el control. En nuestro caso la menor longitud del tallo (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) de plantas de la variedad Criolla a los 30 días en medio sólido se encontró en los medios que contenían MeJA (2.95 cm respecto al control 9.63 cm). A los 45 días esa tendencia se mantuvo (test de Tuckey, $p \leq 0.05$) (4.95 cm las cultivadas en MeJA y 12.72 cm el control).

Bayraktary cols. (2016) reportaron que el MeJA afectó negativamente el crecimiento de los brotes que fueron pequeños y con hojas necróticas con todas las concentraciones de MeJA estudiadas. Estos autores concluyeron que el efecto negativo de MeJA en el crecimiento de los brotes podría deberse a las altas

concentraciones de este elicitador (50–100 μM) y al prolongado tiempo de exposición (4 semanas).

Los dos elicitores usados en la presente tesis potencian la liberación de distintos compuestos con diferencias claras entre los sistemas de cultivo utilizados y el elicitador empleado. Kim y cols. (2011) indicaron valores de polifenoles totales en extractos acuosos de hojas de estevia de 130.67 μg , sin el uso de elicitores mientras que en el presente estudio se encuentran valores similares (137 μg) a los aportados por estos autores en las plantas desarrolladas en biorreactores, y algo menores, 109 μg en el caso de las cultivadas *in vitro* en medio sólido, pero que aumentaron significativamente con la adición de 50 μM de ácido salicílico y MeJA en el medio de cultivo en el caso del medio sólido y disminuyeron en el caso de las plantas crecidas en biorreactor especialmente en el tratamiento con salicílico.

Centrándonos en la inducción de compuestos de interés farmacológico, objetivo principal de la tesis, Magangana y cols.(2018), utilizando plántulas de estevia procedentes de la germinación de semillas cultivadas en medio MS con diferentes variaciones en los macronutrientes encontraron que la producción de ácidos clorogénicos, como el ácido cafeoilquínico, está influenciada por las variaciones de fosfato en el medio de cultivo. Lu y cols. 2020 señalaron que ya desde el 1834 Robiquet y Bourton encontraron actividad fisiológica en sustancias ácidas obtenidas a partir de granos de café, sin embargo el término “ácido clorogénico” (CGA) se comenzó a utilizar posteriormente por Payen en 1946. Así, los CGAs son compuestos fenólicos producidos por las plantas que se sintetizan a través de la ruta metabólica del fenilpropanoide que se activa como parte de los mecanismos de las células vegetales en defensa del daño celular provocado en la planta por el estrés del corte (Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zevallos, 2012). Las principales fuentes de estos compuestos son los granos de café, como se ha citado, pero también patatas, hojas de boniato berenjena, alcachofas y otros (Nabavi y cols. 2017). También están ampliamente presentes en bebidas preparadas a base de hierbas o frutas (p. ej., manzanas, peras, bayas) y verduras. Molina y cols. (2017) describieron también la presencia de CGA en hojas de estevia cultivadas en condiciones de campo. Según Gil y Wianowska (2017) los CGAs están presentes en todas las partes de las plantas (semillas, raíces, tubérculos, hojas y flores). De acuerdo con estos autores, se cree que son los

constituyentes más característicos de las plantas de la familia Asteraceae, como la equinácea morada (*Echinacea purpurea* L. Moench), la milenrama (*Achillea millefolium* L.), la uña de caballo (*Tussilago farfara* L.), la manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.). La composición cualitativa y cuantitativa de los CGAs es variada y depende también de la etapa fisiológica, las condiciones de almacenamiento y el procesamiento de las plantas.

Los CGAs y sus derivados se absorben y metabolizan por el cuerpo humano, donde los estudios *in vitro* y clínicos indican que tiene un impacto positivo contra enfermedades crónicas degenerativas aportando muchos beneficios para la salud (actividades antimicrobianas, hipoglucemiante (Ma y cols. 2015; Santana-Gálvez y cols. 2019). Es este aspecto cabe destacar la aportación de Chen y cols. 2022, que estudiaron por primera vez la actividad antibacteriana de los ácidos clorogénicos y su capacidad para controlar la formación de biofilm en alimentos contaminados con la bacteria *Yersinia enterocolitica*. En cuanto al mecanismo de acción, se demostró que estos ácidos son capaces de destruir la membrana celular y la integridad de la estructura, aumentar la permeabilidad de la membrana al unirse a *Y. enterocolitica*, provocando la fuga de componentes intracelulares y causando la muerte celular de la bacterias. Estos autores determinaron además que los ácidos clorogénicos inhibieron el crecimiento de *Y. enterocolitica* en la leche, lo que indica su potencial uso en la conservación de este alimento básico. También poseen actividad hepatoprotectora, inmunoprotectora, antiinflamatoria y moduladora de la tensión arterial (Salomone y cols. 2017; Bao y cols. 2018). También combate la obesidad (Huang y cols. 2014) y el síndrome metabólico (Santana-Gálvez et al., 2017). Otras investigaciones demostraron que los CGAs son efectivos para reducir el daño causado por la exposición a la luz ultravioleta (Heck y cols. 2003). El estudio del papel de los CGAs en la prevención de la toxicidad ambiental causada por la contaminación por metales pesados, específicamente el cadmio (Cd), mostró clara actividad en la protección del sistema nervioso central (Kasprzak 2002).

Todo ello debido a su alta actividad antioxidante (Perrone y cols. 2008), ya que estos beneficios para la salud son el resultado de que los ácidos clorogénicos donan átomos de hidrógeno para reducir los radicales libres e inhibir las reacciones de oxidación. Después de donar átomos de hidrógeno se oxidan a sus respectivos

radicales fenoxilo y éstos se estabilizan rápidamente mediante estabilización por resonancia (Liang y Kitts, 2015).

