



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Micropropagación de *Leontopodium alpinum* Cass. en presencia de elicitores para incrementar la producción de metabolitos antioxidantes



Marina Navarro Pedrós

Directores científicos

Luis Antonio Cañas Clemente

José Pío Beltrán Porter

Tutora UPV

María Pilar López Gresa

Grupo de Biología y Biotecnología del Desarrollo Reproductivo

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas, IBMCP

Universitat Politècnica de València

Enero 2017



AGRADECIMIENTOS

A mis directores del trabajo de fin de máster, el Dr. José Pío Beltrán y el Dr. Luis Cañas, por haberme acogido en su laboratorio y darme la oportunidad de formar parte de su grupo, así como por dirigirme en este proceso proporcionándome las herramientas para aprender y poder realizar este TFM. Gracias por su tiempo y atención dedicados a este trabajo.

A M. Pilar López Gresa y José María Bellés por su ayuda en la puesta a punto del método de medición de la actividad antioxidante, así como por haberme acogido en su laboratorio una temporada.

A mis compañeras del laboratorio 1.01 por acompañarme en este proceso, en especial a Rosa, Rim y Concha por aliviar la carga de trabajo en nuestro té de después de comer, además de Mari Cruz, Edelín, Sandra, Jose, Mónica y Pablo, por su compañerismo y por hacer muy agradable la estancia en el laboratorio.

No puedo olvidar hacer mención especial a Rim por su inestimable ayuda, por socorrerme cuando me surgían las dudas, animarme con sus alardes de positivismo cuando todo hacía aguas, su paciencia y tiempo dedicados a esta causa durante estos meses, y por estar ahí en los buenos y malos momentos. Has sido una gran ayuda tanto dentro como fuera del laboratorio.

A mis compañeros del máster, por hacer mucho más ameno y divertido este proceso. Compartir este tiempo con vosotros ha sido una experiencia maravillosa, gracias por esas tardes de cervezas y muchas risas al salir agotados de clase, vuestra inestimable ayuda para pasar los exámenes, los ánimos en los malos momentos y sobre todo por las experiencias vividas dentro y fuera del laboratorio. Ha sido un placer compartir este tiempo con vosotros. Vero, Ana, Jesús, Rubén, Adrián, Adrià, Vito, teníais que figurar aquí con mención especial, era necesario.

A Jordi, por proporcionarme las herramientas informáticas necesarias para llevar a cabo este trabajo, ofreciéndome su ayuda aunque fuera sábado y festivo. Con tu ayuda encontré las herramientas y la motivación necesaria para escribir este TFM a tiempo.

A mi familia, por haberme permitido realizar esta fase de mi aprendizaje y su apoyo incondicional durante todo el proceso. Gracias por darme ánimos y facilidades para ello. Cristina, me ha encantado vivir contigo estos meses y compartir todos esos viajes de ida y vuelta hacia Valencia con tu compañía, me has hecho el proceso mucho más llevadero y entretenido. Mamá, agradeceré tus *tuppers* eternamente.

A todos vosotros, Gracias.

RESUMEN

Leontopodium alpinum (Edelweiss) es una planta de alta montaña con interesantes propiedades farmacológicas. En estudios recientes sobre los efectos del cambio climático en la flora de alta montaña se ha descrito que determinadas especies, incluyendo *L. alpinum*, están en regresión debido al calentamiento de su hábitat natural. *L. alpinum* es una especie amenazada y actualmente protegida en todos los países en los que se encuentra, lo que condiciona las posibilidades de aprovechamiento de determinados principios activos de interés para la industria farmacéutica o cosmética. Las técnicas de micropropagación *in vitro* de plantas resultan de gran utilidad aplicadas a especies amenazadas, contribuyendo a los programas de conservación y facilitando programas relacionados con la mejora genética de estas especies. Nuestro grupo ha desarrollado técnicas de cultivo *in vitro* para ser utilizadas como herramienta de conservación de esta especie, permitiendo obtener grandes poblaciones de *L. alpinum* cultivables a baja altitud y provocar la floración de la planta de manera sincronizada y sin restricciones estacionales, facilitando su cultivo masivo en otras zonas distintas a la alta montaña para poder extraer determinados principios activos de interés. En este TFM hemos expuesto plantas de *L. alpinum* del pirineo aragonés (clones MAM y BURJ) propagadas *in vitro* a determinadas condiciones de estrés (elicitors) para intentar provocar un incremento en la producción de determinados metabolitos con actividad antioxidante presentes en sus órganos vegetativos y/o en sus flores. Nuestros resultados indican que las plantas cultivadas *in vitro* son capaces de responder a los elicitors que se añaden al medio de cultivo, incrementando su producción de antioxidantes cuando se comparan con las plantas control. El elicitor al que mejor responden las plantas es la coronatina pues, además de incrementar la producción de antioxidantes, les permite sobrevivir y presentan un mejor aspecto general que cuando son tratadas con cualquiera de los otros elicitors (metil jasmonato, nitrato de plata o sacarosa). Una interesante alternativa al cultivo masivo de plantas de *L. alpinum* sería la del uso de biorreactores con células en suspensión de *L. alpinum* a los que se añadiría un medio de cultivo con alguno de los elicitors ensayados. Esto nos permitiría que el cultivo celular produjera los compuestos fenólicos de interés y los depositara en el medio extracelular, pudiendo así aislar los compuestos de interés que se encuentran en el medio de cultivo sin tener que destruir el material vegetal.

Índice

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.	<i>Leontopodium alpinum</i> Cass. (Edelweiss)	1
1.1.	Descripción morfológica y botánica	1
1.2.	Hábitat y ecología	2
1.3.	Protección y conservación	2
2.	<i>L. alpinum</i> como planta medicinal y de interés farmacológico.....	3
2.1.	Conservación y mejora de <i>L. alpinum</i> : el cultivo <i>in vitro</i> de tejidos como herramienta biotecnológica.....	5
3.	Cultivo de tejidos y regeneración de plantas. Ventajas y limitaciones	6
3.1.	Sistemas de propagación vegetativa <i>in vitro</i>	6
3.2.	Factores implicados en la micropropagación	7
3.3.	Estructura de un protocolo de micropropagación	8
3.4.	El cultivo <i>in vitro</i> de <i>L. alpinum</i>	10
4.	Control de la floración en plantas	10
5.	Antecedentes del trabajo de fin de máster.....	12
6.	Aplicación de elicitores a plantas de <i>L. alpinum</i> para incrementar sus niveles de metabolitos antioxidantes	13
6.1.	Coronatina y metil jasmonato	14
6.2.	Nitrato de plata (AgNO ₃) y sacarosa a altas concentraciones.....	15
7.	Análisis del contenido en antioxidantes de las plantas de <i>L. alpinum</i>	16
II.	OBJETIVOS	17
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
1.	Material vegetal	18
2.	Medios de cultivo y elicitores	18
2.1.	Preparación de medios de cultivo	18
2.2.	Soluciones minerales y vitamínicas	18
2.3.	Medios de cultivo	20
2.4.	Elicitores utilizados	20
3.	Micropropagación de <i>L. alpinum</i>	21
3.1.	Micropropagación y adición de elicitores	21

3.2.	Enraizamiento de <i>L. alpinum</i> y posterior aclimatación.....	21
3.3.	Inducción de la floración en plantas de invernadero	22
3.4.	Efecto de la adición de distintas concentraciones de distintos elicitores al medio de cultivo.....	22
4.	Condiciones de cultivo	22
4.1.	Cultivo <i>in vitro</i>	22
4.2.	Cultivo en invernadero	22
5.	Análisis del contenido en antioxidantes	23
5.1.	Recogida de muestras y procesado	23
5.2.	Extracción y cuantificación del contenido en antioxidantes	23
6.	Análisis estadístico de los resultados.....	24
IV.	RESULTADOS	25
1.	Micropropagación de <i>L. alpinum</i>	25
2.	Ensayos previos.....	25
2.1.	Ensayo de valoración de la actividad antioxidante de plantas de <i>L.</i> <i>alpinum</i> propagadas <i>in vitro</i>	26
2.2.	Efecto de los elicitores añadidos al medio de cultivo de los clones seleccionados.....	26
3.	Multiplicación de brotes en medio de cultivo con elicitores	27
3.1.	Multiplicación en coronatina 1 μM	27
3.2.	Multiplicación en metil jasmonato 5, 15 y 25 μM	28
3.3.	Multiplicación en nitrato de plata 15, 30 y 60 μM	28
3.4.	Multiplicación en sacarosa 30, 45 y 60 g/l	29
4.	Enraizamiento de los brotes con o sin elicitores	30
4.1.	Enraizamiento en coronatina 1 μM	30
4.2.	Enraizamiento en metil jasmonato 5, 15 y 25 μM	31
4.2.1.	Plantas enraizadas pasadas a metil jasmonato	32
4.3.	Enraizamiento en nitrato de plata 15, 30 y 60 μM	32
4.4.	Enraizamiento en sacarosa 30, 45 y 60 g/l	33
5.	Aclimatación de los brotes enraizados con o sin elicitores.....	33
5.1.	Aclimatación de plantas tratadas con coronatina 1 μM	33
5.2.	Aclimatación de plantas tratadas con metil jasmonato 5, 15 y 25 μM	34
5.2.1.	Plantas enraizadas que se pusieron en presencia del elicitor MeJa durante un mes y después se aclimataron en el invernadero...	35
5.3.	Aclimatación de plantas tratadas con nitrato de plata	36
5.4.	Ensayos de inducción de la floración en plantas micropropagadas de <i>L. alpinum</i> con o sin elicitores	36

5.4.1. Caracterización de las inflorescencias de las plantas micropropagadas	37
V. DISCUSIÓN	39
VI. CONCLUSIONES	42
VII. PERSPECTIVAS FUTURAS	43
VIII. REFERENCIAS.....	45

INTRODUCCIÓN

1. *Leontopodium alpinum* Cass. (Edelweiss)

1.1 Descripción morfológica y botánica

Leontopodium alpinum Cass., también llamada Edelweiss o flor de las nieves, es una planta herbácea perenne de la familia de las Asteráceas, una familia botánica que contiene cerca de 25.000 especies distribuidas entre 1.500 géneros. Se trata de una planta vivaz, de rizoma leñoso del que salen varias rosetas de hojas, y con un sistema radicular en cabellera con raíces fibrosas.

El género *Leontopodium* R.Br. ex Cassini comprende unas 30 especies originarias de Eurasia que crecen en áreas montañosas de Japón, Asia y Europa (Safer *et al.*, 2011). *Leontopodium alpinum* Cass. se localiza en las cadenas montañosas de Pirineos, Jura, Alpes, Apeninos ligures, norte de los Balcanes y Cárpatos (Blösch *et al.*, 2010). En España, *L. alpinum* Cass. se localiza en los Pirineos (“Anthos - Sistema de Información sobre las plantas en España”, www.anthos.es).



Figura 1. Flores silvestres de *Leontopodium alpinum*. **A.** Roseta de hojas de la que emergen varios tallos inflorescentes. **B.** Inflorescencias de *Leontopodium alpinum* en forma de estrella.

La planta florece durante los meses de julio y agosto. La flor, en forma de estrella, es en realidad una inflorescencia con tallos foliosos, erectos, simples y albo-tomentosos de 5 a 20 cm de alto y 2,5 a 3,5 de diámetro. Las hojas inferiores son enteras, de 1,5 a 4 cm, estrechamente oblanceoladas, verdes por el haz y grises por el envés, cubiertas de pilosidad blanco lanosa. Las hojas del tallo floral son más pequeñas, alternas, linear oblongas, patentes y densamente lanuginosas. La inflorescencia cuenta con 1 a 12 capítulos subglobosos pequeños de 5 a 7 mm de diámetro, cada uno de ellos formado por 30-60 flores tubuladas de color blanco amarillento. Estos capítulos se encuentran agrupados en un glomérulo umbeliforme terminal y cubierto por un involucre de 5 a 15 brácteas. Estas brácteas son lanceoladas, lanuginosas, blancas, patentes y sobrepasan considerablemente los capítulos. Aparecen dispuestas en forma de estrella y son expansiones de un receptáculo muy modificado. Las flores son actinomorfas, pentámeras y tubulosas y se disponen sobre el receptáculo convexo del capítulo. Las flores exteriores son femeninas mientras que las interiores son hermafroditas

pero funcionalmente masculinas. El fruto es un aquenio de 0,5 mm de color pardo y sin costillas.

1.2 Hábitat y ecología

Leontopodium alpinum Cass. se encuentra generalmente en los pisos alpinos y subalpinos montañosos en altitudes de entre 1.200 y 3.000 metros, aunque puede excederse de estos límites (1.100 m por abajo y 3.030 m por arriba). El hábitat natural de *L. alpinum* en los Pirineos son pastos muy innivados del piso alpino y subalpino. Suele encontrarse sobre sustrato calcáreo, en todo tipo de pendientes y sobre suelos más o menos pedregosos y supraforestales, desde pasto denso hasta repisas y fisuras de roquedo vertical. Se encuentra en montañas del centro y sur de Europa, desde los Cárpatos y el Jura hasta el Pirineo, su límite occidental de distribución. Algunos botánicos la han clasificado como dos subespecies a *Leontopodium alpinum* ssp. *alpinum* y a *Leontopodium alpinum* ssp. *nivale*. Sin embargo, investigaciones morfológicas y moleculares apuntan a que deben considerarse como dos especies distintas (Greuter, 2003; Blösch *et al.*, 2010). La primera se encuentra en los Alpes y los Pirineos, mientras que la segunda se encuentra en Apeninos, Alpes Dináricos, Balcanes y Cárpatos. En España *Leontopodium alpinum* ssp. *alpinum* la encontramos principalmente en el Pirineo aragonés y catalán.

Las poblaciones son en general poco nutridas y bastante aisladas entre sí. Las elevadas altitudes en las que crece hacen que tenga que enfrentarse a altos niveles de radiación ultravioleta (UV), bajas presiones atmosféricas y grandes variaciones de humedad y de temperatura (Dweck, 2004), con temperaturas nocturnas en plena estación estival que pueden descender por debajo de los 0 °C. Como mecanismo de protección ante estas condiciones extremas, la planta ha desarrollado una cubierta tomentosa que la aísla de los cambios climáticos, evita pérdidas excesivas de humedad y la protege de los rayos ultravioleta del sol (Prevedello *et al.*, 2004). Estas condiciones extremas de su entorno han propiciado la producción en la planta de determinados principios activos que la protegen del entorno y que constituyen una interesante fuente de metabolitos de interés para la industria farmacéutica y cosmética.

L. alpinum también se ha cultivado en jardines rocosos como especie ornamental, pues es probablemente una de las flores silvestres más famosas del mundo. Se cultiva fácilmente en rocallas de suelos húmedos y bien drenados, donde se puede observar una gran variabilidad en tamaños y apariencia de las plantas provenientes de semilla debido a la gran biodiversidad inicial que tiene esta planta en la naturaleza (Carron *et al.*, 2007). Al cultivarse en estas altitudes mucho más bajas a las de su hábitat natural, se observan algunas modificaciones en la morfología, como la disminución de la cobertura de pelos que le ayudan a protegerse del frío, la presencia de un tallo floral más largo y la pérdida del aspecto característico de la flor. Debido a todas estas modificaciones, la planta será más susceptible a diversas plagas. También se han registrado diferencias en el contenido de metabolitos secundarios de interés según la altitud a la que se desarrollen las plantas.

1.3 Protección y conservación

El interés que la flor suscita entre montañeros y senderistas desde la segunda mitad del siglo XIX amenazó pronto a la supervivencia de la especie debido a su recolección indiscriminada. Esto fue debido a los numerosos mitos y leyendas creadas en torno a la dificultad de

recolección de la flor, creando así un carácter simbólico a su recolección al crecer en lugares inaccesibles. Esto llevó a que la recolección de *L. alpinum* comenzara a controlarse en todo el arco alpino, adquiriendo pronto la denominación de especie protegida en Austria y Suiza (Scheidegger, 2011) siendo la flor nacional de este último.

La planta también se enfrenta a otros riesgos comunes a otras plantas silvestres, como la competencia con otras especies vegetales y la reducción, fragmentación y degradación de los hábitats naturales (García Casanova *et al.*, 2001). Con el paso del tiempo el estatus de planta protegida en mayor o menor grado se ha extendido por todo el área de distribución de la especie. En España está catalogada, según la clasificación establecida en la LEY 4/1989, como planta de “Interés Especial” en Aragón (DECRETO 49/1995, modificado por la ORDEN de 4 de marzo de 2004, modificado por el decreto 181/2005), en las poblaciones que se encuentran dentro de los Espacios Naturales Protegidos y Lugares de Importancia Económica (Catálogo de Especies Amenazadas de Aragón, 2008). En Cataluña tiene la categoría de “Vulnerable” en todo el territorio (DECRETO 172/2008).

Recientemente se han realizado estudios sobre las consecuencias del cambio climático en la flora alpina (Gottfried *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos indican que en los últimos años se ha producido un incremento de 2 °C en la temperatura media en las zonas alpinas, motivo por el cual muchas de las especies vegetales, incluyendo *L. alpinum*, se están desplazando hacia las zonas más altas, donde la temperatura es más adecuada para su supervivencia, siendo sustituidas por otras poblaciones de plantas mejor adaptadas a las actuales temperaturas.

2. *L. alpinum* como planta medicinal y de interés farmacológico

En la medicina tradicional alpina se utilizan extractos de *L. alpinum* para atenuar inflamaciones y dolores de las vías respiratorias, sistema digestivo, articulaciones y otras partes del cuerpo. Después, diversos estudios farmacológicos de extractos de la planta pusieron de manifiesto sus propiedades anti-inflamatorias y antimicrobianas (Dobner *et al.*, 2004). Otros estudios realizados *in vivo* demostraron sus efectos antioxidantes, analgésicos y de protección del ADN (Speroni *et al.*, 2006)

La gran mayoría de las propiedades farmacológicas de *L. alpinum* se han atribuido a la presencia y al espectro de metabolitos secundarios polifenólicos (Lulli *et al.*, 2012). La planta contiene una amplia variedad de polifenoles pertenecientes a las clases de fenilpropanoides (ácidos fenólicos, glucósidos, flavonoides, cumarinas y lignanos), terpenos (sesquiterpenos y diterpenos), así como derivados del pirano y el benzofurano. Algunos de los compuestos identificados de la raíz de la planta, de sus partes aéreas, o a partir de cultivos de raíces, resultan potentes inhibidores *in vitro* y *ex vitro* de la biosíntesis de leucotrieno, limitando la movilización de leucocitos y reduciendo así la inflamación (Speroni *et al.*, 2006).

La evaluación analítica de los extractos de las partes aéreas de *L. alpinum* reveló la presencia de glucósidos y agliconas de flavonoides como la luteolina, la quercetina y la apigenina que actúan sobre la permeabilidad capilar y mejoran la circulación sanguínea periférica aportando así más oxígeno a los tejidos. Así mismo tienen actividad antiinflamatoria por inhibición de la interleukina-5 (Prevedello *et al.*, 2004). En estos extractos de la parte aérea también se encontró un alto contenido de ácidos clorogénico, 3,5-dicafeoilquínico y leontopódico, compuestos que presentan una importante actividad antioxidante.

Los **ácidos leontopódicos** (isómeros A y B) son ácidos fenólicos característicos de esta especie (Schwaiger *et al.*, 2006) que poseen una **actividad antioxidante y de captación de radicales libres** que duplica la del ácido clorogénico y es tres veces superior al trolox en el análisis por el método TEAC (“Trolox Equivalent Antioxidant Capacity”; Rice-Evans & Miller, 1994). En publicaciones recientes, se apunta a que los isómeros del ácido leontopódico son responsables, en gran medida, de los efectos biológicos beneficiosos de los extractos de *L. alpinum* (Costa *et al.*, 2009). Los efectos de los ácidos fenólicos derivados del ácido hidroxicinámico, como el ácido leontopódico o el clorogénico, están potenciados por los taninos y se asocian con la inhibición de la formación de la peroxidación lipídica, la inhibición de la formación del ión superóxido (una de las especies radicales más dañinas) y la protección del colágeno de tipo III (Park *et al.*, 1999). Además, los compuestos de *L. alpinum* tienen propiedades de inhibición de enzimas como la hialuronidasa, la 5-lipoxigenasa y la elastasa aumentando la elasticidad de la piel (Scalbert, 1991). La presencia de β -sitosterol, luteolin-4'-glucosidasa y derivados del bisabolano en *L. alpinum* explican su efecto calmante. Estas propiedades hacen que los extractos de la planta se utilicen como componentes para el tratamiento de piel estresada y sensible incorporándose a cremas antienvjecimiento y a filtros solares. En los últimos años grandes empresas cosméticas como Weleda o Pentapharm han desarrollado líneas de productos que incorporan estos extractos de la planta en su formulación.

Entre los compuestos aislados a partir de las raíces, se ha comprobado que algunos sesquiterpenos como el **isocomeno** son capaces de potenciar la transmisión colinérgica, señalándolos como posibles agentes anti-demencia en enfermedades asociadas a déficits colinérgicos (Hornick *et al.*, 2008). Otra sustancia como la **leoginina**, el principal lignano de *L. alpinum*, aislada de las raíces (Schwaiger *et al.*, 2004), se ha visto que inhibe la hiperplasia interna de tejidos en cultivo de órganos (Reisinger *et al.*, 2009) siendo por ello candidata a utilizarse en los tratamientos de enfermedades de injerto venoso (“bypass”). Duwensee *et al.* (2011), por su parte, han comprobado que la leoginina también es capaz de activar la proteína colesteril ester transferasa (CETP), reduciendo los niveles de colesterol lo que le confiere una aplicación potencial en pacientes con hipercolesterolemia.

Tanto los **ácidos leontopódicos**, como el sesquiterpeno **isocomeno** o el lignano **leoginina** (figura 2) se pueden considerar principios activos antienvjecimiento, de gran utilidad para el **tratamiento de enfermedades crónicas**, si bien su disponibilidad se encuentra muy comprometida debido a las medidas de protección de la planta, a la escasez de poblaciones y a las condiciones extremas de su hábitat natural que impiden su cultivo a bajas altitudes. En la tabla 1 podemos ver un resumen de los compuestos producidos por *L. alpinum* y sus propiedades.

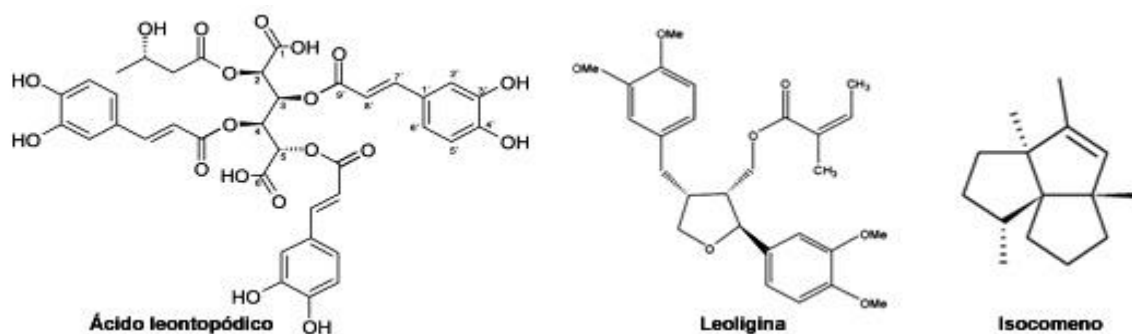


Figura 2. Estructura química del ácido leontopódico, leoginina e isocomeno.

Ácidos fenólicos	Ácido clorogénico , Ácido 3,4-dicafeolquínico, Ácido 3,5-dicafeolquínico Ácido leontopódico	Actividad antioxidante, de protección del ADN, Anti-inflamatoria
Flavonoides	Luteolina, Apigenina, Isoquercitrina, Luteolina-7,4'-di-O-β-D-glucósido; Luteolina-7-O-β-D-glucósido; Crisoeriol-7-O-β-D-glucósido, Apigenina-7-O-β-D-glucósido,..	Antioxidante y captación de radicales libres
Cumarinas	Obliquina Metoxiobliquina	Anti-inflamatoria y antimicrobianas
Lignanós	Leoligina	Anti-inflamatorio, reducción de niveles de colesterol y prevención de arteriosclerosis
Diterpenos	Ácido kaurenico	Anti-inflamatorio
Sesquiterpenos	Modéfeno, Isocomeno, Silfineno , 14-acetoximodéfeno, Metilisocomen-14-oato, (1R*,2S*,4R*,5S*)-4-(acetiloxi)-2-[3-(acetiloxi)-1,5-dimetilhex-4-enil]-5-metilciclohexil (2Z)-2-metilbut-2-enoato, T-cadinol	Anti-inflamatorio, Antimicrobiano y estimulantes de la transmisión colinérgica Antibacteriano
Esteroles	β-sitosterol	Reducción de los niveles de colesterol

Tabla 1: Compuestos producidos por *L. alpinum* y algunas de sus actividades farmacológicas.

2.1 Conservación y mejora de *L. alpinum*: el cultivo *in vitro* de tejidos como herramienta biotecnológica

Aunque *L. alpinum* puede en algunos casos propagarse vegetativamente mediante subdivisión de plantas cultivadas senescentes (Hook, 1993), normalmente se multiplica por semilla. La variabilidad, tanto morfológica como fitoquímica de las plantas en ese caso es manifiesta y dificulta su aprovechamiento comercial. Por otro lado, se trata de una planta con limitaciones de cultivo en cuanto a su localización ya que se ha descrito que la morfología de la planta pierde su aspecto característico al cultivarse en altitudes más bajas. También se ha descrito que existen diferencias en el contenido de metabolitos secundarios de interés según la altitud en que se desarrollan las plantas (Marcon *et al.*, 2006).

Entre los objetivos que se plantean para el mejor aprovechamiento de esta planta está la consecución de material más homogéneo, tanto desde un punto de vista morfológico como fitoquímico, y capaz de obtenerse de forma masiva en localizaciones no tan específicas. En el caso del aprovechamiento como planta productora de principios activos también resultaría interesante desarrollar procedimientos de control de la floración para reducir la dependencia de la estacionalidad. El primer abordaje de un programa de mejora para convertir *L. alpinum* en una planta comercial se llevó a cabo en el Centro de Investigación Conthey de Agroscope

Changins Wädenswil (ACW) incentivado por las empresas Weleda y Ricola. Fruto de este trabajo se seleccionó un híbrido (variedad Helvetia) obtenido mediante cruzamientos (Carron *et al.*, 2007) adaptado al cultivo en los valles suizos (1.100m de altitud).

3. Cultivo de tejidos y regeneración de plantas. Ventajas y limitaciones

Entre las principales aplicaciones de las técnicas de **cultivo *in vitro*** de tejidos vegetales se encuentran la propagación masiva de plantas, la preservación de germoplasma, la obtención de plantas libres de patógenos, la mejora genética, la **biosíntesis de metabolitos** y la investigación básica en áreas como la genética, la fisiología y la bioquímica (Fowler, 1987; Carpita y McCann, 2000). La propagación de plantas mediante el cultivo *in vitro* de tejidos, conocida como **micropropagación**, se caracteriza entre otros aspectos por ser una propagación vegetativa, sin que medie ningún tipo de fusión de las células sexuales, masiva y substancialmente **clonal**, que implica el cultivo de explantes en condiciones asépticas en recipientes que permiten controlar las condiciones ambientales y la composición y concentración de nutrientes.

Entre las **múltiples ventajas** tenemos que las plantas se pueden producir durante todo el año ya que el proceso es independiente de los efectos ambientales, y el material producido puede ser almacenado durante largos periodos de tiempo. Las plantas cultivadas *in vitro* tienen un tamaño reducido, por lo que podremos cultivarlas en grandes cantidades en un espacio relativamente pequeño. Esta propagación se lleva a cabo en condiciones asépticas, por lo que no se producirán pérdidas por plagas o enfermedades (aunque sí deben estar libres de hongos, bacterias y levaduras). La obtención de plantas libres de patógenos permite la producción de planta certificada, controlando así las condiciones sanitarias y facilitando su paso a través de las fronteras. Además, la producción clonal de individuos de élite evitaría la segregación de caracteres en las progenies obtenidas por cruce sexual.

Esta técnica también nos permite la producción de un gran número de clones de algunas plantas cuya propagación vegetativa *in vivo* sería lenta y dificultosa, cuando no imposible. Por otra parte, las plantas pueden adquirir temporalmente nuevas características gracias a la micropropagación, estas características hacen que las plantas sean más apreciadas por los productores. Asimismo, las tasas de propagación pueden aumentarse mediante el control estricto de los factores que afectan la regeneración vegetativa, como los niveles nutricionales o de los reguladores del crecimiento, la luz o la temperatura.

Entre las **limitaciones**, encontramos la necesidad de disponer de instalaciones especializadas y trabajadores altamente capacitados. Habrá que controlar muy bien las contaminaciones, pues pueden producir grandes pérdidas. Otra desventaja que encontramos es que frecuentemente necesitaremos desarrollar métodos específicos para cada especie y variedad para conseguir una micropropagación eficaz. Además de todo esto, habrá que tener en cuenta que durante el proceso del cultivo *in vitro* pueden producirse variaciones indeseadas en las plantas, pudiendo cambiar las características de la planta a propagar sin que nos demos cuenta y transmitir estas modificaciones a gran escala por error.

3.1 Sistemas de propagación vegetativa *in vitro*

En cultivo *in vitro* se distinguen dos tipos de crecimiento de acuerdo con el material de partida, uno organizado (creación o mantenimiento de estructuras definidas) y otro desorganizado (no existe estructura reconocible, como en un callo). Aquí nos centraremos en el cultivo

organizado, el cual describe el cultivo de meristemos, de ápices de tallo, de nudos, yemas laterales, raíces y cultivo de embriones. Se pueden obtener plantas completas a partir de sistemas de propagación desorganizados, pero es más probable que haya variaciones en las plantas obtenidas. En este trabajo de fin de máster utilizaremos siempre los sistemas de propagación a partir de tejidos organizados con el fin de obtener plantas clonales no alteradas genéticamente.

3.2 Factores implicados en la micropropagación

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por el material vegetal y por las condiciones físicas y químicas utilizadas *in vitro* (Pierik, 1990). Del material vegetal influyen factores como su composición genética, la edad de la planta y el explante utilizado, el estado fisiológico y sanitario, además del tamaño del explante y su posición relativa a la planta.

Estos cultivos de tejidos vegetales deben mantenerse en condiciones ambientales apropiadas, reproduciendo las condiciones más favorables para la planta en cuestión, como son la luz, la temperatura, la humedad relativa y los niveles de O₂ y CO₂. Tendremos que tener en cuenta la intensidad, el fotoperiodo y la calidad espectral. La temperatura también estará bajo control de periodo térmico. Dentro de los recipientes de cultivo tendremos una humedad relativa alta, cercana a saturación, por lo que las plantas sufrirán modificaciones al trasplantarse al exterior.

A las plantas cultivadas *in vitro* se les suministra un medio de cultivo específico para cubrir las necesidades, compuestos por sales, vitaminas, aminoácidos, reguladores del crecimiento, azúcares, agentes gelificantes (medios semi-sólidos) y agua destilada.

Será necesaria la adición de azúcares al medio como fuente de carbono, la sacarosa suele ser el azúcar más utilizado. Los minerales presentes en el medio de cultivo son usados mayormente para la síntesis de moléculas orgánicas por parte de las plantas, y los iones de las sales disueltas juegan un importante papel en el transporte de moléculas ionizadas en la planta, en la regulación osmótica y en el mantenimiento del potencial electroquímico de la planta. Las sales de los medios de cultivo se dividen en macro y micro elementos, división basada principalmente en las necesidades de la planta con respecto a dichos elementos. La mayoría de los microelementos están presentes en cantidades micromolares, mientras que la necesidad de los macroelementos es mucho mayor y se encuentra en concentraciones macromolares. Dentro de los macroelementos tenemos a las sales que contienen nitrógeno, principalmente en forma de nitrato potásico, nitrato amónico o nitrato cálcico. En el mercado existen diversas formulaciones de nutrición mineral, una de ellas es la formulación MS (Murashige y Skoog, 1962) de uso universal, aunque encontramos también otras como B5 (Gamborg et al., 1968), LP (Quorin y Lepoivre, 1977), o WPM (Lloyd y McCown, 1980) para el cultivo de leñosas. La elección de la solución nutritiva depende de la planta con la que se trabaja y de la etapa del proceso de micropropagación.

Los reguladores del crecimiento de plantas o fitohormonas se encargan de regular el crecimiento, el desarrollo y de la respuesta a estímulos mediante efectos pleiotrópicos. El equilibrio entre ellas se desplaza constantemente y los cambios en los niveles de fitohormonas dan lugar a cambios en la expresión génica. Así, las fitohormonas serán usadas según la finalidad del investigador, pues una gran parte de la experimentación en cultivo *in vitro* se centra en la modificación de las concentraciones y los tipos de reguladores. El efecto de los reguladores también dependerá de su estabilidad en el medio de cultivo y el tejido, así como

en la sensibilidad del tejido diana: las células de cierto tejido en cierto estado de desarrollo pueden no reconocer la señal hormonal o ser incapaces de llevar a cabo la respuesta deseada.

Las cinco fitohormonas consideradas clásicamente son: auxinas, citoquininas, etileno, giberelinas y ácido abscísico, aunque posteriormente se comprobó la acción reguladora de otras hormonas como el ácido jasmónico, los brasinosteroides o las oligosacarinas (George, 2008). Las principales auxinas utilizadas en el cultivo *in vitro* son el ácido indolacético (AIA), el ácido indolbutírico (AIB), y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Las auxinas promueven la formación de raíces adventicias, inducen la embriogénesis somática, la división celular, la formación y crecimiento de callo e inhiben el desarrollo de yemas axilares y el crecimiento de la raíz. Las citoquininas más comunes son la N⁶bencilaminopurina (BAP), la kinetina, la zeatina y el tidiazurón (TDZ). Éstas promueven la formación de brotes, la división celular y la formación y crecimiento de callo. También estimulan el crecimiento de las yemas axilares e inhiben la formación de raíces adventicias, la elongación de brotes y la senescencia de hojas. También tenemos al ácido giberélico (GA₃) como la giberelina más utilizada, y entre sus efectos se ha descrito que promueven la elongación de entrenudos, rompen la dormición en semillas, inhiben la formación de raíces adventicias y promueven la floración. Por otra parte, el etileno promueve la senescencia de hojas y provoca la maduración de frutos, y el ácido abscísico se utiliza para la maduración de embriones somáticos y facilita la aclimatación y formación de bulbos y tubérculos.

Las vitaminas se añaden a los medios de cultivo de diversas formas y concentraciones. Algunas formulaciones incluyen tiamina, mioinositol, piridoxina, ácido nicotínico, biotina, riboflavina, ácidos fenólicos y otras, aunque no existe un consenso sobre qué vitaminas son las realmente esenciales (George, 2008).

En los medios semi-sólidos se utilizan agentes gelificantes para formar una matriz de soporte, siendo el más usado de ellos el agar.

3.3 Estructura de un protocolo de micropropagación

Murashige (1974) definió tres etapas o estadios en la propagación *in vitro* de plantas, correspondientes a la iniciación del cultivo en condiciones asépticas (estadio I), multiplicación (estadio II) y elongación y enraizamiento (estadio III). Estos estadios corresponden a tres fases morfogénicas fundamentales, donde frecuentemente es necesario cambiar alguna de las condiciones de cultivo utilizadas. Después se añadieron dos estadios desarrollados *ex vitro*, consistentes en la preparación y tratamiento de la planta madre (estadio 0) y un estadio IV de aclimatación de las plantas cultivadas *in vitro* a condiciones de cultivo (Maene y Devergh, 1986). En la figura 3 se adjunta un esquema en el que se contemplan estos estadios.

Estadio 0: Preparación de los explantes. En esta fase se selecciona el material vegetal de partida, el cual debe estar en el mejor estado sanitario posible, además de ser representativo de la especie a cultivar y poseer las cualidades que deseemos propagar.

Estadio 1: Inicio del cultivo. El objetivo es establecer cultivos axénicos y viables. El éxito dependerá del tamaño de los explantes, su estado de desarrollo, la edad de la planta madre y el estado fisiológico. Además, se usarán métodos de esterilización que no deterioren el material vegetal y permitan su posterior cultivo en condiciones axénicas, por lo que se tendrá en cuenta la concentración de los compuestos esterilizantes y su tiempo de contacto con el material de interés. El cultivo se considera establecido cuando está libre de patógenos y microorganismos contaminantes.

Estadio 2: Multiplicación. En esta etapa se pretende aumentar el número de estructuras capaces de dar lugar a plantas completas, las cuales se volverán a utilizar según los intereses del propagador. Esta multiplicación será dependiente de los reguladores del crecimiento vegetal que se hayan añadido al medio de cultivo, sobretodo citoquininas y auxinas que serán las encargadas de regular el proceso en la mayoría de los casos. También tendremos en cuenta la concentración y el tiempo de exposición, pues unas concentraciones inadecuadas pueden ocasionar problemas en la multiplicación y restar calidad al material. La eficiencia del método de propagación aumenta cuando los cultivos son homogéneos, pues será más fácil repicarlos.