En la presente tesis se detectan y cuantifican diferentes ácidos clorogénicos en todos los ensayos realizados. En la mayoría de los casos sus niveles son mayores en los medios obtenidos de cultivos celulares que en los biorreactores. No obstante, la presencia de MeJA potencia la liberación de ácido 3-cafeoilquínico alrededor de 50 veces cuando se utiliza el biorreactor o tras haber realizado varios subcultivos de células. En el caso del resto de derivados de estos ácidos clorogénicos, la acción de ambos elicitores es más marcada en el caso de los biorreactores donde su adición estimula mucho la liberación de dichos derivados en el medio de cultivo, siempre con especial énfasis en la inducción por MeJA. Este mismo elicitore repite su acción positiva en el caso de cultivos celulares obtenidos tras varios subcultivos, donde el efecto del ácido salicílico no mejora sensiblemente los niveles obtenidos en el control. No obstante, en el caso de cultivos celulares procedentes de un solo subcultivo de callo de estevia es el ácido salicílico el que induce una significativa mayor cantidad de ácidos clorogénicos.

El ácido ferúlico se encuentra enlazado covalentemente a polisacáridos mediante enlaces ésteres en la pared celular incrementando su rigidez y, en consecuencia, la resistencia a su degradación por microorganismos. Este ácido hidroxicinámico, debido a sus propiedades antioxidantes, se utiliza como componente de bloqueadores solares ya que reduce los efectos negativos de la radiación ultravioleta (Mori y cols. 2019). El ácido ferúlico se utiliza en la industria farmacéutica por sus propiedades antiinflamatorias y en pacientes oncológicos como estimulante en la producción de anticuerpos (Mercato y cols. 2022). En el presente trabajo no se han encontrado diferencias significativas entre los contenidos de este ácido en cultivos celulares y biorreactores. Por otro lado, la presencia de MeJA en los medios usados en biorreactores y en los cultivos celulares finales tras varios subcultivos disparan los contenidos de ferúlico, lo que sugiere que ambos sistemas con el medio y concentración de MeJA utilizados pueden ser de gran utilidad para la producción industrial de este compuesto de interés.

La naringenina chalcona se sintetiza en las células vegetales a partir de 4-cumaroil-CoA y malonil-CoA por la chalcona sintasa (CHS), enzima que controla la

biosíntesis de flavonas. La naringenina chalcona puede ciclar a su vez mediante la chalcona isomerasa a naringenina que es el precursor común para la biosíntesis de la mayor parte de los flavonoides (del Río y cols. 2020), que junto con las flavonas son de gran interés en medicina como se ha indicado. En el presente estudio la naringenina chalcona con dos hexosas referenciada como nuevo metabolito por Moco y cols. (2006) y descrita como flavonoide por Adato y cols. (2009), ambos en tomate, se obtuvo en mayor cantidad en los cultivos celulares frente a los biorreactores con una influencia positiva del MeJA en sus mayores niveles tanto en biorreactores como en cultivos celulares obtenidos tras varios subcultivos, mientras que el ácido salicílico indujo una significativa mayor síntesis de naringenina chalcona dihexosa en el caso de cultivos celulares a partir de callo.

El ácido p-cumárico se encuentra en una amplia variedad de plantas comestibles como el cacahuete, alubias, tomate, zanahoria, ajo y en el grano de cebada. Es un constituyente del polen de la miel y también se encuentra en el vino y en el vinagre.

El ácido-p-cumárico se sintetiza por dos vías: partir del ácido cinámico por la acción de la enzima dependiente del citocromo P450, ácido 4-cinámico hidroxilasa (C4H) y a partir de L-tirosina por la acción de la tirosina amoníaco liasa (TAL) (del Río y cols. 2020). El ácido p-cumárico es un precursor importante de varios compuestos naturales, como los flavonoides y los estilbenos. Es ampliamente utilizado en las industrias de la biomedicina, la alimentación, la nutrición y el cuidado de la salud, debido a que posee actividad antimicrobiana y anticancerígena y tiene muchas funciones fisiológicas (Boz, 2015). Al igual que en casos anteriores sus contenidos son mucho mayores en los medios obtenidos de cultivos celulares que en los de biorreactores triplicando sus niveles en los primeros respecto a los segundos. Los valores cuantificados de ácido p-cumárico son significativamente altos en presencia de los dos elicitores ensayados en biorreactores destacando la acción del MeJA que también mejora claramente la producción de este compuesto en los medios donde se han cultivado repetidamente células de estevia, donde, por el contrario, el ácido salicílico no mejora la producción respecto al control sin elicitores. De nuevo en medios procedentes de un primer cultivo de células a partir de callo es el ácido salicílico el que aumenta de manera significativa la producción de p-cumárico.

El Kaempferol es un flavonol que ha sido aislado de distintas fuentes vegetales desde el té verde hasta manzanas pasando por avellanas y uvas. Es altamente soluble en medio acuoso. Se sintetiza a partir de naringenina que proviene de la isomerización de la naringenina chalcona por acción de la enzima chalcona isomerasa. Posteriormente, la naringenina se hidroxila a flavanona 3-hidroxilasa para dar dihidrokaempferol. La flavonol sintasa concluye la ruta, deshidrogenando al precursor con oxígeno molecular. El Kaempferol tiene propiedades antidepresivas (Hosseinzadeh y cols. 2020) y junto a otros dos flavonoides, quercetina y miricetina, reducen el cáncer pancreático (Nöthlings y cols. 2007) poseyendo también un efecto protector frente al cáncer de pulmón (Sonoki y cols. 2017) y leucemia (Marfe y cols. 2009). En nuestros medios de cultivo se han cuantificado dos derivados de Kaempferol, el Kaempferol-rutinósido-pentósido y el Kaempferol 3-O- β -D-rutinósido. En ambos casos sus producciones han sido mayores en medio celular que en biorreactores. No obstante, en el caso del Kaempferol-rutinósido-pentósido ha sido en los medios obtenidos bajo cultivo en biorreactor donde la acción de los dos elicitores ha sido más patente superando con ambos la producción de este compuesto frente a los medios control sin elicitores, producción que, a su vez, ha sido significativamente mayor en presencia de MeJA. También este elicitor ha inducido la liberación de Kaempferol-rutinósido-pentósido en mayor concentración en cultivos celulares tras varios subcultivos de células de estevia. Por el contrario, como ocurriera para la mayoría de los compuestos descritos anteriormente, ha sido el cultivo celular a partir de un primer subcultivo de callo adicionado con ácido salicílico el que ha producido mayor cantidad de Kaempferol-rutinósido-pentósido. Sin embargo, en este último sistema de cultivo el ácido salicílico no ha procurado una mayor producción de Kaempferol 3-O- β -D-rutinósido siendo los niveles mucho menores que los encontrados para el otro tipo de Kaempferol, y sin diferencias entre los tres tratamientos ensayados. Por otro lado, la producción de esta última forma de Kaempferol, tanto en los medios obtenidos en biorreactores como en los obtenidos tras repetidos cultivos celulares, no se ha mejorado con la inclusión de elicitores en el medio de cultivo perjudicando incluso su síntesis la presencia de MeJA.

En resumen los tres sistemas de cultivo ensayados con mismos tipos y concentración de elicitores han producido una amplia gama de compuestos a partir de

distinto material vegetal de estevia con marcado interés farmacológico. Aunque se pueden destacar ciertas particularidades como, en general, la mejor respuesta al MeJA en biorreactores y en el caso de cultivos celulares obtenidos tras varios subcultivos, permitiendo en el caso de los biorreactores Plantform una mejor discriminación entre los dos elicitors y el control. Por el contrario, se ha inducido una mayor liberación de estos compuestos por el ácido salicílico en el caso de un solo subcultivo lo que sugiere que una mayor exposición a la presencia de ambos elicitors favorece la acción del MeJA sobre el ácido salicílico que ofrecería una mejor respuesta en una primera fase de la elicitación. Por todo ello, el empleo de cualquiera de los sistemas de cultivo puede ser de aplicación industrial en función de las posibilidades de la planta de producción para la obtención de estos metabolitos secundarios de interés en la industria farmacéutica.

3.6. Bibliografía

Abd El-Mawla, Ahmed M. A., Farag, Salwa F., Beuerle, Till. 2011. Cinnamyl alcohols and methyl esters of fatty acids from *Wedelia prostrata* callus cultures. *Natural Product Research*, 25 (1): 45-52.

DOI 10.1080/14786419.2010.482937

Abrankó L. and Clifford, M. N. 2017. An unambiguous nomenclature for the acylquinic acids commonly known as chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18), 3602– 3608. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00729>

Adato A., Mandel T., Mintz-Oron S., Venger I., Levy D., Yativ M., Dominguez E., Wang Z.H., De Vos R.C.H., Jetter R., Schreiber L., Heredia A., Rogachev, I. and Aharoni A. 2009. Fruit-surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a SIMYB12-regulated transcriptional network. *PLoS Genet* 5 (12):e1000777.

doi: 10.1371/journal.pgen.1000777

Ahmad M. A., Deng X., Adeel M., Rizwan M., Shakoor N., Yang Y. and Javed R. 2021. Influence of calcium and magnesium elimination on plant biomass and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, May, 1–9. <https://doi.org/10.1002/bab.2263>

Ali M, Abbasi B.H. and Ali G.S. 2015. Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 120:1099–1106

Bagautdinova Z. Z., Omelyanchuk N., Tyapkin A. V., Kovrizhnykh V. V., Lavrekha V. V. and Zemlyanskaya E. V. 2022. Salicylic Acid in Root Growth and Development.

International Journal of Molecular Sciences, 23(4), 1–26.
<https://doi.org/10.3390/ijms23042228>

Baek N.I., Kennelly E.J., Kardono L.B.S., Tsauri S., Padmawinata K., Soejarto D.D. and Kinghorn A.D. 1994. Flavonoids and a proanthocyanidin from rhizomes of *Selliguea feei.*, *Phytochemistry*: 36, (2): 513-518.

Bao L., Li J., Zha D., Zhang L., Gao P., Yao T. and Wu X. 2018. Chlorogenic acid prevents diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress and inflammation through modulation of the Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathways. *International Immunopharmacology*, 54, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.11.021>

Basharat S., Huang Z., Gong M., Lu X., Ahmed A., Hussain I., Li J., Du G. and Liu, L. 2021. A review on current conventional and biotechnical approaches to enhance biosynthesis of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 30 (November), 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.ciche.2020.10.018>

Bayraktar M., Naziri E., A. Ismail H., Karabey F., I, Esra; Akyol B., Bedir E. and Gurel, A. 2016. Elicitor induced stevioside production, in vitro shoot growth, and biomass accumulation in micropropagated *Stevia rebaudiana*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 127: 289-300.
DOI: 10.1007/s11240-016-1049-7.