Estadio 3: Elongación y enraizamiento. En algunos casos las plantas necesitan tener una altura mínima y un número determinado de entrenudos antes de poder enraizar. Para ello los medios de cultivo se suplementan con giberelinas para alargar los entrenudos del tallo. La inducción de la formación de raíces puede realizarse *in vitro* o *ex vitro*. En el *ex vitro* suelen suplementarse con auxinas y tener raíces más largas, mientras que *in vitro* se consigue poniendo las plantas en un medio libre de hormonas para permitir el desarrollo de las raíces.

Estadio 4: Aclimatación. Es la última etapa del proceso donde se pretende la adaptación de las plantas cultivadas *in vitro* a las condiciones de invernadero. Esta es una etapa crítica debido al ambiente al que se han sometido durante el cultivo *in vitro*, donde han sufrido cambios en su fisiología y su anatomía. Las plantas provenientes de cultivo *in vitro* son muy sensibles a condiciones ambientales no controladas, como la intensidad luminosa y la humedad relativa. Además, debido al aporte nutricional de los medios de cultivo, las plantas presentan un crecimiento heterotrófico o mixotrófico, por lo que su capacidad fotosintética es pobre y requieren de una adaptación a la nutrición autótrofa.



Figura 3. Fases de un protocolo de micropropagación *in vitro* de plantas. Estadio 0: selección del material vegetal de partida (preparación de explantes). Estadio 1: preparación de material vegetal axénico (meristemas, hojas, etc.). Estadio 2: Multiplicación *in vitro* de tallos. Estadio 3: Elongación y enraizamiento de tallos. Estadio 4: Aclimatación de plantas enraizadas a condiciones de invernadero.

3.4 El cultivo *in vitro* de *Leontopodium alpinum*

No existen muchos trabajos publicados sobre la micropropagación de *L. alpinum*, por lo que el material vegetal utilizado en este trabajo de fin de máster se obtuvo siguiendo el protocolo que estableció Hook (1993) para la micropropagación de plantas de *L. alpinum* de origen alpino utilizando brotes apicales de plantas obtenidas a partir de semilla, el cual fue puesto a punto hace unos años en nuestro laboratorio (Mondéjar, 2014).

Tampoco hay muchas referencias sobre la micropropagación de otras especies del género *Leontopodium*. Pace *et al.*, (2009) desarrollaron un protocolo de propagación de plantas de *L. nivale* partiendo de semillas, como parte de una posible estrategia de conservación. Investigadores coreanos también desarrollaron un protocolo de micropropagación para *L. coreanum* (Park *et al.*, 1987) usando sales MS y diferentes concentraciones de fitohormonas.

La implementación de distintas tecnologías de cultivo *in vitro* aplicables a *L. alpinum* en los próximos años suponen un reto para los biotecnólogos y para las empresas especializadas en la comercialización de productos nutraceúticos y farmacológicos derivados de los interesantes principios activos de esta planta. Esto resolvería el problema de la necesidad de disponer de material vegetal para la extracción de dichos metabolitos, pues al tratarse de una especie protegida no se puede recolectar material silvestre para la obtención de los extractos necesarios para la elaboración de dichos productos. Normalmente los investigadores recurren a bancos de germoplasma y al cultivo de material a partir de semilla, pero en ocasiones las cantidades de material vegetal no son suficientes para abastecer la creciente demanda de principios activos. También se han implementado técnicas de cultivos celulares para la extracción de los metabolitos de interés (Dal Toso y Melandri, 2010)

4. Control de la floración en plantas

Las plantas inician la floración después de un periodo de desarrollo vegetativo. A éste proceso se le conoce como inducción floral, donde el meristemo apical del tallo comienza a producir flores en lugar de hojas. El proceso está controlado por una compleja red de señalización molecular que depende tanto de factores exógenos (luz, temperatura) como endógenos (edad de la planta, estado nutricional) para determinar el momento óptimo en el que florecer. Estas redes son enormemente complejas y cuentan con vías redundantes para asegurar la floración y con ello la perpetuidad de la especie.

En las plantas modelo utilizadas para el estudio de la floración, como *Arabidopsis thaliana*, se han descrito cuatro rutas principales de las que depende la floración: la ruta del fotoperiodo, la ruta de la vernalización, la ruta de las giberelinas y la ruta autónoma. Hay autores que hablan también de otras dos rutas: la ruta de la temperatura ambiental y la ruta de la edad (Amasino y Michaels, 2010). Las rutas del fotoperiodo y la vernalización controlan la floración en respuesta a los cambios estacionales en la duración del día y la temperatura, la ruta de la temperatura ambiental responde al aumento diario de la temperatura, y las rutas de la edad, autónoma y de las giberelinas actúan de forma más independiente a los estímulos medioambientales (Fornara *et al.*, 2010).

En este trabajo nos centraremos en la **ruta de las giberelinas** para conseguir la inducción floral de plantas de *L. alpinum* provenientes del cultivo *in vitro* y mantenidas en condiciones de invernadero, donde están en condiciones ambientales constantes, para así recolectar las flores y poder medir la capacidad antioxidante de sus extractos. La aplicación exógena de estas fitohormonas nos asegurará la floración de las plantas independientemente

de la época del año y las condiciones ambientales (altitud, temperatura, fotoperiodo, etc.) en las que se encuentra la planta (Mondéjar, 2014).

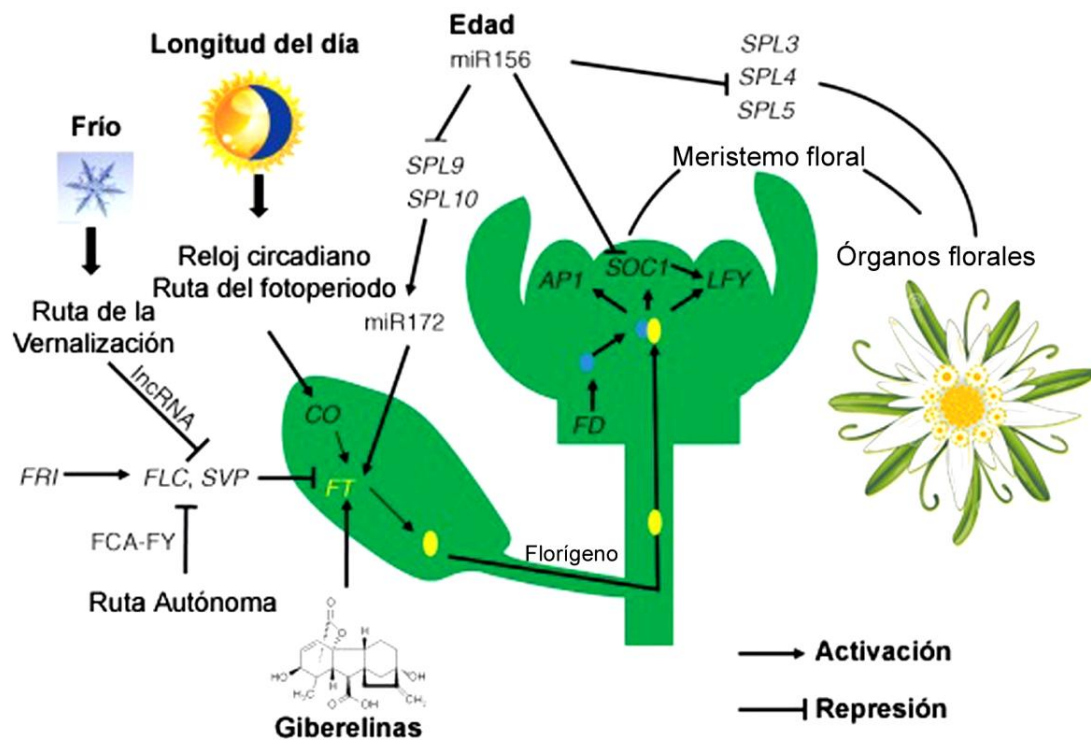


Figura 4. Esquema simplificado de las principales rutas implicadas en la transición floral. La floración está regulada a través de cuatro rutas principales que perciben información procedente del ambiente y endógena de la planta: la ruta del fotoperiodo, la ruta autónoma, la ruta de la vernalización y la ruta de las giberelinas. La ruta de las giberelinas no depende de factores ambientales y su aplicación exógena en hojas puede activar el gen *FT* cuya proteína se desplazaría hasta el ápice para unirse a la proteína *FD* y así activar los genes implicados en la diferenciación de los meristemos florales.

Las giberelinas integran distintas señales ambientales y endógenas a través de la actividad de las proteínas DELLA, las cuales juegan un papel importante en el proceso de transición desde material vegetativo a floral (Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009). También se ha visto que en *Arabidopsis* las giberelinas tienen un papel fundamental en la floración en día corto, induciendo la floración de manera independiente de *FT* o promoviendo la expresión de *FT* en las hojas, además de otros factores. Las numerosas rutas involucradas en la floración convergen en la regulación transcripcional de varios integradores florales, que a su vez regulan la actividad de los genes de identidad del meristemo floral que en última instancia inducirán a la formación de las flores en los laterales del meristemo inflorescente.

Hay que tener en cuenta que aunque en este trabajo nos hayamos centrado en la ruta de las giberelinas, todas las rutas convergen en la regulación transcripcional de varios integradores florales (*LFY*, *FT*, *SOC1*, *AGAMOUS-LIKE 24*) en *Arabidopsis*, que a su vez regulan la actividad de los genes de identidad del meristemo floral como *LFY*, *APETALA 1* y *CAULIFLOWER*, que en última instancia inducirán la formación de las flores en los laterales del meristemo inflorescente activando los genes de identidad de órgano floral (genes homeóticos MADS-box y similares).

5. Antecedentes del trabajo fin de máster

L. alpinum Cass. es una especie silvestre que cuenta con un notable interés medicinal y farmacológico. Sin embargo, se trata de una especie amenazada con un importante régimen de protección en todos los países en los que se encuentra, lo que condiciona las posibilidades de aprovechamiento desde un punto de vista comercial o industrial. Las técnicas de micropropagación *in vitro* han demostrado ser una importante alternativa a la propagación de plantas convencional, permitiendo la obtención de gran número de plantas clonales a la vez que reducen las necesidades de espacio y trabajo. En particular estas técnicas resultan de gran utilidad aplicadas a especies amenazadas, contribuyendo a los programas de conservación y facilitando otros programas relacionados con la mejora vegetal o la explotación comercial de estas especies. Por ello, resultaría relevante el desarrollo de métodos de micropropagación en *L. alpinum* para la producción de material vegetal que pueda estar disponible para los fines comentados.

En el grupo de Biología y Biotecnología del Desarrollo Reproductivo del IBMCP, donde se ha realizado este trabajo de fin de máster, se ha estado trabajando en el desarrollo de protocolos eficaces para la micropropagación clonal de esta especie, su aclimatación a condiciones de invernadero y campo a baja altitud, así como a la inducción de la floración con independencia de la estacionalidad (Mondéjar, 2014). Como resultado de estos trabajos, se ha desarrollado un método de micropropagación de *L. alpinum* Cass. a partir de flores maduras aisladas de plantas silvestres recolectadas en la alta montaña (Puerto de Bujaruelo, Pirineo de Huesca). Este método se basa en la inducción de organogénesis indirecta en las flores cultivadas *in vitro* para la obtención de brotes que se incorporan a un proceso de multiplicación y enraizamiento de elevada eficiencia, garantizando la producción de gran cantidad de plantas clonales (Figura 5A-D).

Se ha desarrollado un segundo método de micropropagación utilizando como material de partida hojas de plantas micropropagadas cultivadas *in vitro*. Este tipo de explante muestra una elevada capacidad organogénica en medios de cultivo con TDZ, lo que hace que este protocolo suponga un método de regeneración de plantas *in vitro* eficaz y reproducible. Las plantas de *L. alpinum* obtenidas mediante los protocolos de micropropagación establecidos no presentan modificaciones en el nivel de ploidía y se desarrollan en crecimiento vegetativo de forma similar a las plantas obtenidas de semilla silvestre cuando se cultivan en las mismas condiciones de invernadero, pero no realizan la transición floral. Por el contrario, las plantas micropropagadas responden a condiciones específicas de la inducción floral.

También se comprobó que la vernalización promueve la floración en estas plantas y que responden al fotoperíodo como plantas de día corto-largo, requiriendo una secuencia de días cortos seguidos de días largos para florecer (Mondéjar, 2014). Igualmente, la aplicación exógena de giberelinas induce la floración en las plantas micropropagadas con gran efectividad. Estas particulares necesidades de señalización exógena podrían deberse a modificaciones genéticas generadas o no eliminadas durante el proceso de des-diferenciación y regeneración en cultivo *in vitro*. La aplicación de giberelinas exógenas, particularmente de GA₃, resulta una alternativa muy efectiva para la producción de inflorescencias en plantas aclimatadas de *L. alpinum*, permitiendo la obtención de inflorescencias en invernadero a baja altitud, de manera sincronizada y sin restricciones estacionales (Figura 5E-H).

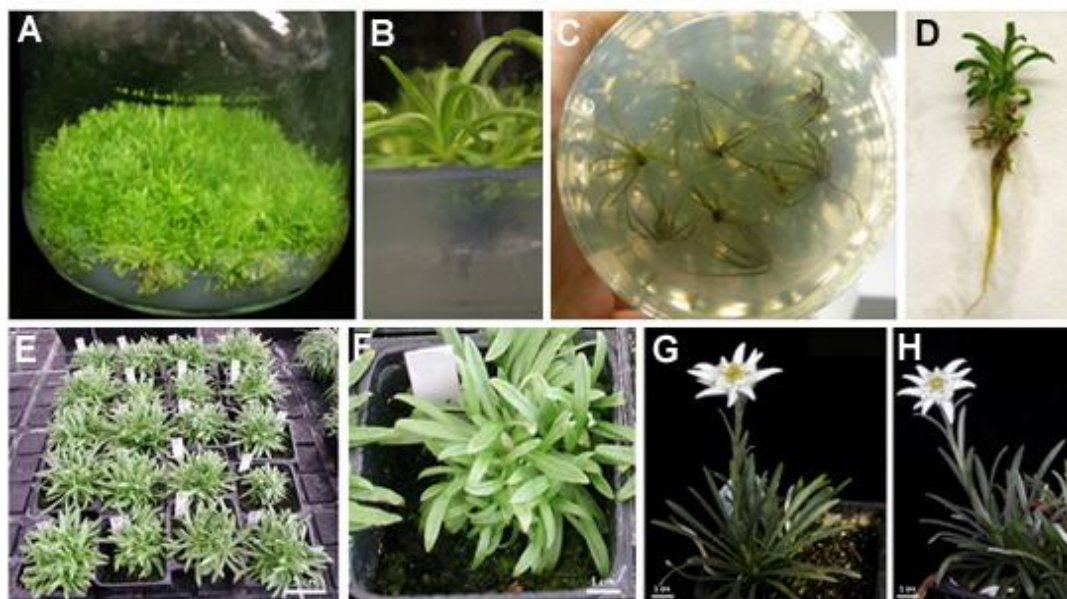


Figura 5. Fases de la micropropagación *in vitro* de *L. alpinum* Cass. **A.** Brotes en medio de multiplicación (EDM) tras varias semanas de cultivo. **B.** Detalle de la proliferación de brotes en medio EDM. **C.** Enraizamiento de brotes en medio EDR. **D.** Brote enraizado extraído del medio de cultivo EDR. **E.** Cultivo en alveolos de plantas micropropagadas aclimatadas en invernadero. **F.** Detalle de planta aclimatada en alveolo. **G.** Inflorescencias obtenidas en el ensayo de inducción de la floración con distintas formulaciones de GA₃. Planta tratada con AG-100®. **H.** Planta tratada con GA₃, el resultado es muy similar (Mondéjar, 2014).

Una vez establecido el protocolo de multiplicación y de inducción de la floración en *L. alpinum*, nos proponemos la producción de plantas de *L. alpinum* mediante micropropagación *in vitro* y su aclimatación a condiciones de invernadero para ser utilizadas como material de partida en ensayos encaminados a incrementar la producción de metabolitos de efecto antioxidante en la planta mediante condiciones estresantes mediadas por distintos elicitores. Los distintos órganos de la planta (hojas y flores) se utilizarán como material de partida para evaluar su contenido en compuestos antioxidantes.

6. Aplicación de elicitores a plantas de *L. alpinum* para incrementar sus niveles de metabolitos antioxidantes

En estudios previos se ha descrito la aplicación de determinados elicitores para incrementar la producción de antioxidantes, tanto en plantas cultivadas *in vitro* (Srivastava *et al.*, 2016) como en cultivos celulares (Manivannan *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta estos resultados, nos hemos propuesto la utilización de algunos elicitores en las plantas de *L. alpinum* cultivadas *in vitro* con el objetivo de intentar incrementar la producción de metabolitos antioxidantes de interés.

Los elicitores elegidos han sido cuatro: coronatina, metil jasmonato, nitrato de plata y sacarosa a altas concentraciones. Estos elicitores han sido seleccionados por sus efectos en otras plantas mediante el estudio previo de la bibliografía existente. Se ha descrito que la aplicación de dichos elicitores induce la acumulación de metabolitos secundarios relacionados con el metabolismo de los antioxidantes, aumentando así su producción en las plantas tratadas (Figuroa Pérez *et al.*, 2014; Manivannan *et al.*, 2016).

6.1 Coronatina y metil jasmonato

La **coronatina** es una fitotoxina producida por el patógeno *Pseudomonas syringae*. Se compone de ácidos coronafácicos, que son similares estructuralmente al ácido jasmónico (JA) y al ácido carboxílico aminociclopropano (ACC), precursor inmediato del etileno en su ruta de biosíntesis, respectivamente. De esta manera, la coronatina funciona como un imitador molecular de JA y suprime las respuestas del hospedante mediadas por ácido salicílico (SA) lo que contribuye a la virulencia del patógeno. El compuesto necesita conjugarse con aminoácidos para ser activo *in planta*. Muchos investigadores sostienen que la coronatina ejerce su efecto activando la ruta de señalización del ácido jasmónico endógena de las plantas (Zhao *et al.*, 2003).