Biondi S., Scaramagli S., Capitani F., Altamura M.M. and Torrigiani P. 2001. Methyl jasmonates upregulates biosynthetic gene expression, oxidation and conjugation of polyamines, and inhibits shoot formation in tobacco thin layers. *J Exp Bot* 52:231–242.
<https://doi.org/10.1093/jexbot/52.355.231>

Bouallègue A., Souissi F., Nouairi I., Souibgui M., Abbes Z. and Mhadhbi H. 2019. Physiological and biochemical changes modulated by seeds' priming of lentil (*Lens culinaris* L.) under salt stress at germination stage. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 18(5), 27–38. <https://doi.org/10.24326/asphc.2019.5.3>

Boz H. 2015. p-Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. *International Journal of Food Science and Technology* 50 (11) :2323-2328.

Cai J., Ma Y., Hu P.; Zhang Y., Chen J. and Li, X. 2017. Elicitation of furanocoumarins in *Changium smyrnioides* suspension cells. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 130: 1–12.

Coste A., Vlase L., Halmagyi A., Deliu C. and Coldea G. 2011. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 106:279–288.

Curtin C., Zhang W. and Franco, C. 2003. Manipulating anthocyanin composition in *Vitis vinifera* suspension cultures by elicitation with jasmonic acid and light irradiation. *Biotechnology Letters* 25, 1131–1135.

Chen K., Peng C., Chi F., Yu C., Yang Q. and Li Z. 2022. Antibacterial and Antibiofilm Activities of Chlorogenic Acid Against *Yersinia enterocolitica*. *Frontiers in Microbiology*, 13(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.885092>

Cho K., Agrawal G.K., Shibato J., Jung Y.H., Kim Y.K., Nahm B.H., Jwa N.S., Tamogami S., Han O., Kohda K., Iwahashi H. and Rakwal R. 2007. Survey of differentially expressed proteins and genes in jasmonic acid treated rice seedling shoot and root at the proteomics and transcriptomics levels. *J Proteome Res* 6:3581–3603. <https://doi.org/10.1021/pr070358v>

del Río J.C., Rencoret J., Gutiérrez A., Elder T., Kim H. and Ralph J. 2020. Lignin monomers from beyond the canonical monolignol biosynthetic pathway: Another brick in the wall. *ACS Sustain Chem Eng* 8: 4997–5012.

Delker, C; Stenzel, I., Hause, B., Miersch O., Feussner I. and Wasternack, C. 2006. Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* - Enzymes, products, regulation. *PLANT BIOLOGY* 8 (3):297-306.

García Martínez E.M., Fernández Segovia I. y Fuentes López A. 2015. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. <http://hdl.handle.net/10251/52056>

Gil M., and Wianowska D. 2017. Chlorogenic acids – their properties, occurrence and analysis. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Sectio AA – Chemia*, 72(1), 61. <https://doi.org/10.17951/aa.2017.72.1.61b>

Golkar P., Moradi M. and Garousi G.A. 2019. Elicitation of Stevia glycosides using salicylic acid and silver nanoparticles under callus culture. *Sugar Technol* 21(4):569-577.

Gumerova E.A., Akulov A.N. and Rummyantseva N.I. 2015. Effect of methyl jasmonate on growth characteristics and accumulation of phenolic compounds in suspension culture of tartary buckwheat. *Russ J Plant Physiol* 62:195-203. <https://doi.org/10.1134/S1021443715020077>

Heck D.E., Vetrano A.M., Mariano T.M. and Laskin, J.D. 2003. UVB light stimulates production of reactive oxygen species—Unexpected role for catalase. *J. Biol. Chem.*, 278, 22432–22436.

Ho T.T., Murthy H.N. and Park S.Y. 2020. Methyl Jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures. *Intl J Mol Sci* 21:716.

Hosseinzadeh E; Hassanzadeh A., Marofi F., Alivand M.R., Reza H, and Solali, S. 2020. Flavonoid-Based Cancer Therapy: An Updated Review. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 20 (12):1398-1414.

Hou X.L., Ding L.H. and Yu H. 2013. Crosstalk between GA and JA signaling mediates plant growth and defense. *PLANT CELL REPORTS* 32 (7): 1067-1074.

Kaminska M. 2021. Role and activity of jasmonates in plants under in vitro conditions. *Plant, Cell Tissue and Organ Culture* 146:425-447.

Kasprzak K.S., 2002. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis.. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, 32, 958–967.

Kehie M., Kumaria S. and Tandon P. 2016. Biotechnological enhancement of capsaicin biosynthesis in cell suspension cultures of Naga King Chili (*Capsicum chinense* Jacq.). *Bioprocess Biosyst Eng* 39:205–210.

Kim I.S., Yang M., Lee O.H. and Kang S.N. 2011. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT–Food Sci. Technol.* 44, 1328–1332.

Koo Y.M., Heo A.Y. and Choi, H.W. 2020. Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator. *Plant Pathology Journal*, 36(1), 1–10. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.12.2019.0295>

Lakehal A. and Bellini C. 2021. Jasmonate inhibits adventitious root initiation through repression of CKX1 and activation of RAP2.6L transcription factor in Arabidopsis. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY*, 72 (20):8107-7118. DOI 10.1093/jxb/erab358.

Liang N. and Kitts D.D. 2016. Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Nutrients* 8:16. Doi:103390/nu8010016

Lu H., Tian Z., Cui Y., Liu Z. and Ma X. 2020. Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3130–3158. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12620>

Ma Y.J., Gao M.M. and Liu D.X. 2015. Chlorogenic Acid Improves High Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice. *Pharmaceutical Research* 32 (4) :1200-1209.