La coronatina tiene un gran potencial de actuar como regulador de crecimiento en plantas y de inducir el metabolismo secundario. Entre sus efectos se incluye la inducción de la biosíntesis de ácido jasmónico, afectando la respuesta y la señalización hormonal en tomate (Uppalapati *et al.*, 2005), además de una gran cantidad de efectos biológicos como cambios en la estructura del cloroplasto, adelgazamiento de la pared celular, inducción de antocianinas, inhibición de la elongación de raíces, hipertrofia, clorosis, producción de metabolitos secundarios, emisión de etileno, acumulación de inhibidores de proteasas y muerte celular por apoptosis (Tamogami y Kodama, 2000). Por tanto, la coronatina parece ser un análogo funcional del ácido jasmónico y otros compuestos relacionados, como el metil jasmonato y el ácido 12-oxo-fitodienoico, el precursor de 18 carbonos del ácido jasmónico y del metil jasmonato (Onrubia *et al.*, 2013), y actuaría mediante las rutas del ácido jasmónico, etileno y auxinas (Uppalapati *et al.*, 2005) regulando gran cantidad de procesos en la planta, como la activación del metabolismo secundario o actuando de mensajero en la respuesta defensiva de la planta contra gran cantidad de estreses. Como la coronatina se asemeja a los compuestos del jasmonato, su modo de acción puede ser similar pero hay que tener en cuenta que la coronatina tiene una estructura química más estable, por lo que es más difícil de inactivar o convertir en compuestos menos activos, por lo que la planta no puede evitar la respuesta masiva al no poder atenuar la señal. Esto explicaría los niveles altos de inducción que se observan en el metabolismo secundario de las plantas tratadas con coronatina en comparación con las tratadas con jasmonatos (Onrubia *et al.*, 2013).

El papel de los jasmonatos ha sido estudiado en profundidad, pero no ha sucedido lo mismo con la coronatina. En algunos de los ensayos realizados se observó que las plantas tratadas con coronatina tenían una mayor producción de flavonoides que las tratadas con idénticas concentraciones de jasmónico (Haider *et al.*, 2005). En este trabajo hemos utilizado las concentraciones aplicadas por Onrubia *et al.* (2013) en el estudio de la producción de taxanos en cultivos celulares de tejo (100µM de MeJa y 1µM de coronatina). En ensayos sucesivos se rebajó la dosis de MeJa, pues esta dosis tan elevada resultó mortal en plantas de *L. alpinum*. Katsir *et al.* (2008) ya demostraron que la coronatina es más eficiente estimulando la ruta del jasmónico que el metil jasmonato. Al igual que Uppalapati *et al.* (2005) demostraron que para tener el mismo efecto con ambos elicitors, el metil jasmonato debe aplicarse a dosis muy superiores a las de la coronatina. Esto puede ser explicado por la transducción de señal que tienen ambos compuestos, pues se reconocen de manera diferente por parte de la planta e inician respuestas defensivas diferentes.

El **metil jasmonato** por su parte es un conocido elicitor utilizado para incrementar la cantidad de metabolitos secundarios en las plantas. Es un lípido derivativo de la membrana celular, sintetizado por la vía de la lipoxigenasa y del que se ha demostrado su papel en la transducción de señal intracelular en procesos de respuesta a varios elicitors (Won Suh *et al.*, 2013). También está relacionado con la defensa, pues es un derivado del ácido jasmónico. Además, puede inducir en la planta la producción de una gran variedad de sustancias con actividad

antibiótica y de inhibidores de proteasas, los cuales interferirían con el proceso digestivo del patógeno que estuviera alimentándose de la planta. El metil jasmonato ha sido utilizado en diversos ensayos de floración, morfología y maduración de fruto, pues sus niveles interfieren en todos estos procesos además de inhibir el crecimiento de la raíz.

6.2 Nitrato de plata (AgNO_3) y sacarosa a altas concentraciones

El **nitrato de plata** es un potente inhibidor de la acción fisiológica del etileno. Además, los metales pesados son conocidos por generar especies reactivas de oxígeno que causan estrés oxidativo en las plantas. Esto lleva a la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados generando varias oxilipinas responsables de la activación de genes de defensa en la planta (Mithöfer *et al.*, 2004). Por otra parte, también se ha visto que los tratamientos con micropartículas de plata actúan como antibiótico y antifúngico, pero este mismo efecto es el que producen las especies reactivas de oxígeno en las plantas.

El incremento en la producción de metabolitos secundarios después de que las plantas sean tratadas con metil jasmonato o nitrato de plata parece ser el resultado de la activación de enzimas relacionadas con la biosíntesis de fitoesteroles y la producción de especies reactivas de oxígeno, si bien para reforzar esta hipótesis se requiere de más estudios transcriptómicos y proteómicos (Won Suh *et al.*, 2013). Lo que sí que se ha observado es que esta respuesta al estrés por metales pesados es similar a la respuesta de la planta frente a cualquier infección (Mithöfer *et al.*, 2004). También habría de tenerse en cuenta que los iones de plata son reducidos por los azúcares del medio de cultivo o transformados por las sales, por lo que la composición general del medio de cultivo también será importante al tener la capacidad de alterar la biodisponibilidad del nitrato de plata (Hansen y Thünemann, 2015). La toxicidad del nitrato de plata hará que la planta presente unas raíces más cortas y un visible daño oxidativo (Cvjetko *et al.*, 2017).

Las altas concentraciones de azúcares, en concreto de **sacarosa**, también ocasionan cambios importantes en las plantas. Cormier *et al.* (1990) realizaron diferentes estudios utilizando unas concentraciones de sacarosa de 20, 30, 50 y 60 g por litro, concentraciones similares a las usadas en este trabajo. Con esto pudieron observar que las plantas tratadas con 20 a 30 g de sacarosa presentaban un crecimiento normal, pero a los 50 g de sacarosa ya se observaba acumulación de antocianinas y retrasos en el crecimiento celular, además de una muerte prematura y oscurecimiento del medio de cultivo. Las altas concentraciones de sacarosa también ocasionan una disminución de la actividad fotosintética en la planta, pues los centros activos del fotosistema dejan de ser funcionales. Además, la planta acumula una mayor cantidad de azúcares en su interior y presenta un metabolismo mixotrófico. Estas diferencias se van atenuando cuando la planta pasa a cultivarse *ex vitro* en condiciones normales, hasta llegar a las dos semanas donde ya no se observan diferencias entre las plantas estresadas y las crecidas en condiciones normales (Van Huylenbroeck y Debergh, 1996).

Estas altas concentraciones de azúcares generan gran cantidad de cambios en las plantas, como cambios bioquímicos, cambios en la biosíntesis de determinados metabolitos, control de la entrada de agua a la planta, transporte de iones a través de membranas, etc. Todo ello lleva a un estado de estrés general en la planta, ocasionando un menor crecimiento y una mayor tasa de apoptosis.

7. Análisis del contenido en antioxidantes de las plantas de *L. alpinum*

Para medir la capacidad antioxidante de los extractos de *L. alpinum* sometidas a diferentes tipos de estrés existen numerosos métodos, todos ellos sirven para cuantificar la capacidad antioxidante de un compuesto químico. En este proyecto se utilizó el método de Falchi *et al.*, (2006) que mide la reactividad del extracto ensayado frente al radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrylhidrazil, Sigma), ya que existen gran cantidad de variantes para este método (Deng *et al.*, 2010). Para poder cuantificar el poder antioxidante de los extractos ensayados se realiza un cálculo de su ED₅₀, que se define como la concentración necesaria de extracto para reducir la absorbancia del DPPH a la mitad medida a una longitud de onda de 517 nanómetros (nm). Como producto de referencia se utilizará el DPPH diluido en etanol. Habrá que tener en cuenta que este tipo de resultados son cuantitativos y la reacción con el DPPH se puede ver influenciada por el solvente utilizado y las condiciones ambientales del ensayo como tiempo de incubación, temperatura, luz, etc. (Sharma y Bhat, 2009).

La reacción del DPPH es una reacción colorimétrica que se puede cuantificar mediante el uso de un espectrofotómetro. El DPPH es un radical libre estable en disolución con etanol, y tiene su máximo de absorción en 517 nm por eso tiene un color violeta. Al añadir nuestro extracto problema a la solución de DPPH, los radicales libres del DPPH interaccionan con los antioxidantes de la muestra, pues esta le cede los protones y se neutraliza este radical libre. El DPPH pasa a ser amarillo, y lo que se mide en el espectrofotómetro es el cambio de color que ha ocurrido en la muestra (Sharma y Bhat, 2009). A más antioxidantes, más amarilla se quedará la muestra. En la figura 6 podemos observar un esquema simplificado del proceso.

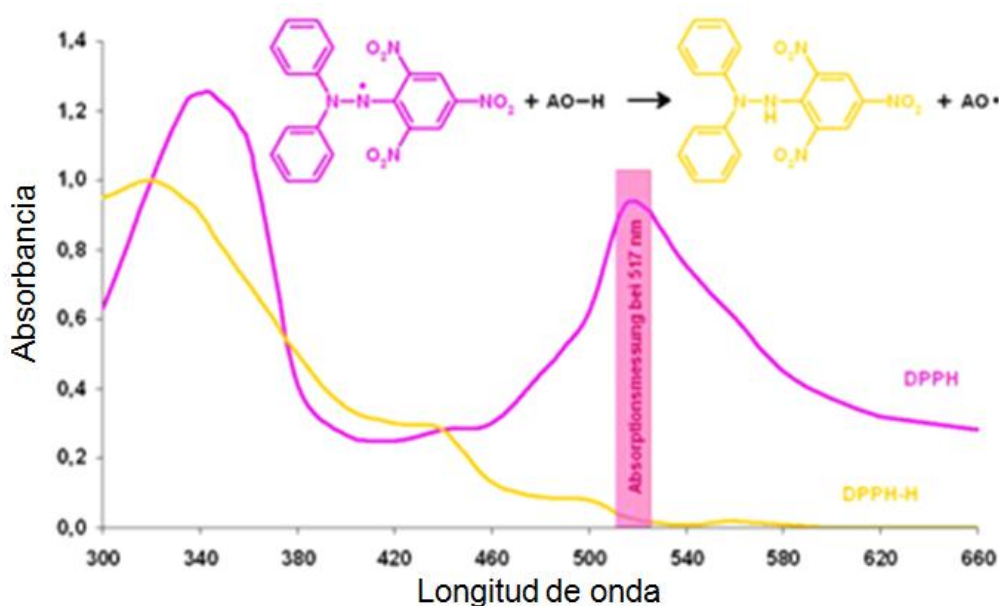


Figura 6. Esquema simplificado de la reacción del DPPH. Tiene el máximo de absorción a 517 nm y al añadir la muestra se observa una disminución en la absorción a esta longitud de onda, pues la muestra se vuelve amarilla.

OBJETIVOS

El **objetivo general** de este proyecto es la producción de plantas de *L. alpinum* mediante micropropagación *in vitro*, su aclimatación a condiciones de invernadero e inducir su floración mediante la aplicación exógena de giberelinas, para ser utilizadas como material de partida en ensayos encaminados a intentar incrementar la producción de metabolitos de efecto antioxidante en la planta mediante condiciones estresantes mediadas por distintos elicitores.

Para ello nos proponemos la realización de los siguientes objetivos concretos:

Objetivo 1: Producción de plantas de *L. alpinum* mediante micropropagación *in vitro* y posterior aclimatación a condiciones de invernadero.

Objetivo 2: Someter la planta a condiciones estresantes mediadas por distintos elicitores (metil jasmonato, coronatina, nitrato de plata y sacarosa a altas concentraciones) para intentar incrementar la producción de compuestos antioxidantes. Se medirá el efecto de los elicitores en las distintas fases del desarrollo de la planta y en las diferentes concentraciones aplicadas para evaluar su actividad antioxidante.

Objetivo 3: inducción de la floración del material aclimatado mediante adición de giberelina exógena (GA₃). Se medirá el efecto de los elicitores en el posible incremento de la actividad antioxidante de sus flores.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

Se han empleado tres clones diferentes de *Leontopodium alpinum* propagados mediante cultivo *in vitro*. Dichos clones (denominados MAM y BURJ) fueron obtenidos a partir de plantas silvestres recolectadas en el Puerto de Bujaruelo en el Pirineo Aragonés, donde las temperaturas medias diarias se encuentran en torno a 0 °C en invierno, y unos 14 °C en verano (Mondéjar, 2014). Estas plantas fueron seleccionadas y propagadas en el laboratorio de Biología y Biotecnología del Desarrollo Reproductivo del IBMCP donde se ha llevado a cabo el TFM y donde actualmente se mantienen mediante micropropagación *in vitro*. Tras una fase de multiplicación se procedió al enraizamiento individualizado de las plantas *in vitro* y posteriormente a su aclimatación en alveolos en condiciones de invernadero.

2. Medios de cultivo y elicitores

2.1 Preparación de medios de cultivo

Tras disolver en solución acuosa todos los componentes, se ajustó el pH a 5,8 con ayuda de NaOH 1N y HCl 1N, antes de añadir el agente gelificante. Los medios se esterilizaron por calor húmedo en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Los componentes del medio y los antibióticos que no se pueden autoclavar se esterilizaron por filtración y se añadieron al medio una vez autoclavado.

2.2 Soluciones minerales y vitamínicas

Solución mineral A:

Macroelementos

Nitrato amónico [NH ₄ NO ₃]	400 mg/l
Nitrato cálcico [Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O]	1.200 mg/l
Nitrato potásico [KNO ₃]	2.100 mg/l
Sulfato magnésico [MgSO ₄ 7H ₂ O]	360 mg/l
Fosfato potásico [KH ₂ PO ₄]	272 mg/l

Microelementos

Yoduro potásico [KI]	0,83 mg/l
Ácido bórico [H ₃ BO ₃]	6,20 mg/l
Sulfato de manganeso [Mn SO ₄ 3H ₂ O]	16,9 mg/l
Sulfato de zinc [ZnSO ₄ 7H ₂ O]	8,6 mg/l
Ácido molibdénico [Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O]	0,25 mg/l
Sulfato cúprico [Cu SO ₄ 5H ₂ O]	0,025 mg/l
Cloruro de cobalto [CoCl ₂ 6H ₂ O]	0,025 mg/l

Quelato de hierro

EDTA Na ₂	37,3 mg/l
Sulfato férrico [FeSO ₄ 7H ₂ O]	27,8 mg/l

Solución mineral LP de Quoirin y Lepoivre (1977)

Macronutrientes	Nitrato amónico [NH ₄ NO ₃]	400 mg/l
	Nitrato cálcico [Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O]	1.200 mg/l
	Nitrato potásico [KNO ₃]	1.800 mg/l
	Sulfato magnésico [MgSO ₄ 7H ₂ O]	360 mg/l
	Fosfato potásico [KH ₂ PO ₄]	270 mg/l
Micronutrientes	Yoduro potásico [KI]	0,08 mg/l
	Ácido bórico [H ₃ BO ₃]	6,20 mg/l
	Sulfato de manganeso [Mn SO ₄ 2H ₂ O]	0,76 mg/l
	Sulfato de zinc [ZnSO ₄ 7H ₂ O]	8,6 mg/l
	Ácido molibdénico [Na ₂ Mo O ₄ 2H ₂ O]	0,25 mg/l
	Sulfato cúprico [Cu SO ₄ 5H ₂ O]	0,025 mg/l
	Cloruro de cobalto [CoCl ₂ 6H ₂ O]	0,025 mg/l
FeNa EDTA	FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8 mg/l
	Na ₂ EDTA	37,3 mg/l

Soluciones vitamínicas

McCow's WPM Vitaminas

Glycina	2 mg/l
Myo- inositol	100 mg/l
Ácido nicotínico	0,5 mg/l
Pyridoxina HCL	0,5 mg/l
Tiamina HCl	0,1 mg/l

Solución vitamínica de Murashige y Skoog (1962)

Glycina	2 mg/l
Myo- inositol	100 mg/l
Ácido nicotínico	0,5 mg/l
Pyridoxina HCL	0,5 mg/l
Tiamina HCl	1 mg/l

Otros

Ácido ascórbico	10 mg/l
Ácido cítrico	10 mg/l
Ácido fólico	1 mg/l

BAP (Bencil amino purina)	0,2 mg/l
AIA (Ácido indolacético)	0,1 mg/l
Sacarosa	30 g/l
Agar	5,5 – 6 g/l
pH	5,8

2.3 Medios de cultivo

Medio de multiplicación de brotes (EDM)

Solución mineral	A
Solución vitamínica	McCow's WPM
Ácido ascórbico	10 mg/l
Ácido cítrico	10 mg/l
Ácido fólico	1 mg/l
BAP (Bencil amino purina)	0,2 mg/l
AIA (Ácido indolacético)	0,1 mg/l
Sacarosa	30 g/l
Plant propagation Agar	6 g/l

Medio de enraizamiento (EDR)

Solución mineral LP	3,3 g/l
Solución vitamínica	MS (Duchefa)
Sacarosa	20 g/l
Agar bacteriológico Europeo (Pronadisa)	5,5 g/l

2.4 Elicitores utilizados

En los ensayos para intentar incrementar la producción de metabolitos en las plantas micropropagadas mediante condiciones estresantes se han utilizado cuatro tipos de elicitores (metil jasmonato, coronatina, AgNO₃ y sacarosa). Los elicitores se añaden al medio de cultivo mientras este permanece líquido a más de 65 °C. El nitrato de plata se disuelve en agua destilada caliente y se esteriliza por filtración (0.22 µm) para luego añadirse al medio a concentraciones de 15, 30 y 60 µM AgNO₃ respectivamente. De forma similar soluciones estériles de metil jasmonato en etanol al 96% se añaden a concentraciones de 5, 15 y 25 µM. En el caso de la coronatina la concentración de uso ha sido de 1.0 µM y se ha preparado en una disolución en dimetilsulfóxido (DMSO). Para el tratamiento de estrés osmótico se añadió al medio de cultivo 5%, 6% y 7% de sacarosa. El material vegetal se recoge a las 4 semanas de cultivo, se tritura con ayuda de nitrógeno líquido y se deseca mediante liofilización para realizar la posterior extracción de metabolitos.

3. Micropropagación de *Leontopodium alpinum*

3.1 Micropropagación y adición de elicitores

Las plantas de *L. alpinum* propagadas *in vitro* obtenidas previamente en el laboratorio se pasaron a medio de multiplicación para así aumentar su número. Se cultivaron en botes de vidrio con tapa de plástico traslúcido con 125 ml de medio de multiplicación EDM. El cultivo se llevó a cabo en las condiciones de fotoperiodo y temperatura descritas en el apartado 4.1. Los brotes que van apareciendo son repicados a medio de cultivo fresco o a cualquiera de los tratamientos descritos.

Para realizar los pertinentes ensayos en presencia de elicitores, las plantas se pasaron a medio de cultivo de multiplicación donde se habían añadido los distintos elicitores a diferentes concentraciones. Después de un mes en este medio, se pasaron a medio de enraizamiento con las mismas concentraciones de elicitores utilizadas previamente. Algunas de ellas se pasaron a medio de enraizamiento sin elicitor, para poder observar si un solo pase por el medio de cultivo con elicitor era suficiente para observar una respuesta. Después de estar un mes en multiplicación y otro mes en enraizamiento (con o sin elicitores) estas plantas fueron aclimatadas en el invernadero, donde estuvieron un mes sin ningún tipo de elicitor. Después de este mes se recogió material vegetal del invernadero para los posteriores análisis. El material que quedó en el invernadero se trató con giberelinas para la inducción de la floración y luego se recolectaron las flores para su análisis.

3.2 Enraizamiento de *Leontopodium alpinum* y posterior aclimatación

Los brotes obtenidos en la fase de multiplicación o en cualquiera de los medios con elicitores se cultivaron en botes de vidrio con tapa de plástico traslúcido con 125 mL de medio de enraizamiento EDR con o sin elicitor. Los cultivos se sometieron a condiciones de fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) con una intensidad lumínica de $50 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ suministrada por una fuente de luz fría (tubos fluorescentes Philips TLD 36W/33-640) y una temperatura de 20 ± 2 °C. A las 8 semanas de cultivo (4 semanas en EDM y otras 4 en EDR, con o sin elicitores) se procedió a su aclimatación en invernadero, para lo que fueron trasplantadas a alvéolos de plástico de 8 x 8 x 6,5 cm que se dispusieron en bandejas a razón de 20 alvéolos por bandeja y se cultivaron en las condiciones descritas en el apartado 4.2.

Las bandejas permanecieron cubiertas con plástico transparente, en el que progresivamente se fueron haciendo perforaciones durante varios días a fin de evitar una excesiva condensación de agua. Tras el período de aclimatación, las plantas se cultivaron en macetas en cabinas de invernadero bajo condiciones controladas de luz y temperatura como se ha descrito en el apartado 4.2.

3.3 Inducción de la floración en plantas de invernadero

Para los ensayos de inducción de la floración se utilizaron plantas aclimatadas de *L. alpinum* cultivadas en las diferentes condiciones (con o sin elicitores). Se utilizó ácido giberélico (GA₃, Duchefa) a concentración de $3 \cdot 10^{-4}$ M, equivalente a 100 mg/L. El tratamiento se preparó a partir de una solución stock en metanol de GA₃ 10^{-2} M que también incorpora Tween® 20 (Sigma-Aldrich) al 0,1%. El GA₃ se aplicó mediante rociado de la roseta basal de hojas utilizando un volumen de 3 mL por planta según se describe en Mondéjar (2014). Se realizaron una, dos y tres aplicaciones con objeto de elegir la aproximación que da mejor resultado.

3.4 Efecto de la adición de distintas concentraciones de distintos elicitores al medio de cultivo

Para determinar el medio de cultivo más adecuado para la producción de antioxidantes por los brotes regenerados y multiplicados *in vitro*, se utilizaron tanto los medios EDR como EDM a los que se les añadieron distintas concentraciones de varios elicitores como se ha descrito en el apartado 2.1.

- Coronatina: 1 μ M
- Metil jasmonato: 5, 15 y 25 μ M
- Nitrato de plata: 15, 30 y 60 μ M
- Sacarosa: 30, 45, 60 g/L.

4. Condiciones de cultivo

4.1 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* se realizó en cámara de cultivo con temperatura constante de 24 °C bajo condiciones de fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). La luz fue suministrada por tubos fluorescentes de tipo GroLux 36 W (Sylvania) con una intensidad de 90 μ mol m⁻²s⁻².

4.2 Cultivo en invernadero

Las plantas ya enraizadas *in vitro* fueron posteriormente trasplantadas a alveolos en el invernadero, en una mezcla de turba y vermiculita 1:1 (v/v) contenida en bandejas de plástico y regadas por inmersión con solución nutritiva Hoagland nº1 suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966). Las plantas recién aclimatadas se cubrieron con plástico transparente para mantener la humedad y se colocaron en el invernadero. A los pocos días se perforó el plástico y el número y tamaño de las perforaciones se fue aumentando progresivamente hasta que a los 7 días se retiró completamente. Tras el periodo de aclimatación, las plantas se cultivaron en cabinas de invernadero bajo condiciones controladas

de luz y temperatura. El riego se llevó a cabo por inmersión con la solución nutritiva descrita anteriormente.

En el invernadero la temperatura se mantuvo a 22 °C de día y 18 °C de noche con un fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). Cuando fue necesario, la luz natural se suplementó con luz artificial mediante lámparas de halogenuro metálico POWERSTAR® HQI®-BT 400 W/D Daylight E40 (Osram) y de sodio de alta presión MASTER SON-T PIA PLUS Hg Free 400W/220 E40 1SL (Philips).

5. Análisis del contenido en antioxidantes

5.1 Recogida de muestras y procesado

La recogida de muestras se llevó a cabo tanto en el laboratorio en condiciones estériles como en el invernadero. Para ello, se congeló el material vegetal (rosetas de hojas y flores) rápidamente con ayuda de nitrógeno líquido y se trituró para su posterior liofilización, la cual se llevó a cabo en un liofilizador CHRIST Alpha 1-2 (B. Braun Biotech International) durante dos días o hasta que el material estuvo completamente seco.

5.2 Extracción y cuantificación del contenido en antioxidantes

Una vez se dispuso del material vegetal liofilizado, se procedió a realizar una extracción metanólica de los metabolitos de la muestra. Para ello se partió de 0,1 g de material liofilizado al que se le añadió 2,5 ml de una solución de metanol : agua al 90%. La muestra se trituró con la disolución de metanol hasta su completa homogeneización y se sonicó durante 10 minutos. Después se centrifugó durante 15 minutos a 14.000 rpm y a 4 °C. El sobrenadante se pasó a un vial de vidrio y el precipitado se resuspendió con 1 ml de la mezcla de etanol agua, el cual se volvió a centrifugar durante 15 minutos en las mismas condiciones para su reextracción. Este nuevo sobrenadante se añadió al vial de vidrio con el sobrenadante anterior. El extracto metanólico que se encontraba en el vial de vidrio se secó bajo una fuente de nitrógeno y a 37 °C durante unos 90 minutos, hasta que estuvo completamente seco.

A la muestra seca se le añadió 1 ml de una disolución de metanol : agua al 90% con H₃PO₄ al 0,02% y se resuspendió con un vórtex. Una vez resuspendido, se pasó a un eppendorf y se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 rpm y a 4 °C. Este extracto de *L. alpinum* obtenido se diluyó para su cuantificación mediante el método del DPPH, midiendo la habilidad de la muestra para captar el radical libre DPPH.

Para nuestro ensayo se utilizó el DPPH a una concentración de 0,5 mM diluido en etanol. Los extractos de *L. alpinum* se diluyeron para su medición a una dilución 1:10 con etanol. La prueba de actividad se realizó a partir de 50 µl del extracto diluido 1:10, 750 µl de etanol y 250 µl de DPPH 0,5 mM. La mezcla se incubó 10 minutos en la bancada del laboratorio (luz y temperatura ambiental) y se midió la absorbancia de las muestras a 517 nm en el espectrofotómetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 1000E).

El rendimiento de la reacción se calculó a partir del valor de la absorbancia mediante la siguiente fórmula:

$$S = 100 - \left(\frac{Ax}{A_0} \right) \times 100$$

Donde S es el rendimiento final, Ax el valor de la absorbancia de la muestra y A_0 el valor de absorbancia del DPPH sin la muestra, todo ello medido a 517 nm.

6. Análisis estadístico de los resultados

Los datos obtenidos de la medición con el espectrofotómetro se analizaron mediante un Anova en el programa GraphPad Prism 6. Utilizaremos un test de la t para saber si las diferencias entre las muestras son significativas.

RESULTADOS

1. Micropropagación de *Leontopodium alpinum* Cass.

Leontopodium alpinum es una planta protegida que cuenta con interés comercial por su atractivo ornamental así como por ser fuente de metabolitos secundarios de uso medicinal y cosmético. Por ese motivo, el desarrollo de métodos de micropropagación y de inducción de la producción de antioxidantes que permitan la producción a gran escala resulta de interés tanto para su conservación como para su explotación con fines comerciales. En este trabajo partimos de las variedades de *L. alpinum* del pirineo aragonés previamente propagadas por técnicas de cultivo *in vitro* en nuestro laboratorio (Mondéjar, 2014).

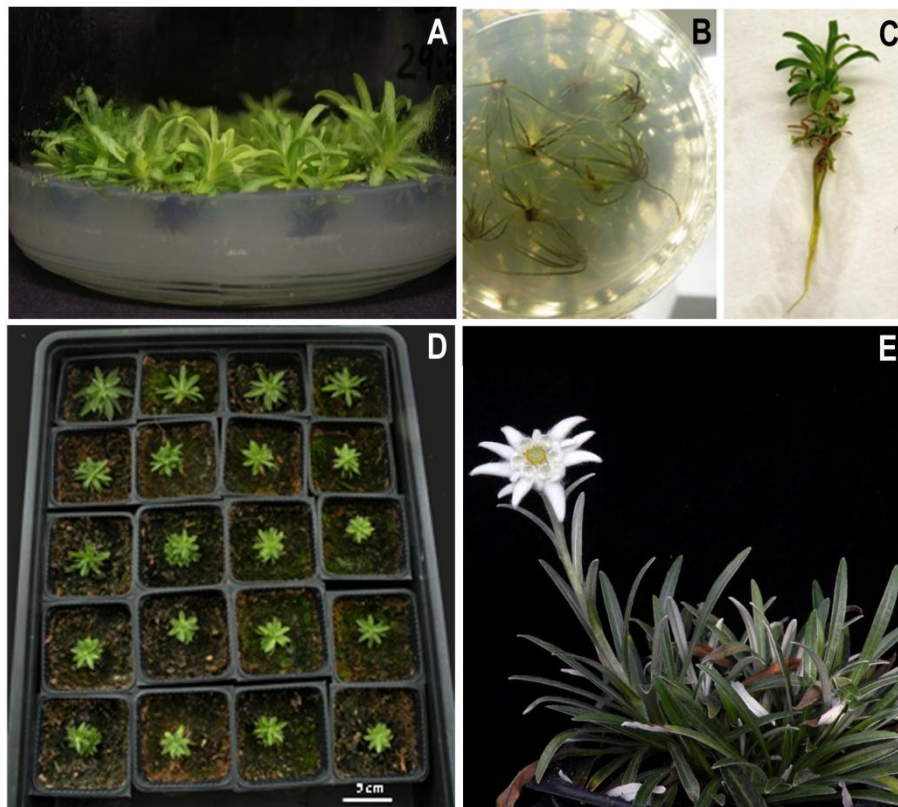


Figura 7. Propagación *in vitro* e inducción de la floración de *L. alpinum*. A. Plantas en medio de propagación. B. Plantas en medio de enraizamiento. C. Planta enraizada antes de pasarla a alveolo con sustrato para su aclimatación. D. Plantas aclimatadas en el invernadero. E. Planta floreciendo tras su tratamiento con GA₃.

2. Ensayos previos

Antes de la aplicación de elicitores a las plantas cultivadas *in vitro* se hicieron una serie de ensayos para comprobar la metodología propuesta para la realización de este TFM. En ensayos previos, se puso a punto el método de cuantificación del contenido en antioxidantes de las plantas de *L. alpinum* además de comprobar el posible efecto de los elicitores en las plantas cultivadas *in vitro*.

2.1. Ensayo de valoración de la actividad antioxidante de plantas de *L. alpinum* propagadas *in vitro*

Como ya se ha comentado anteriormente, disponíamos de tres clones de *Leontopodium alpinum*, dos del pirineo aragonés y otro procedente de semillas polacas de *L. alpinum*. Antes de la aplicación de los elicitores seleccionados realizamos un ensayo previo con estos tres clones para así saber cuáles de ellos tenían una mayor producción de antioxidantes *in vitro* con objeto de continuar los experimentos con solo dos de los tres clones.

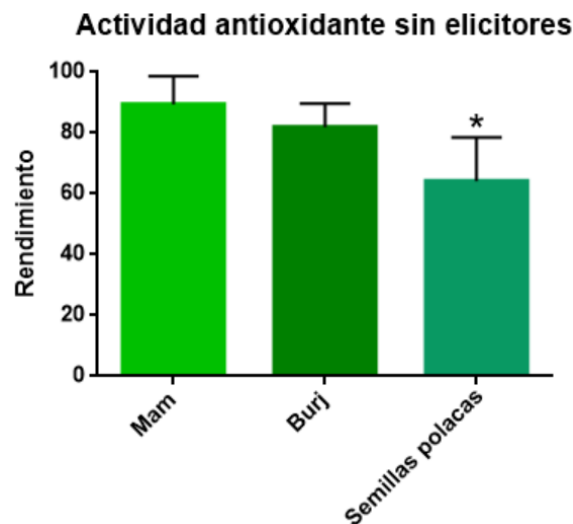


Figura 8. Actividad antioxidante de plantas multiplicadas en EDM de los tres clones seleccionados. El rendimiento se ha valorado según la fórmula descrita en el apartado 5.2 de materiales y métodos. La estadística se ha realizado con el programa GrapPad Prism mediante un test Anova.

Tal como se observa en la figura 8, los clones MAM y BURJ presentan una mayor producción de antioxidantes que en las plantas procedentes de semillas polacas antes de la adición de elicitores. Por tanto, continuamos nuestros experimentos con los dos clones que más antioxidantes presentan en condiciones *in vitro*: MAM y BURJ.

2.2. Efecto de los elicitores añadidos al medio de cultivo de los clones seleccionados

Con el objetivo de testar el efecto de la adición de elicitores y ver si realmente aumentaban la producción de antioxidantes en las plantas de *L. alpinum*, se realizó un primer ensayo en el que se añadió coronatina y metil jasmonato al medio de cultivo.

En este ensayo se observó que tanto las plantas multiplicadas en MeJa como en coronatina procedentes de ambos clones mostraban una tendencia a producir más antioxidantes que las plantas control, resultado que confirmaba que los elicitores eran capaces de aumentar la producción de antioxidantes en las plantas cultivadas *in vitro*. Sin embargo, solo en las plantas BURJ se observó una diferencia significativa (Figura 9). Estos resultados nos permitieron continuar con los ensayos propuestos, pues las plantas eran capaces de responder a los tratamientos con los elicitores.

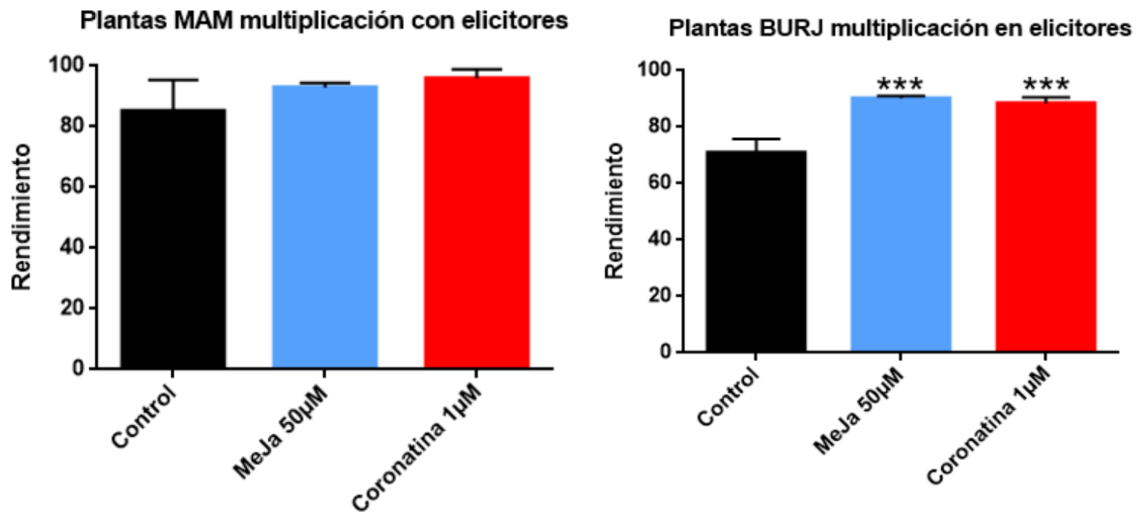


Figura 9. Actividad antioxidante de los dos clones seleccionados multiplicados en presencia de elicitores y su comparación con el control. Se observa que en ambos clones las plantas tratadas tienden a mostrar una mayor actividad antioxidante, aunque solo se observa una diferencia significativa en los clones BURJ.

3. Multiplicación de brotes en medio de cultivo con elicitores

Los brotes se cultivaron en medio de multiplicación EDM, realizando un sub-cultivo en el mismo medio cada 4 semanas. El proceso de amplificación tuvo lugar por brotación axilar múltiple de las yemas preexistentes en el brote. Para nuestro ensayo, las plantas se pasaron a medio de cultivo de multiplicación EDM en el cual se han añadido los distintos elicitores a las concentraciones indicadas anteriormente.

3.1. Multiplicación en coronatina 1 µM

En el primer ensayo de multiplicación en coronatina vemos que las plantas procedentes de ambos clones presentaban una mayor producción de antioxidantes respecto al control (Figura 10).

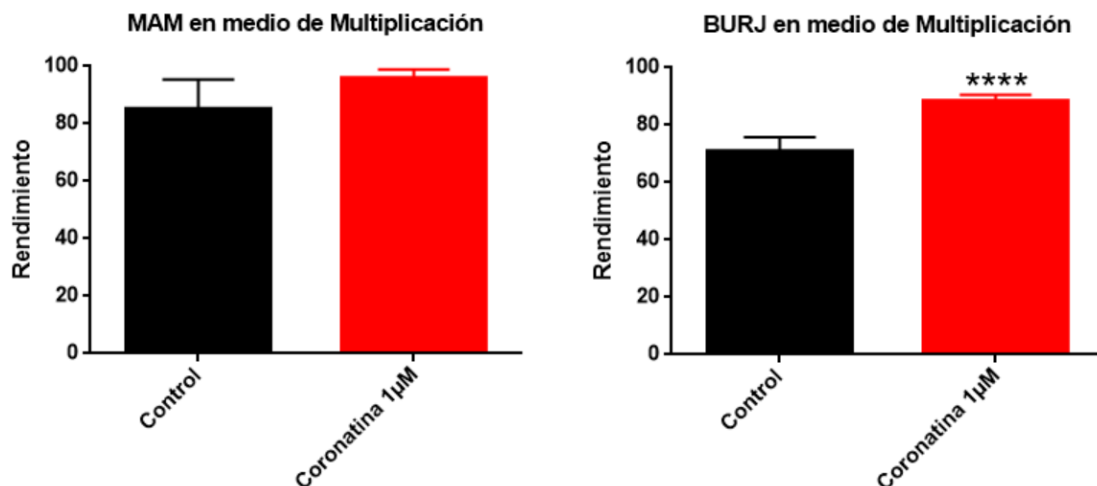


Figura 10. Actividad antioxidante de las plantas multiplicadas en coronatina. En ambos casos se observa una tendencia a una mayor actividad antioxidante por parte de las plantas tratadas en comparación con el control, aunque solo en las plantas BURJ resulta significativo.