Marcato D.C., Spagnol C.M., Salgado H.R.N., Borges V.L. and Correa M.A. 2022. New and potential properties, characteristics, and analytical methods of ferulic acid: A review. *Braz. J. Pharm. Sci.* 58. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902020000118747>

Marfe G., Tafani M., Indelicato M., Sinibaldi-Salimei P., Reali V., Pucci B., Fini M. and Russo M.A. 2009. Kaempferol Induces Apoptosis in Two Different Cell Lines Via Akt Inactivation, Bax and SIRT3 Activation, and Mitochondrial Dysfunction. *Journal of Cellular Biochemistry*. 106:643–650.

Matter M., Hanafy M. and Aly U. 2017. Effect of methyl jasmonato and mannitol application on growth and eugenol content in callus cultures of carnation. *Plant Tiss Cult Biotech* 27:227-240.

<https://doi.org/10.3329/ptcb.v27i2.35028>

Mejía-Espejel L., Robledo-Paz A., Lozoya-Gloria E., Peña-Valdivia C.B. and Carrillo-Salazar J.A. 2018. Elicitors on steviosides production in *Stevia rebaudiana* Bertoni calli. *Sci Hortic.* ;242:95–102.

Mendoza D., Cuaspud O., Arias J.P., Ruiz O. and Arias M. 2018. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnol Rep* 19:e00273

Metwally A., Finkemeier I., Georgi M. and Dietz, K.J. 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol.* 132:272-281.

Miclea I., Suhani A., Zahan M. and Bunea A. 2020. Effect of jasmonic acid and salicylic acid on growth and biochemical composition of in-vitro-propagated *Lavandula angustifolia* Mill. *Agronomy* 10:1722. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111722>

Molina-Calle M, Priego-Capote F, Luque de Castro MD. Characterization of Stevia leaves by LC-QTOF MS/MS analysis of polar and non-polar extracts. *Food Chem.* 2017 Mar 15;219:329-338. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.148. Epub 2016 Sep 24. PMID: 27765234.

Moco S., Bino R.J., Vorst O., Verhoeven H.A., de Groot J., van Beek T.A., Vervoort J. and de Vos C.H.R. 2006. A liquid chromatography mass spectrometry based metabolome database for tomato. *Plant Physiology*, 141: 1205–1218.

Moharramnejad S., Azam A. T., Panahandeh J., Dehghanian, Z. and Ashraf, M. 2019. Effect of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid on In Vitro Growth, Stevioside Production, and Oxidative Defense System in *Stevia rebaudiana*. *Sugar Tech* 21 (6): 1031-1038.

Mori T., Tsuchiya R., and Tanaka T. 2019. Solubilization of ultraviolet absorbers by cyclodextrin and their potential application in cosmetics. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 93:91–96.

<https://doi.org/10.1007/s10847-018-0846-5>

Muñoz Jáuregui, A.M., Alvarado-Ortiz Ureta, C., Blanco Blasco, T. Castañeda Castañeda, B. Ruiz Quiroz, J. y Alvarado Yarasca, A. 2014. Determination of phenolic compounds, total flavonoids and antioxidant activity in Peruvian honey from different flower's sources. *Rev. Soc. Quím. Perú.* 80 (4): 287-297.

Nabi N., Singh S. and Saffeullah P. 2021. Responses of in vitro cell cultures to elicitation: regulatory role of jasmonic acid and methyl jasmonate: a review. *In Vitro Celular&Developmental Biology – Plant* 57: 341-355.

Namdeo A., Patil S. and Fulzele D.P. 2002. Influence of fungal elicitors on production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol Prog* 18:159–162.

Naziam M, and Sabattini, P. 2021. Traditional in vitro strategies for sustainable production of bioactive compounds and manipulation of metabolomic profile in medicinal, aromatic and ornamental plants. *Planta* 254:111
<https://doi.org/10.1007/s00425-021-03771-5>

Nguyen H.T., To H.T.M., Lebrun M., Bellafiore S. and Champion, A. 2019. Jasmonates-the Master Regulator of Rice Development, Adaptation and Defense. *Plants* 8(9), 339.
<https://doi.org/10.3390/plants8090339>

Nöthlings U., Murphy S.P, Wilkens L.R., Henderson B.E. and Kolone L.N. 2007. Flavonols and Pancreatic Cancer Risk. *American Journal of Epidemiology* 166(8): 924–931.
Doi10.1093/aje/kwm172

Nabavi S.F., Tejada S., Setzer W.N., Gortzi O., Sureda A., Braidly N. and Nabavi, S.M. 2017. Chlorogenic acid and mental diseases: From chemistry to medicine. *Current neuropharmacology*, 15(4), 471–479.
<https://doi.org/10.2174/157015914666160325120625>

Noir S., Bömer M., Takahashi N., Ishida T., Tsui T.L., Balbi V., Shanahan H., Sugimoto K. and Devoto A. 2013. Jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoreduplication while maintaining a potential stand-by mode. *Plant Physiol* 161:1930–1951. <https://doi.org/10.1104/pp.113.214908>

Pandey H., Pandey P., Singh S., Gupta R. and Banerjee S. 2015. Production of anti-cancer triterpene (betulinic acid) from callus cultures of different *Ocimum* species and its elicitation. *Protoplasma* 252:647–655

Pasternak T., Groot E.P., Kazantsev F.V., Teale W., Omelyanchuk N., Kovrizhnykh V., Palme K. and Mironova V.V. 2019. Salicylic Acid Affects Root Meristem Patterning via Auxin Distribution in a Concentration-Dependent Manner. *Plant Physiol.* 2019, 180, 1725–1739.

Perez-Llorca M., Casadesus A., Muller M. and Munne-Boseh, S. 2015. Inter-individual and sun orientation driven variability reveals antagonistic salicylate and jasmonate accumulation in white-leaved rockrose. *Environmental and Experimental Botany* 162:115-124.