3.2. Multiplicación en metil jasmonato 5, 15 y 25 μM

Estos ensayos se realizaron con una dosis menor de MeJa que la del ensayo preliminar (50 μM), pues las plantas morían al tratarse en concentraciones superiores. En esta fase de multiplicación no se observan diferencias entre el comportamiento del clon MAM y el clon BURJ, aunque las plantas del clon BURJ parece que presentan una mayor respuesta al MeJa. Ambos presentan una mayor actividad antioxidante en todas las concentraciones con las que fueron tratadas, siendo más significativa la actividad a mayores concentraciones.

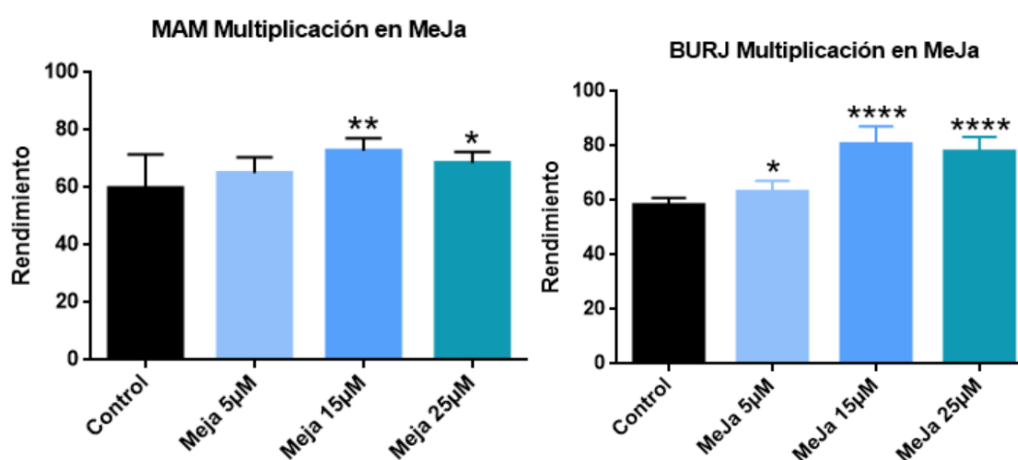


Figura 11. Actividad antioxidante de las plantas multiplicadas en metil jasmonato (MeJa). En ambos casos se observa una mayor producción de antioxidantes por parte de las plantas tratadas en comparación con el control, siendo más significativo en los clones BURJ.

3.3. Multiplicación en nitrato de plata 15, 30 y 60 μM

En los experimentos de multiplicación en nitrato de plata no se obtuvieron resultados concluyentes. Las plantas enraizaron en presencia de AgNO_3 en medio de multiplicación, mientras que los controles no lo hicieron. Estas plantas ya enraizadas se pasaron al invernadero sin pasar por la etapa de enraizamiento. Las raíces que presentaban eran rojizas, y el medio de cultivo ofrecía un aspecto anaranjado. Cabe destacar que las tratadas con nitrato de plata presentaban mejor aspecto que los controles, tal vez debido a su actividad antibacteriana, pues en los controles se observó una mayor proliferación bacteriana.

En la figura 12 observamos que los dos clones vieron reducida su capacidad antioxidante cuando se comparan con el control, tal vez porque en este caso el control estaba sometido a un estrés añadido por la bacteriosis y presentaban peor aspecto en general que las tratadas con nitrato de plata, que se encontraban mejor y no produjeron tantos antioxidantes como el control.

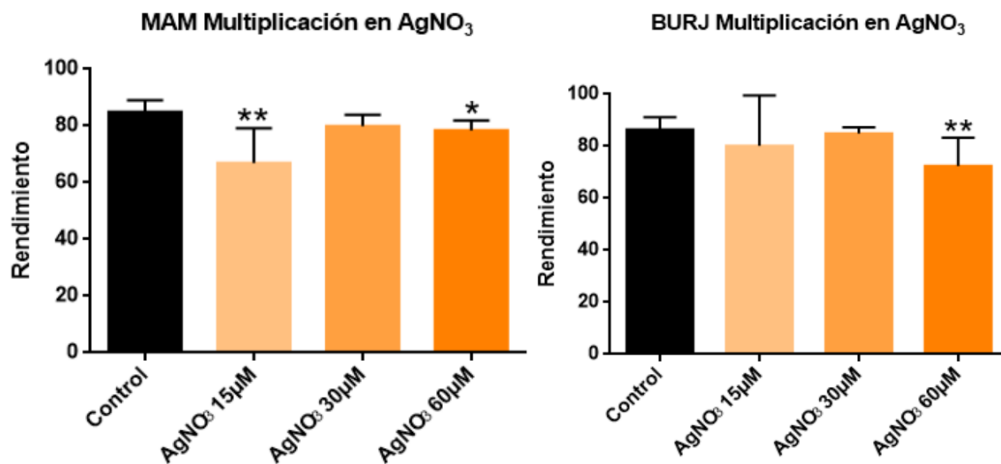


Figura 12. Actividad antioxidante de las plantas multiplicadas en nitrato de plata (AgNO₃). En ambos casos se observa una mayor producción de antioxidantes por parte de las plantas control, aunque también se observa una gran desviación en los datos. Habrá que tener en cuenta el estado general de las plantas analizadas.

3.4. Multiplicación en sacarosa 30, 45 y 60 g/l

Al multiplicar las plantas en altas concentraciones de sacarosa observamos que tenían una gran producción de antioxidantes al compararse con el control, además de que tenían una respuesta idéntica en los dos clones con resultados muy significativos (Figura 13). Hay que tener en cuenta que las altas concentraciones de sacarosa afectaron negativamente a las plantas, pues en la mayoría de los casos no consiguieron multiplicar o se contaminaron con bacterias.

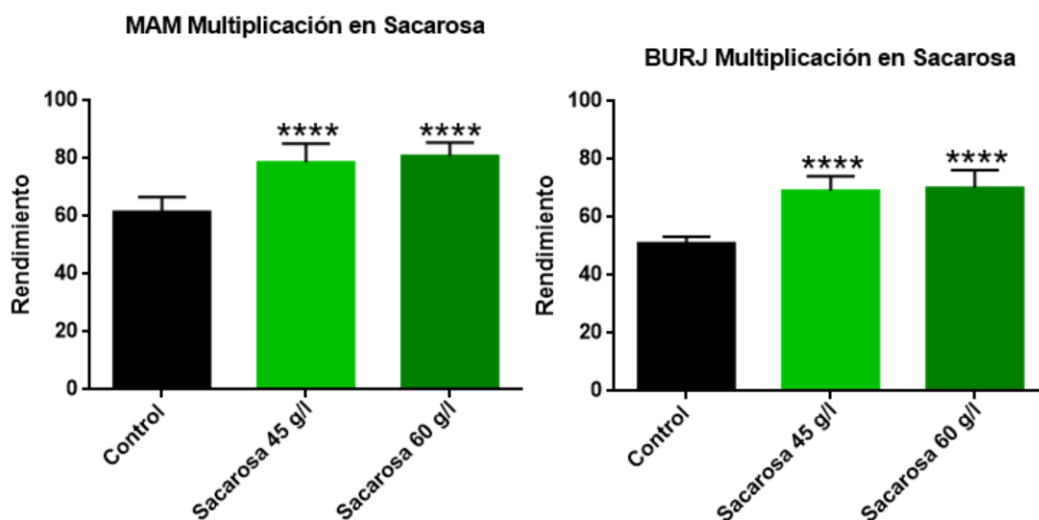


Figura 13. Actividad antioxidante de las plantas multiplicadas en presencia de sacarosa a altas concentraciones. En ambos casos se observa una mayor producción de antioxidantes por parte de las plantas tratadas con altas concentraciones de sacarosa. El control está multiplicado en 30 g/l de sacarosa.

4. Enraizamiento de los brotes con o sin elicitores

Después de un mes en el medio de multiplicación con elicitores, se pasaron a medio de enraizamiento EDR en las mismas concentraciones de elicitores en que estuvieron previamente. Algunas de ellas se pasaron a medio de enraizamiento sin elicitor, para poder observar si un solo pase por el medio de cultivo con elicitor es suficiente para observar una respuesta.

4.1. Enraizamiento en coronatina 1 μ M

Cuando pasamos a la fase de enraizamiento a las plantas multiplicadas en presencia de coronatina, observamos que las plantas de MAM tenían una elevada mortalidad, por lo que no pudimos obtener el suficiente material para analizar los antioxidantes y continuamos solo con las plantas de BURJ.

En la figura 14 se muestran los resultados de las plantas BURJ multiplicadas en presencia de coronatina y enraizadas con y sin elicitor. Las denominadas como de “un pase” estuvieron un mes multiplicando con elicitor y luego se enraizaron con medio sin elicitor, mientras que las denominadas como “dos pases” también se enraizaron con elicitor. Como muestra la figura 14 los antioxidantes producidos por las plantas que también enraizaron con coronatina son significativamente superiores a los controles.

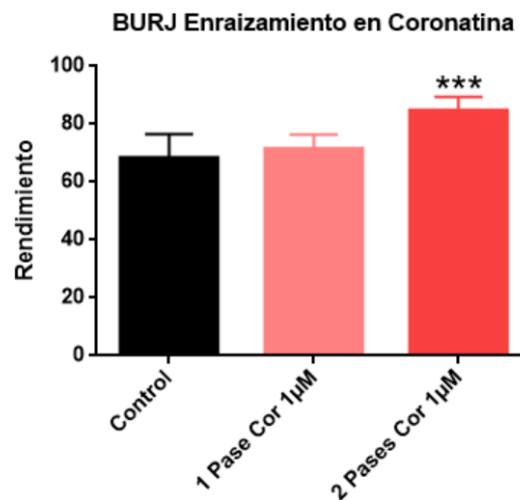


Figura 14. Actividad antioxidante de las plantas multiplicadas en coronatina y enraizadas con o sin presencia de ella. Se observa una mayor producción de antioxidantes por parte de las plantas que multiplicaron y enraizaron en coronatina, con resultados significativos.

4.2. Enraizamiento en metil jasmonato 5, 15 y 25 μM

Al pasar a la fase de enraizamiento, las plantas de MAM también presentaron problemas de mortalidad, por lo que solo disponemos de datos del clon BURJ.

En la figura 15 vemos que hay plantas que provienen de multiplicación en presencia de elicitor y que posteriormente han sido enraizadas con y sin elicitor. La figura muestra que tanto las que enraizan con elicitor como las que lo hacen sin él presentan una mayor actividad antioxidante. Cabe destacar que los datos que faltan se deben a que no se obtuvo suficiente material para realizar la extracción debido a la escasa supervivencia de las plantas.

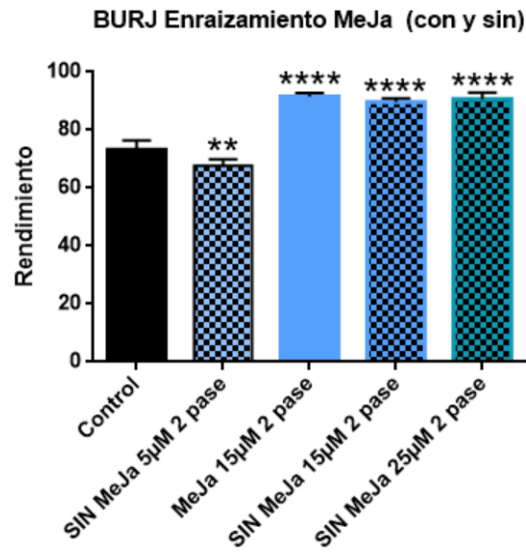


Figura 15. Actividad antioxidante de las plantas multiplicadas en MeJa y enraizadas con o sin él. Se observa una mayor producción de antioxidantes por parte de las plantas que multiplicaron y/o enraizaron en MeJa, con resultados significativos, aunque el enraizamiento sin 5 μM de MeJa es significativamente menor al control.

En la siguiente imagen (Figura 16) podemos ver una muestra del estado de las plantas BURJ después de enraizar con y sin 25 μM de metil jasmonato (estas plantas provienen de multiplicación en 25 μM de MeJa). Los datos de la actividad antioxidante de las plantas cultivadas en 25 μM de MeJa no aparecen en el gráfico de la figura 15 debido a la escasa supervivencia de las plantas. Se puede observar que las que enraizaron sin elicitor presentan un mejor aspecto que las que lo hicieron con elicitor. Los controles son los que presentan un mejor estado general, y al no haber estado bajo condiciones de estrés presentan una menor producción de antioxidantes, tal y como aparece en la figura 15.



Figura 16. Plantas de BURJ enraizadas con y sin MeJa. Los controles son los que presentan un mejor aspecto.

4.2.1. Plantas enraizadas pasadas a metil jasmonato

Este mismo tratamiento con metil jasmonato se realizó con plantas enraizadas, para así poder determinar si el MeJa se absorbe si la planta multiplicada *in vitro* tiene raíces o puede absorberse aunque no las tenga. En este experimento vemos que el clon BURJ mantuvo los niveles de antioxidantes del control, mientras que MAM tuvo unos niveles similares a los BURJ aunque su control tuvo unos niveles significativamente inferiores, por eso los resultados del clon MAM aparecen como significativos (Figura 17).

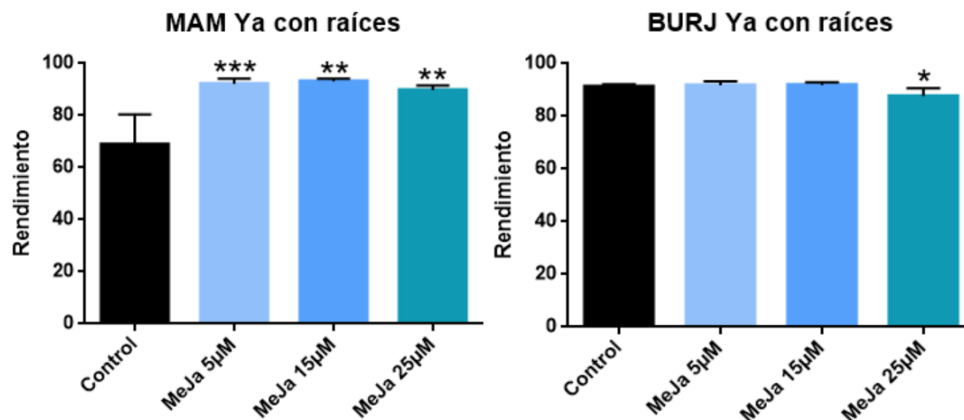


Figura 17. Actividad antioxidante de las plantas multiplicadas y enraizadas en medio control y en presencia de MeJa ya con raíces. Los resultados son similares a los del control, aunque en MAM aparezcan significativos debido al bajo nivel del control.

4.3. Enraizamiento en nitrato de plata 15, 30 y 60 μM

Ambos clones utilizados enraizaron cuando estaban en el medio de multiplicación con nitrato de plata, por tanto estas plantas se pasaron directamente al invernadero y se midieron como “multiplicación en nitrato de plata” como aparece en el apartado 3.3.

4.4. Enraizamiento en sacarosa 30, 45 y 60 g/l

Tal como se comenta en el apartado 3.4, las plantas multiplicadas en altas concentraciones de sacarosa no consiguieron multiplicar lo suficiente para poder seguir con los experimentos, además de que presentaban una alta tasa de bacteriosis debido a la elevada concentración de sacarosa. Por tanto, no tenemos datos de la actividad antioxidante de *L. alpinum* cuando se enraíza en altas concentraciones de sacarosa.

5. Aclimatación de los brotes enraizados con o sin elicitores

Después de estar un mes en multiplicación con elicitores y otro mes en enraizamiento (con o sin elicitores), las plantas fueron aclimatadas en el invernadero, donde estuvieron un mes sin ningún tipo de elicitor. Después de este mes se recogió material del invernadero para los posteriores análisis.

Se observó una mortalidad entorno al 30% en aquellas plantas que habían estado en contacto con elicitores, en cambio las que no habían estado en contacto con los elicitores experimentaron una mortalidad muy baja, en torno al 5%. Esta muerte del material vegetal que estuvo en contacto con elicitores ocasionó que no hubiera material vegetal suficiente para realizar algunos de los ensayos de actividad antioxidante. En la figura 18 podemos observar plantas de BURJ que se multiplicaron y crecieron en condiciones control.



Figura 18. Plantas BURJ tras 5 semanas en el invernadero. Estas plantas fueron tratadas posteriormente con giberelinas para inducir su floración.

5.1. Aclimatación de plantas tratadas con coronatina 1 μ M

Tal como se comentó en el apartado 4.1, no se obtuvo suficiente material vegetal del clon MAM y se continuó solo con los clones BURJ. Como podemos observar en la figura 19, la actividad antioxidante decreció después de estar un mes en condiciones de invernadero sin ningún elicitor, aunque hay un rendimiento significativamente menor en las plantas que estuvieron con el elicitor coronatina en algún momento del proceso, y sobre todo en aquellas que también enraizaron en elicitor, pues presentan unos niveles inferiores.

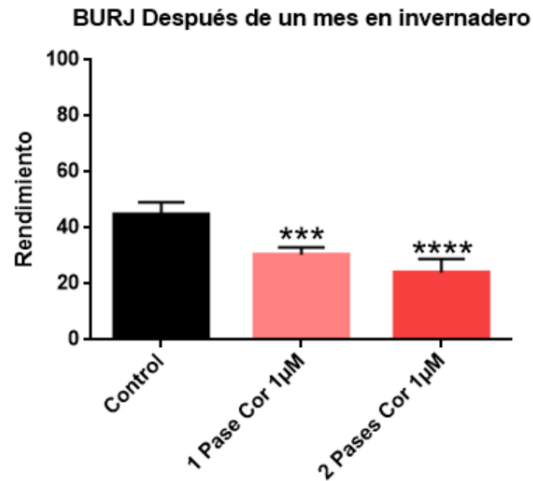


Figura 19. Actividad antioxidante de las plantas BURJ después de un mes aclimatadas en el invernadero. Las que estuvieron en presencia de coronatina en algún momento presentan un rendimiento menor.