Perrone D., Farah A., Donangelo C.M., De Paulis T. and Martin P.R. 2008. Analytical, nutritional and clinical methods: Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. *Food Chem* 106:859–867

Pi Y., Jiang K., Hou R., Gong Y., Lin J., Sun X. and Tang K. 2010. Examination of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in *Camptotheca acuminata* plant and cell

culture, and the affected yields under several cell culture treatments. *Biocell* 34:139–143.

Ram M., Prasad K.V., Singh S.K., Hada B.S. and Kumar S. 2013. Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of *Rosa hybrida* L. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 113:459–467.

Rasouli D., Werbrouck S., Maleki B., Jafary H. and Schurdi-Levraud V. 2021. Elicitor-induced in vitro shoot multiplication and steviol glycosides production in *Stevia rebaudiana*. *South African Journal of Botany* 137: 265-271.
DOI 10.1016/j.sajb.2020.10.023

Robledo-Paz A., Vázquez-Sánchez M N., Adame-Alvarez, R. M. and Jofre-Garfias S.E. 2006. Callus and suspension culture induction, maintenance, and characterization. In: *Methods in Molecular Biology*, vol 318: *Plant Cell Culture Protocols*, Second Edition. V.M. Loyola-Vargas & F. Vázquez-Flota (eds). Humana Press Inc, Totowa NJ, pp 59-70.

Salomone F., Galvano F. and Li Volti, G. 2017. Molecular bases underlying the hepatoprotective effects of coffee. *Nutrients*, 9(1), 85
<https://doi.org/10.3390/nu9010085>

Sánchez-Rodríguez E., Ruiz J. M., Ferreres, F. and Moreno, D. A. 2012. Phenolic profiles of cherry tomatoes as influenced by hydric stress and rootstock technique. *Food Chemistry*, 134(2), 775–782. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.180>

Santana-Gálvez J., Cisneros-Zevallos L. and Jacobo-Velázquez A.D. 2017. Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules* . <https://doi.org/10.3390/molecules22030358>

Sellapan P., Rohani E.R. and Noor N.M. 2018. Sesquiterpene production in methyl Jasmonate-induced *Persicaria minor* cell suspension culture. *Sains Malaysiana* 47:3051–3059.

Singh, N., Yadav, K. and Kumari, S. 2011. Metabolic Changes During Differentiation in Callus Cultures of *Stevia Rebaudiana* (Bertonii). *Journal of Phytology*, 3(3), 63–67.

Sivanandhan G., Dev G.K., Jeyaraj M., Rajesh M., Arjunan A., Muthuselvam M., Manickavasagam M., Selvaraj N. and Ganapathi A. 2013. Increased production of withanolide A, withanone, and withaferin A in hairy root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. elicited with methyl jasmonate and salicylic acid. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 114:121–129.

Striedner J., Geissler, S., Czygan, F.C. and Braunegg G. 1991. Contributions to the biotechnological production of sweeteners from *Stevia rebaudiana* bertonii .3. Accumulation of secondary metabolites by means of a precursor and by elicitation of cell-cultures. *Acta biotechnologica* 11 (5): 505-509.

Sonoki H., Tanimae A., Endo S., Matsunaga T., Furuta T., Ichihara K. and Ikari A. 2017. Kaempferol and Luteolin Decrease Claudin-2 Expression Mediated by Inhibition of STAT3 in Lung Adenocarcinoma A549 Cells. *NUTRIENTS* 9(6), 597. <https://doi.org/10.3390/nu9060597>

Taurino M., Ingrosso I., D' Amico L., Domenico S.D., Nicoletti I., Corradini D., Santino A. and Giovinazzo G., 2015. Jasmonates elicit different sets of stilbenes in *Vitis vinifera* cv. Negramaro cell cultures. *SpringerPlus* 4, 49.

Toro F.J., Martin-Closas L. and Pelacho A.M. 2003. Jasmonates promote cabbage (*Brassica oleracea* L. var Capitata L.) root and shoot development. *Plant and soil* 255 (1): 77-83.

Wungsintaweekul J., Choo-malee J., Charoonratana T. and Keawpradub N. 2012. Methyl jasmonate and yeast extract stimulate mitragynine production in *Mitragyna speciosa* (Roxb.) Korth. shoot culture. *Biotechnol Lett* 34:1945–1950.

Xu A., Zhan J.C. and Huang W.D. 2015. Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Plant Cell Tissue and Organ culture* 122, 197-211.

Xu P., Zhao P. X., Cai X. T., Mao J.L., Miao Z. Q. and Xiang, C. B. 2020. Integration of Jasmonic Acid and Ethylene Into Auxin Signaling in Root Development. *Frontiers in Plant Science*, 11(March), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00271>

Yamamoto Y., Kinoshita Y., Watanabe S. and Yamada Y. 1989. Anthocyanin production in suspension cultures of high producing cells of *Euphorbia millii*. *Agric Biol Chem* 53:417–423.

Zafar N., Mujib A., Ali M., Tonk D. and Gulzar B. 2017. Aluminum chloride elicitation (amendment) improves callus biomass growth and reserpine yield in *Rauvolfia serpentina* leaf callus. *Plant Cell Tiss Org Cult* 130:357–368.

Zaheer M. and Giri C.C. 2015. Multiple shoot induction and jasmonic versus salicylic acid driven elicitation for enhanced andrographolide production in *Andrographis paniculata*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 122:553–563.

Zare N., Farjaminezhad R., Asghari-Zakaria R. and Farjaminezhad M. 2014. Enhanced thebaine production in *Papaver bracteatum* cell suspension culture by combination of elicitation and precursor feeding. *Nat Prod Res* 28:711–717.

Zhang G., Zhao F., Chen L., Pan Y., Sun L. and Bao, N. 2019. Jasmonate- mediated wound signalling promotes plant regeneration. *Nat. Plants* 5, 491– 497. doi: 10.1038/s41477-019-0408-x

Zhang W., Curtin C., Kikuchi M. and Franco C. 2002. Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science* 162, 459-468.

Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 1999; 64: 555 – 559.

Capítulo 4

Discusión general

4. Capítulo 4. Discusión general

La presente tesis tiene como objetivo principal la obtención y caracterización de metabolitos secundarios con posible aplicación en farmacología y, por tanto distintos a los ya conocidos y explotados edulcorantes bajos en calorías por la que es conocida esta especie. En consecuencia, su desarrollo gira en torno a dos objetivos derivados del principal: la optimización del material vegetal de partida para implementar sistemas de producción a gran escala de dichos metabolitos de interés y en segundo lugar la adición de elicitores al cultivo con objeto de estimular la obtención dirigida de los compuestos citados. En relación con el primer objetivo, según se ha comentado, las plántulas de Criolla se demuestran como las más eficientes para casi todas las variables biométricas en comparación con las de Morita III, lo que ha motivado la selección del material vegetal de esta variedad para acometer el resto de ensayos de la presente Tesis, encontrándose los valores más altos generalmente cuando el cultivo ha sido en medio sólido y con sustrato MS, aunque sin diferencia respecto al medio G en la producción de biomasa, por lo que ambos medios se han usado en ensayos ulteriores en este trabajo. No obstante, el cultivo en biorreactor Plantform ha permitido un desarrollo adecuado de los explantos de ambas variedades. Los resultados obtenidos demuestran la mejor eficiencia de la micropropagación de estevia con el uso de sustratos y sistemas de cultivo alternativos manteniendo la calidad de las plantas obtenidas que se completa con un estudio del estado nutricional de las mismas, curiosamente inexistente hasta ahora en la literatura esta especie, hecho atribuible a la focalización casi exclusiva hacia la obtención de edulcorantes del que ha sido objeto la estevia. En consecuencia, se considera que los niveles de nutrientes aportados y discutidos aquí deben ser una referencia para futuras investigaciones sobre los valores nutricionales de la estevia micropropagada a partir de yemas. Esta nueva información sobre los macro y micronutrientes de las plantas de estevia cultivadas en medio controlado permite constatar una correlación directa entre los nutrientes de los medios de cultivo y su contenido en hoja y poner de

manifiesto, entre otras conclusiones, la ausencia de correlaciones entre los pigmentos fotosintéticos y las concentraciones de iones magnesio en el medio o en el contenido foliar de este macroelemento a diferencia de lo indicado por Sardoei y cols. (2014), probablemente debido a limitada capacidad fotosintética que tienen las plantas cultivadas *in vitro* a causa de la presencia de hidratos de carbono al medio, producto final de la fotosíntesis.

Respecto al cultivo de callo, como material de partida para alcanzar los cultivos celulares y obtener metabolitos secundarios, con las condiciones ensayadas en el presente trabajo se han obtenido porcentajes de formación de callo cercanos al 100% ya sea en luz o en oscuridad, aunque se ha elegido la oscuridad al obtenerse mayor peso fresco de callo, más friable y con una coloración blanco amarillenta que demuestran su alta calidad, todo ello obtenido adicionando ANA y kinetina al medio de cultivo, éste último regulador a dosis elevadas.

Una vez optimizada la obtención del material vegetal de partida, como segundo objetivo, se ha propuesto la introducción en el sistema de cultivo de los elicitores ácido salicílico y MeJA considerados los más adecuados de acuerdo con la bibliografía existente. La presencia de estos elicitores, a pesar de haber mermado el desarrollo de la planta cuando se ha usado ésta como material de partida, ha potenciado, en la mayoría de los casos multiplicada por varias decenas de veces respecto al control sin elicitores, la liberación al medio de una amplia gama de metabolitos secundarios, fundamentalmente por la activación de las rutas de los ácidos cinámicos y de los flavonoides. Se han obtenido ácidos clorogénicos, caso del ácido 3 cafeoilquínico, y precursores de flavonoles o incluso estos mismos flavonoles o flavonoides, todos con marcadas propiedades beneficiosas para la salud ya sean antimicrobianas, ácidos 3 cafeoilquínico o p-cumárico; potenciadoras del sistema inmunológico, como los derivados de los ácidos clorogénicos o ácido ferúlico; antidepresivas, Kaempferol; contra enfermedades derivadas de disfunciones de páncreas e hígado, ácido 3 cafeoilquínico o en todos los casos con alta efectividad contra una amplia gama de cánceres.

4.1. Bibliografía

Sardoei A.S., Rahbarian P. and Shahdadneghad M. 2014. Evaluation chlorophyll contents assessment on three indoor ornamental plants 717 with plant growth regulators. European J Exper Biol 4(2):306–310.

Capítulo 5

Conclusiones

Conclusions

5. Capítulo 5. Conclusiones

1.- La mejor combinación para una adecuada micropropagación a partir de yemas de las variedades de estevia Criolla y Morita III es Criolla utilizando medio de cultivo de Murashige Skoog sólido.

2.- El biorreactor fomenta un buen desarrollo de explantos de Criolla y Morita III, pero es necesario considerar el medio de cultivo, así los explantos de Criolla deben ser micropropagados en Murashige Skoog y Morita III en ese mismo medio con reducción en los compuestos nitrogenados.