5.2. Aclimatación de plantas tratadas con metil jasmonato 5, 15 y 25 µM

En las plantas que se aclimataron en invernadero observamos lo mismo que sucedía con el tratamiento anterior, ya que las plantas control tienen una capacidad antioxidante mayor que las que han pasado por algún tratamiento. Aun así, todos los tratamientos presentan unos niveles muy inferiores a los que presentaban en multiplicación y enraizamiento.

En la figura 20 podemos ver una bandeja de plantas aclimatadas de BURJ que estuvieron en MeJa. La mitad de los huecos vacíos pertenecen a plantas que no sobrevivieron al proceso de aclimatación debido a sus altos niveles de estrés, influenciado también por la pobre calidad de sus raíces. Aquí se puede apreciar la elevada mortalidad ocasionada por los tratamientos (no todos los huecos pertenecen a plantas muertas).



Figura 20. Plantas de *L. alpinum* aclimatadas en invernadero después de 8 semanas de cultivo. Se observa la elevada tasa de mortalidad en plantas tratadas con elicitores (en torno al 30%).

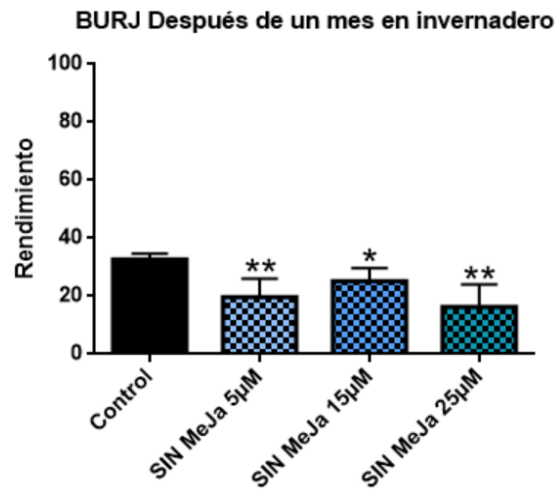


Figura 21. Actividad antioxidante de las plantas BURJ después de un mes aclimatadas en el invernadero. Las que estuvieron en metil jasmonato en algún momento presentan un rendimiento menor.

5.2.1. Plantas enraizadas que se pusieron en presencia del elicitor MeJa durante un mes y después se aclimataron en el invernadero

Quando se pasaron al invernadero las plantas BURJ que estuvieron con el elicitor MeJa disminuyeron un poco su actividad antioxidante. En el mismo experimento con la variedad MAM observamos que las plantas que estuvieron con el elicitor produjeron mayor cantidad de antioxidantes, aunque no vemos diferencias significativas de su comportamiento después de un mes de cultivo en el invernadero. Sí se observa que el rendimiento es mucho mayor que en los experimentos en que se multiplicó y enraizó con el elicitor (apartados 5.1 y 5.2).

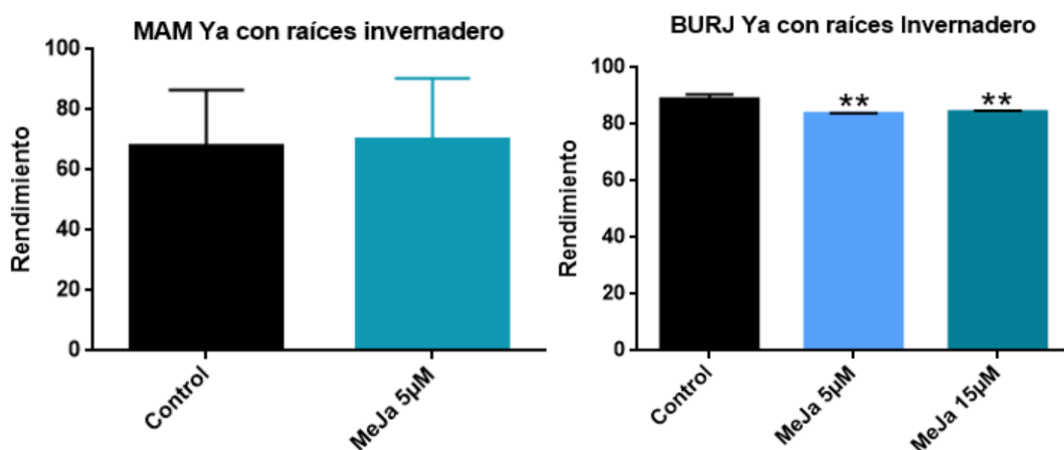


Figura 22. Actividad antioxidante de las plantas BURJ y MAM después de un mes aclimatadas en el invernadero. Las plantas fueron puestas en presencia del elicitor una vez ya estaban enraizadas. El rendimiento sigue siendo más elevado que en los otros ensayos de invernadero.

5.3. Aclimatación de plantas tratadas con nitrato de plata

Las plantas multiplicadas en nitrato de plata se pasaron directamente al invernadero, pues enraizaron en el medio de multiplicación con el elicitor. Tal y como sucedió en los demás ensayos, al pasar las plantas al invernadero perdieron gran parte de su actividad antioxidante. Aun así, se ve una disminución significativa en las plantas que fueron tratadas cuando se comparan con el control, tal como vemos en la figura 23.

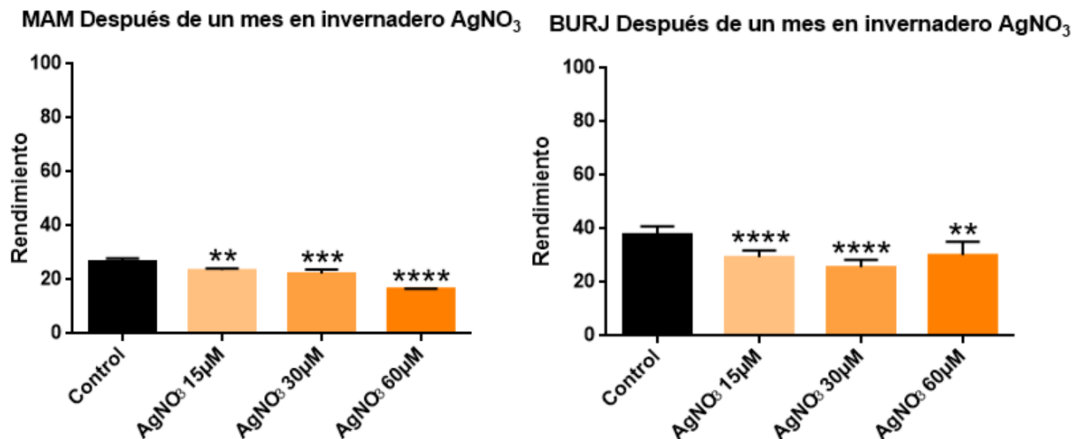


Figura 23. Actividad antioxidante de las plantas BURJ y MAM después de un mes de cultivo en invernadero. Las plantas fueron multiplicadas y enraizaron en el medio con nitrato de plata.

5.4. Ensayos de inducción de la floración en plantas micropropagadas de *L. alpinum* con o sin elicitores

La floración marca la transición del desarrollo vegetativo al reproductivo en las plantas. Ésta transición está regulada por un complejo circuito que integra múltiples señales ambientales (fotoperiodo, calidad y cantidad de luz, temperatura) y de desarrollo (edad de la planta, nivel de desarrollo o de distintos reguladores del crecimiento). Las plantas micropropagadas y cultivadas en el invernadero no desarrollan inflorescencias de forma natural, por lo que tendremos que tratarlas para poder realizar un ensayo de la actividad antioxidante de las flores.

El material aclimatado en el invernadero fue tratado con giberelinas para la inducción de la floración, con la posterior recogida de flores para el análisis de sus metabolitos. Concretamente se aplicó ácido giberélico (GA₃) mediante rociado de la roseta basal de hojas, y se hicieron 1, 2 ó 3 aplicaciones con una semana de diferencia entre ellas.

El tratamiento dio como resultado la inducción de la floración de las plantas, las cuales produjeron una media de 4 flores por planta en aquellas que habían sido tratadas con 3 aplicaciones. Con solo una aplicación desarrollaron inflorescencias a las 8 semanas, pero solo una flor cada dos plantas (0,5 flores/planta). Con dos aplicaciones también produjeron flores, a una media de 2 por planta, tal como se muestra en la tabla 1.

Nº de aplicaciones de GA ₃	1 aplicación	2 aplicaciones	3 aplicaciones
Nº de flores por planta	0,5 flores /planta	2 flores / planta	4 flores/planta

Tabla 1. Número de flores obtenidas con los tratamientos de GA₃.

5.4.1. Caracterización de las inflorescencias de las plantas micropropagadas

Las inflorescencias de las plantas micropropagadas difieren en sus caracteres morfológicos según el tratamiento realizado. Todas ellas mostraron en común una menor cobertura de pelos y menor altura del tallo floral en comparación con las plantas silvestres, además de que tendían a ser más estrechas y a tener menos brácteas en el involucre y un menor número de hojas en el tallo floral que las inflorescencias de plantas procedentes de semilla silvestre.



Figura 26. Inflorescencias de plantas micropropagadas tratadas con GA₃. A. Inflorescencia de planta obtenida a partir de semilla silvestre. B. Inflorescencia de planta micropropagada tratada con dos aplicaciones de GA₃. C. Inflorescencia de planta micropropagada tratada con dos aplicaciones de GA₃. D. Inflorescencia de planta micropropagada de un año de cultivo tratada con GA₃. Las barras indican 1cm. (Imagen tomada de Mondéjar, 2014).

Por tanto, se observaron cambios en la morfología de las flores según estuvieron tratadas una, dos o tres veces con GA₃, pues a más tratamientos presentaban más flores pero con una morfología alterada, con inflorescencias de menor altura, capítulos pequeños y brácteas del involucre deformadas y con escasa cobertura de pelos. Las hojas del tallo floral eran pequeñas y sinuosas y, en general, en la planta se apreció un incremento en la proliferación de brotes conformados por hojas de tamaño reducido. Cuantas menos aplicaciones de GA₃ se realizaban, las flores eran más similares al fenotipo silvestre. Después de la aparición de las primeras inflorescencias, las plantas siguieron floreciendo durante un periodo de dos semanas.

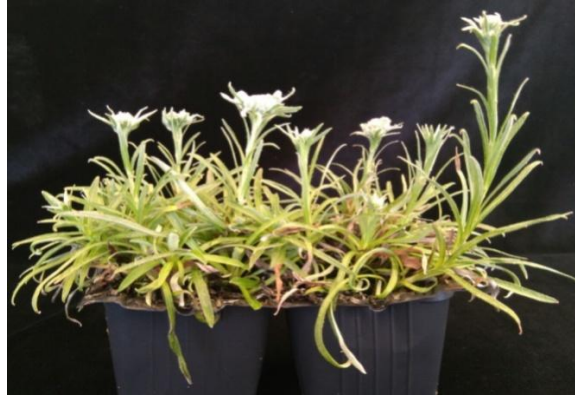


Figura 24. Plantas aclimatadas en invernadero y tratadas con GA₃ para la inducción de la floración. En la imagen se pueden ver las flores obtenidas por dos plantas a las 5 semanas del primer tratamiento. Estas plantas fueron sometidas a 3 aplicaciones de GA₃.

Este ensayo fue llevado a cabo previamente por Mondéjar (2014) en nuestro laboratorio, donde se comprobó que es posible inducir la transición floral en plantas de *L. alpinum* en condiciones no propicias mediante la aplicación exógena de giberelinas.

Posteriormente, las flores obtenidas fueron utilizadas para analizar su actividad antioxidante, las cuales llamaremos control 5S, pues estuvieron 5 semanas en el invernadero (figura 18). Todas las demás muestras de flores, las cuales tienen una menor actividad antioxidante, provienen de plantas que estuvieron solo 4 semanas en el invernadero. Tal como se observa en la figura 25, las flores de plantas que estuvieron más tiempo en el invernadero presentaron una mayor actividad antioxidante que las flores de aquellas que solo estuvieron 4 semanas, independientemente de si estuvieron en presencia de elicitor o no. De entre las flores de plantas que estuvieron 4 semanas en el invernadero, las de aquellas que estuvieron en algún momento en presencia de coronatina presentaban una mayor producción de antioxidantes en las flores que las flores provenientes de plantas de 4 semanas que no lo estuvieron (controles).

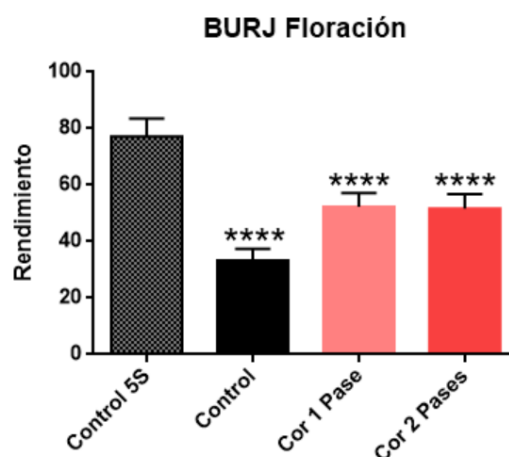


Figura 25. Actividad antioxidante de las flores de las plantas aclimatadas en el invernadero y sometidas al tratamiento de GA₃ con 3 repeticiones. Las flores de plantas que estuvieron 5 semanas en el invernadero presentan una mayor actividad antioxidante.

DISCUSIÓN

Las técnicas de micropropagación *in vitro* han demostrado una gran eficacia a la hora de contribuir a la conservación de especies vegetales amenazadas que resultan de interés desde un punto de vista tanto económico como ambiental. A través de las técnicas de micropropagación se puede producir una gran cantidad de plantas en un corto periodo de tiempo a partir del mínimo material vegetal de partida y en un óptimo estado sanitario. El uso final del material vegetal puede ser diverso, desde la reintroducción en la naturaleza, la comercialización de las plantas sin alterar las poblaciones naturales, o su utilización como fuente de material para investigación o para la extracción y purificación de moléculas de uso cosmético y/o farmacológico, tal como proponemos en este trabajo de fin de máster.

En los últimos 20 años se han desarrollado protocolos de micropropagación destinados a especies vegetales amenazadas o en peligro de extinción, pero muy pocos de ellos están destinados al aumento de la producción de metabolitos en dichas plantas. Es por ello que en este trabajo se han desarrollado distintos medios y técnicas de cultivo con el objetivo de incrementar la producción de metabolitos secundarios en *Leontopodium alpinum* (Edelweiss), una planta alpina actualmente protegida debido a su recolección indiscriminada y con interesantes propiedades medicinales y farmacológicas. Su micropropagación *in vitro* nos permitirá disponer de material vegetal para la extracción de sus principios bioactivos, sin limitaciones estacionales y a baja altitud. También hemos evaluado la posibilidad de introducir en los medios de cultivo *in vitro* determinados elicitores para intentar incrementar la producción de compuestos antioxidantes de interés para la industria farmacéutica y cosmética. Finalmente, hemos puesto a punto un protocolo para cuantificar la actividad antioxidante, tanto de material vegetal cultivado *in vitro*, como de rosetas y flores obtenidas después de la inducción floral en las plantas aclimatadas a condiciones de invernadero.

Los análisis fitoquímicos previos de las plantas de *L. alpinum* micropropagadas mostraron la presencia de compuestos fenólicos de interés, principalmente flavonoides pero también ácido clorogénico y ácido leontopódico. Estos metabolitos se encuentran en los tejidos de distintas partes de la inflorescencia pero también en la roseta de hojas durante el crecimiento vegetativo y en los brotes multiplicados mediante cultivo *in vitro*. La aplicación del protocolo de micropropagación de un material seleccionado por su perfil fitoquímico permitiría la producción de gran cantidad de material vegetal para la extracción de estos compuestos. También se ha descrito que existen diferencias en el contenido de metabolitos secundarios de interés según la altitud en que se desarrollan las plantas (Marcon *et al.*, 2006).

En los primeros ensayos observamos un incremento de la producción de antioxidantes en las plantas tratadas con los elicitores metil jasmonato y coronatina en la fase de multiplicación. Por tanto, decidimos profundizar en el estudio del efecto de la presencia de dichos elicitores en el medio de cultivo y la respuesta de las plantas cultivadas en ese medio.

En los ensayos de multiplicación de plantas de *L. alpinum* en coronatina y metil jasmonato, (Figuras 10 y 11) observamos que las plantas tratadas presentaban una actividad antioxidante mayor a la de los controles en los dos clones estudiados, presentando diferencias significativas en ambos clones. Los mejores resultados se observaron en los clones MAM en presencia de coronatina, pues alcanzaban casi un 100% de rendimiento en la reacción con DPPH. Sin embargo este resultado no resultó significativo, pues los controles también

presentaban una elevada actividad antioxidante. Las diferencias más significativas respecto al control se observaron en las plantas BURJ en presencia de coronatina y a altas concentraciones de metil jasmonato (15 y 25 μ M).

En cuanto al enraizamiento en presencia de coronatina solo disponemos de datos de las plantas BURJ (Figura 14). En estas plantas observamos que los controles se han mantenido en los mismos niveles de antioxidantes, mientras que las plantas tratadas han disminuido un poco su actividad respecto a sus niveles en la fase de multiplicación (Figura 11). Aun así todavía existen diferencias significativas entre los controles y las plantas que se han multiplicado y enraizado en coronatina, pues presentan una mayor actividad antioxidante.

Para el enraizamiento en metil jasmonato tampoco disponemos de datos del clon MAM, por lo que solo comentaremos los datos de BURJ. En este caso ocurre algo similar al caso anterior, pues las plantas tratadas presentaban una mayor actividad antioxidante que las plantas control. En este caso cabe destacar que todas las plantas mostraron una mayor actividad antioxidante que cuando estaban en multiplicación, e incluso los controles presentaban una mayor actividad antioxidante (Figura 15). Las plantas que se multiplicaron en presencia de MeJa y enraizaron tanto con o sin él, aumentaron su actividad antioxidante, presentando diferencias muy significativas respecto al control.

Cabe aclarar que en las tablas en que nos faltan datos es debido a que las plantas que se encontraban en presencia de determinados elicitores a menudo estaban en mal estado a causa de las elevadas dosis, haciendo imposible su multiplicación y posterior análisis. Es por ello también que las que sobrevivieron presentaban niveles tan altos de antioxidantes cuando se compararon con el control. Cuando las plantas se cultivaron en presencia del elicitore cuando ya tenían raíces (Figura 17) no se deterioraron tanto y sus niveles de antioxidantes no se vieron casi alterados, presentando unos niveles similares a los controles.