3.- La eficiencia de la micropropagación convencional de estevia es mejorable mediante el uso de los sustratos y sistemas de cultivo alternativos aquí empleados sin ningún efecto negativo para el estado fisiológico y nutricional de las plántulas, extensible para las dos variedades probadas, aunque con diferencias entre ellas.

4.- Se obtiene una nueva e interesante información sobre la composición foliar de macro y micronutrientes de las plántulas obtenidas.

5.- Tras 40 días de cultivo en las condiciones ensayadas se obtienen porcentajes de formación de callo cercanos al 100% independientemente de las condiciones de luz y oscuridad, siendo los callos más friables y de mayor peso los obtenidos en presencia de ácido naftalen acético y con 2 mg l^{-1} de Kinetina en oscuridad.

6.- Los dos sistemas de cultivo usados para plantas micropropagadas, callos y células con adición de $50 \text{ } \mu\text{M}$ tanto de ácido salicílico como de metil jasmonato, producen una amplia gama de metabolitos secundarios con demostrado interés en farmacología.

7.- En biorreactores Plantform el metil jasmonato a la concentración citada incrementa, respecto a la ausencia de elicitores, en 22 veces la liberación de fenoles

totales, en 50 el ácido 3-cafeoilquínico, en 6 los derivados de ácidos clorogénicos y la naringenina chalcona y en 8 el ácido p-cumárico.

8.- En el caso de cultivos celulares obtenidos tras sucesivos subcultivos esa concentración de metil jasmonato acrecienta en más de 195 veces la concentración de ácido ferúlico, en 39 la de fenoles totales, en 24 la de los derivados de los ácidos clorogénicos, en más de 25 la de ácido p-cumárico y Kaempferol rutinósido pentosa y en 19 la de naringenina chalcona.

9.- Por el contrario, se induce una mayor liberación de estos compuestos, aunque en menos cantidad, por el ácido salicílico en el caso de cultivos celulares tras un primer subcultivo, sugiriendo que una mayor exposición a ambos elicitores favorece la acción del metil jasmonato, mientras que el ácido salicílico ofrece una mejor respuesta en fases muy tempranas de la elicitación.

10.- En consecuencia, cualquiera de los sistemas de cultivo empleados, incluidos los biorreactores, puede ser de aplicación industrial en función de las posibilidades de la planta de producción para la obtención a gran escala de estos metabolitos secundarios de interés en la industria farmacéutica.

Conclusions

1.- The best combination for suitable micropropagation from buds of the Criolla and Morita III stevia varieties is Criolla using solid Murashige Skoog culture medium.

2.- The bioreactor supports a good explant development of Criolla and Morita III, but the culture medium is significantly linked to the variety. Thus the explants of Criolla must be micropropagated in Murashige Skoog while Morita III requires the same medium with reduction in nitrogenous compounds.

3.- The efficiency of conventional stevia micropropagation can be improved through the use of alternative substrates and culture systems used here without any negative effect on the physiological and nutritional status of the plantlets. This applies, for the two varieties tested, despite the recorded differences between them.

4.- New and interesting information is attained on the foliar composition of macro and micronutrients of the obtained plantlets.

5.- After 40 days of culture under the conditions tested, percentages of callus formation close to 100% are obtained regardless of light and dark conditions, being more friable and heavier calli those obtained in the presence of naphthalene acetic acid and with 2 mg l^{-1} of Kinetin in the dark.

6.- The two culture systems used for micropropagated plants, calli and cells with the addition of $50 \text{ }\mu\text{M}$ of both salicylic acid and methyl jasmonate, produce a wide range of secondary metabolites with proven interest in pharmacology.

7.- In Plantform bioreactors, methyl jasmonate at the aforementioned concentration increases, with respect to the absence of elicitors, the release of total phenols by 22 fold, 3-caffeoylquinic acid by 50, derivatives of chlorogenic acids and naringenin chalcone by 6 and p-coumaric acid by 8.

8.- In the case of cell cultures obtained after successive subcultures, this concentration of methyl jasmonate increases the concentration of ferulic acid by more than 195 times, total phenols by 39 fold, the derivatives of chlorogenic acids by more than 24, 25 fold for p-coumaric acid and Kaempferol rutinoside pentose and 19 of naringenin chalcone.

9.- On the contrary, a greater release of these compounds is induced, although in less quantity, by salicylic acid in the case of cell cultures after a first subculture, suggesting that greater exposure to both elicitors favors the action of methyl jasmonate, while salicylic acid offers a better response in very early phases of elicitation.

10.- Consequently, any of the culture systems used, including bioreactors, can be of industrial application depending on the possibilities of the production facility for obtaining on a large scale, these secondary metabolites of interest in the pharmaceutical industry.

Agradecimientos

Son muchas las personas que me han acompañado en este arduo proyecto y he de desatacar que sin su apoyo habría sido extremadamente difícil.

Deseo expresar mi agradecimiento a los tutores de esta tesis doctoral, en especial a los Doctores Manuel Cantos Barragán y José Luis García. Ambos colaboraron hombro con hombro y con sus enseñanzas allanaron el camino hasta alcanzar la meta final. Agradezco también a María del Mar Parra Alejandre por su ayuda y asistencia en el laboratorio. Además, a mi tutora Mercedes García González por su asistencia y guía durante estos años de trabajo.

A Antonio Martin Antúnez, por creer en mí y ayudarme a intentarlo siempre.

A mi familia, en especial a mi madre, que día a día preguntaba, que tal va la tesis hija?

Gracias al apoyo de todos, sin sus consejos y motivación, este trabajo nunca se habría escrito

A todos, muchas gracias.