Una vez aclimatamos las plantas y las pasamos al invernadero, observamos que había una caída general de los niveles de antioxidantes en las plantas después de un mes de cultivo. Tanto los controles como las plantas que estuvieron en presencia de coronatina disminuyeron enormemente sus niveles de antioxidantes (Figura 19). Aquí se invierten los resultados y el control pasa a ser el que más antioxidantes produce, a pesar de haber perdido casi la mitad del rendimiento respecto a los controles en multiplicación. Esto sucede también con plantas tratadas con metil jasmonato y sus controles (Figura 21), cayendo enormemente el rendimiento general, siendo menor el de las plantas tratadas. La mayor diferencia la observamos en las plantas que se pusieron en contacto con el metil jasmonato cuando ya tenían raíces (Figura 22), pues en este caso al pasar las plantas al invernadero mantienen los niveles elevados de antioxidantes que presentaban *in vitro*. A pesar de mantenerse elevados, los controles siguen siendo los que presentan un rendimiento significativamente mayor (en plantas BURJ).

En la bibliografía se describe que el tejido con más compuestos con actividad antioxidante es la inflorescencia. Sin embargo, nuestros resultados muestran una cierta diferencia. Cuando se analizaron flores de plantas que estuvieron 5 semanas en cultivo antes de proceder a la inducción de la floración, se observa que presentan niveles muy superiores a las flores de plantas tratada *in vitro* con elicitores, o a flores de plantas de menor edad (Figura

25). Esto resulta contradictorio, si bien no hemos estudiado el efecto de la edad de la planta en su producción de antioxidantes.

Hemos podido observar que las flores de plantas tratadas con coronatina tienen una capacidad antioxidante mayor a la de las flores de plantas control de la misma edad, y además las flores presentan niveles de antioxidantes superiores a las hojas de las plantas tratadas con los mismos tratamientos (Figura 19), mientras que los controles de 5 semanas presentan una actividad similar en las flores y en las hojas.

En cuanto a la multiplicación de ambos clones en nitrato de plata (Figura 12), observamos que los controles son los que presentan una actividad antioxidante mayor, aunque las diferencias son significativas a bajas y altas concentraciones (15 y 60 μM) pero no intermedias (30 μM). Cuando observábamos las plantas *in vitro*, pudimos ver que las que estaban multiplicando en presencia del elicitor presentaban un aspecto incluso mejor que el control debido a la actividad antibacteriana del elicitor. Este hecho podría ser el responsable de que las plantas tratadas crecieran incluso con menos estrés que los controles. En cambio, en las plantas que se multiplicaron en presencia de altas concentraciones de sacarosa (Figura 13) sí que observamos que las plantas tratadas presentaban un incremento muy significativo en la cantidad de antioxidantes respecto a los controles de ambos clones. En este caso también se deberían tener en cuenta factores como el estrés ocasionado por las bacterias, las cuales ven favorecido su crecimiento en altas concentraciones de sacarosa.

Las plantas tratadas con nitrato de plata enraizaron en el medio de multiplicación, por lo que se pasaron directamente al invernadero y no pasaron por la fase de enraizamiento. En cuanto a las plantas tratadas con sacarosa, no se consiguió multiplicarlas y no obtuvimos material suficiente para continuar los ensayos. Tal como ocurría en las plantas tratadas con coronatina y metil jasmonato, observamos que las que estuvieron en presencia de nitrato de plata también disminuyeron enormemente su actividad antioxidante después de pasar 4 semanas en el invernadero (Figura 23). A pesar de esta disminución general, los controles siguen siendo los que más actividad presentan, al igual que sucedía con los casos anteriores.

CONCLUSIONES

De los resultados de este Trabajo de fin de máster se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Las plantas de *Leontopodium alpinum* cultivadas *in vitro* son capaces de responder a los elicitores que se añaden al medio de cultivo, incrementando su producción de antioxidantes cuando se comparan con las plantas control.
2. El clon denominado MAM del pirineo aragonés es el que presenta una mayor producción de antioxidantes *in vitro* de forma natural.
3. El elicitador al que mejor responden las plantas es la coronatina, ya que incrementa su actividad antioxidante y les permite sobrevivir, presentando un mejor aspecto general que cuando son tratadas con cualquiera de los otros elicitores.
4. Cuando las plantas cultivadas *in vitro* se aclimatan en el invernadero, disminuyen enormemente su producción de antioxidantes, hayan estado en contacto o no con elicitores.
5. Las flores inducidas con GA₃ en plantas adultas cultivadas en el invernadero producen una cantidad de antioxidantes mayor que las flores de plantas jóvenes.

Por tanto, si el objetivo es incrementar la producción de antioxidantes, se puede concluir que la mejor opción sería la de cultivar clones MAM *in vitro* en presencia de coronatina, sin pasarlas al invernadero en ningún momento. La otra alternativa sería la de inducir la floración de plantas adultas aclimatadas en el invernadero y obtener los antioxidantes a partir de las flores.

PERSPECTIVAS FUTURAS

La producción de metabolitos secundarios depende en gran medida del estado fisiológico y de desarrollo de la planta, y en muchos casos esta producción puede verse incrementada mediante la aplicación de elicitores, factores físicos o químicos que introducidos en los cultivos pueden inducir o favorecer la biosíntesis de compuestos específicos (Namdeo, 2007). En el caso de los compuestos fenólicos, se ha comprobado que la aplicación de tratamientos con luz ultravioleta de onda corta incrementan la concentración fenólica en uva de mesa, limón y mango (Cantos *et al.*, 2000; Ben-Yehoshua *et al.*, 1992; González-Aguilar *et al.*, 2007), además de en otro tipo de plantas de interés medicinal (Ghorpade *et al.*, 2011). Es por esto que hemos seguido esta línea de trabajo y hemos incorporado elicitores a los medios de cultivo *in vitro* de *L. alpinum*, con el objetivo de incrementar los niveles de compuestos fenólicos en las plantas micropropagadas. Con estos referentes, se podría seguir una línea de trabajo con *L. alpinum* para el estudio del efecto de tratamientos con luz UV-C sobre los niveles de compuestos fenólicos en plantas micropropagadas. Al estar en condiciones más similares a las de su hábitat natural, la alta montaña con elevada radiación UV, facilitaríamos la producción de estos metabolitos que la planta usa para sobrevivir en condiciones extremas.

Basándonos en los resultados obtenidos en este TFM, podríamos aplicar elicitores a plantas adultas de invernadero para analizar si esta inducción tiene algún efecto significativo en la producción de antioxidantes en flores de planta adulta, ya que no se ha ensayado la aplicación de elicitores a plantas adultas en floración y esta aproximación podría aportar resultados interesantes. También sería interesante el estudio del papel del GA₃ en la producción de antioxidantes en las plantas adultas en floración, además del estudio de la producción de antioxidantes en plantas cultivadas a elevada altitud.

Para que los métodos de micropropagación tengan aplicación en la producción industrial de metabolitos o en la producción de planta ornamental de forma rentable, es necesario que éstos puedan producirse a gran escala y de manera estable. Por ello, el uso de biorreactores se ha convertido en una buena opción para la producción comercial de plantas (Rout *et al.*, 2006), ya que cuenta con ventajas como la automatización, el ahorro en costes de producción, la reducción de la mano de obra y puede presentar importantes incrementos en la producción (Takayama y Akita, 2006). En el caso de *L. alpinum*, se podría implantar la utilización de biorreactores de inmersión temporal (TIB, *Temporary Immersion Bioreactors*) donde el medio de cultivo líquido es aplicado a intervalos al material vegetal, que se localiza en un compartimento separado. El uso de este sistema permitiría la producción masiva de plantas de *L. alpinum* para facilitar la extracción de productos bioactivos (Figura 26).

Otra alternativa sería la del uso de biorreactores con células en suspensión de *L. alpinum* a los que se añadiría un medio de cultivo con alguno de los elicitores ensayados, especialmente coronatina que es el más permisivo con la supervivencia de las plantas. Esto nos permitiría que el cultivo celular produjera los compuestos fenólicos de interés y los depositara en el medio extracelular, pudiendo así aislar los compuestos de interés que se encuentran en el medio de cultivo sin tener que destruir el material vegetal. Además esta sería una alternativa mucho más rentable que la de tener un cultivo de plantas de *L. alpinum*.



Figura 26. Ejemplo de cultivo en inmersión temporal.

Sería interesante que ambos métodos se realizaran después de un estudio previo de todas las variedades existentes de *L. alpinum*, midiendo los compuestos fenólicos que son capaces de producir *in planta* sin ningún tipo de tratamiento y ver si estos se mantienen después del cultivo, ya sea *in vitro* o en el biorreactor. Así nos aseguraríamos de partir del material de mejor calidad que nos permitiría una producción mucho más rentable.

También sería recomendable completar el ensayo con un análisis minucioso de los compuestos producidos por los diferentes tipos de *L. alpinum* mediante su análisis espectrométrico. Así nos aseguraríamos de que el ácido leontopódico y los compuestos de más interés de la planta están presentes y en grandes cantidades según el tratamiento que les hayamos aplicado, pues con el DPPH solo medimos la actividad antioxidante general, no la cantidad de ácido leontopódico en concreto. Así podríamos afinar más el protocolo de inducción de producción de los compuestos de más interés producidos por *L. alpinum*, además de saber en qué tejido concreto presentan una mayor producción.

REFERENCIAS

Amasino, R.M. y Michaels, S.D. (2010). The timing of flowering. *Plant Physiology*. **154**(2), 516-520.

ANTHOS. (2012). Sistema de información de las plantas de España. Real Jardín Botánico, CSIC-Fundación Biodiversidad. [<http://www.anthos.es>]

Ben-Yehoshua, S. (1992). Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **40**(7), 1217-1221.

Blösch, C., Dickoré, W.B., Samuel, R. y Stuessy, T.F. (2010). Molecular phylogeny of the edelweiss (*Leontopodium*, Asteraceae: Gnaphalieae). *Edinburgh Journal of Botany*. **67**, 235-264.

Cantos, E., García-Viguera, C., De Pascual-Teresa, S. y Tomás-Barberán, F.A. (2000). Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of Cv.Napoleon table grapes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **48**, 4606-4612.

Carpita, N., y McCann, M. (2000). The cell wall. En: *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. Buchanan, B.B, Gruissem, W. y Jones, R. eds. (USA, American Society of Plant Physiologists). 52-108.

Carron, C.A., Rey, C., Previdoli, S. y Baroffio, C. (2007). Helvetia, a new hybrid clones Edelweiss cultivar. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture*. **39**, 125-130.

Catálogo de Especies Amenazadas de Aragón. (2008) Zaragoza: Gobierno de Aragón. Departamento de Medio Ambiente. http://www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/MedioAmbiente/Documentos/Areas/Biodiversidad/CatEspAme/FLORA_INTERES_1.pdf

Cormier, F., Crevier, H.A., Do, C.B. (1990). Effects of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension. *Canadian Journal of Botany*, **68**(8), 1822-1825.

Costa, S., Schwaiger, S., Cervellati, R., Stuppner, H., Speroni, E. y Guerra, M.C. (2009). *In vitro* evaluation of the chemoprotective action mechanisms of leontopodic acid against aflatoxin B1 and deoxynivalenol-induced cell damage. *Journal of Applied Toxicology*. **29**(1), 7-14.

Cvjetko, P., Milosic, A., Domijan, A.M., Vrcek, I.V., Tolic, S., Stefanic, P.P., Letofsky-Papst, I., Tkalec, M., Balen, B. (2017). Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **137**, 18-28.

Dal Toso, R. y Melandri, F. (2010). Plant cell culture technology: a new ingredient source. *Personal Care Asia Pacific*, 35-38.

Deng, J., Cheng, W., Yang, G. (2010). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*. **125**, 1430-1435.

Dobner, M.J., Sosa, S., Schwaiger, S., Altnier, G., Della Loggia, R., Kaneider, N.C. y Stuppner, H. (2004). Anti-inflammatory activity of *Leontopodium alpinum* and its constituents. *Planta Medica*. **70**, 502-508.

Duwensee, K., Schwaiger, S., Tancevski, I., Eller, K., Van Eck, M., Markt, P., Linder, T., Stanzi, U., Ritsch, A., Patsch, J.R., Schuster, D., Stuppner, H., Bernhard, D. y Eller, P. (2011). Leoligin, the major lignin from Edelweis, activates cholesteryl ester transfer protein. *Atherosclerosis*. **219**(1), 109-115.

Dweck, A.C. (2004). A review of edelweiss. *SÖFT-Journal*. **130**, 65-68.

Falchi, M., Bertelli, A., Scalzo, L.R., Morassut, M., Morelli, R., Das, S., Cui, J, Das, D.K. (2006) Comparison of cardioprotective abilities between the flesh and skin of grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**, 6613-6622.

Figuroa Pérez, M.G., Rocha-Guzmán, N.E., Mercado-Silva, E., Loarca-Piña, G., Reynoso-Camacho, R. (2014) Effect of chemical elicitors on peppermint (*Menta piperita*) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusions. *Food Chemistry*. **156**, 273-278.

Fornara, F., de Montaigu, A. y Coupland, G. (2010). Snapshot: Control of flowering in Arabidopsis. *Cell*. **141**, 550 e1-2.

Fowler, M.W. (1987). Products from plant cells. En: Basic Biotechnology. Bullock, J., Kristiansen, B., eds. (London, Academic Press). 525-544.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. **50**(1), 151-158

García Casanova, J., Rodríguez Luego, J.L. y Rodríguez Piñero, C. (2001). Especies amenazadas. En: Naturaleza de las Islas Canarias. Ecología y Conservación. Fernández-Palacios, J.M. y Martín-Esquivel, J.L., eds. (SantaCruz de Tenerife, Turquesa). 167-172.

George, E.F., de Klerk, G.J. (2008). Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. In: Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Edition, Vol. 1. The Background. George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G-J, eds. (Dordrecht, Springer-Verlag). 205-226.

Ghorpade, R.P., Chopra, A. y Nikam, T.D. (2011). Influence of biotic and abiotic elicitors on four major isomers of boswellic acid in callus cultura of *Boswellia serrata* Roxb. *Plant Omics Journal*. **4**(4), 169-176.

González-Aguilar, G.A., Villegas-Ochoa, M.A., Martínez-Téllez, M.A., Gardea, A.A. y Ayala-Zavala, J.F. (2007). Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. *Journal of food sciences*. **72**(3), S197-S202.

Gottfried, M., Pauli, H., Futschik, A., Akhalkatsi, M., Barančok, P., Benito-Alonso, J.L., Coldea, G., Dick, J., Erschbamer, B., Fernández-Calzado, M.R., Kazakis, G., Krajčí, J., Larsson, P., Mallaun, M., Michelsen, O., Moiseev, D., Moiseev, P., Molau, U., Merzouki, A., Nagy, L.,

Nakhutsrishvili, G., Pedersen, B., Pelino, G., Puscas, M., Rossi, G., Stanisci, A., Theurillat, J.P., Tomaselli, M., Villar, L., Vittoz, P., Vogiatzakis, I., y Grabherr, G. (2012). Continent-wide response of mountain vegetation to climate change. *Nature Climate Change*. **2**, 111-115

Haider, G., Von Schrader, T., Fublein, M., Blechert, S., Kutchan, T.M. (2005) Structure-Activity Relationships of Synthetic Analogs of Jasmonic Acid and Coronatine on Induction of Benzophenanthridine Alkaloid Accumulation in *Eschscholzia californica* Cell Cultures. *Biological Chemistry*. **381**(8), 741-748.

Hansen, U., Thünemann, A.F. (2015). Considerations using silver nitrate as a reference for *in vitro* tests with silver nanoparticles. *Toxicology in Vitro*. **34**, 120-122.

Hewitt, E.J. (1966). Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition. *Technical Communication* No. **22**. Commonwealth Agricultural Bureaux, London.

Hook, I.L.I. (1993) *Leontopodium alpinum* Cass (Edelweiss); *in vitro* culture, micropropagation, and the production of secondary metabolites. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 21. Medicinal and Aromatic Plants IV. Bajaj, Y.P.S. ed. (Heidelberg, Springer-Verlag), 217-232.

Hornick, A., Schwaiger, S., Rollinger, J.M., Vo, N.P., Pras, H. y Stupner, H. (2008). Extracts and constituents of *Leontopodium alpinum* enhance cholinergic transmission: brain Ach increasing and memory improving properties. *Biochemical Pharmacology*. **76**(2), 236-248.

Katsir, L., Chung, H.S., Koo, A.J.K., Howe, G.A. (2008) Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Current Opinion in Plant Biology*. **11**(4), 428-435.

Lloyd, G. y McCown, B. (1980). Commercial feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip cultura. *International Plant Propagation Society Proceedings*. **30**, 421-427.

Lulli, D., Potapovich, A., Riccardo, M., Dellambra, E., Pressi, G., Kostyuk, V., Dal Toso, R., De Luca, C., Pastore, S. y Korkina L. (2012) Anti-inflammatory Effects of concentrated Ethanol Extracts of Edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) Callus cultures towards Human Keratinocytes and Endothelial Cells. *Mediators of inflammation*. Doi: 10.1155/2012/498373

Maene, L.J. y Debergh, P.C. (1986) Optimization of plant micropropagation. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*. **51**(4), 1479-1488.

Manivannan, A., Soundararajan, P., Park, Y.G., Jeong, B.R. (2016) Chemical elicitor-induced modulation of antioxidant metabolism and enhancement of secondary metabolite accumulation in cell suspension cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch. *International Journal of Molecular Sciences*. **17**(3), 399.

Marcon, N., Kühn, Y., Quennoz, M., Schwaiger, S., Stuppner, H., Simonnet, X., Grogg, A.F y Frey, U. (2006). Incidence under real conditions of altitude on the development and properties of *Leontopodium Alpinum* Cass. En: 4th International Conference on natural products: "Natural Products: a chance for the future of mankind" (Leysin, Suiza, 28-31 de mayo de 2006). Libro de actas. P-075.

- Mithöfer, A., Schulze, B., Boland, W.** (2004) Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters*. **566**(1-3), 1-5
- Mondéjar Canet, R.J.** (2014) Micropropagación de *Leontopodium alpinum* Cass. (Edelweiss) e inducción de la floración en condiciones de invernadero. *Editorial Universitat Politècnica de València*. Tesis Doctoral.
- Murashige, T. y Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. **15**(3), 473-497.
- Mutasa-Göttgens, E. y Hedden, P.** (2009). Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*. **60**(7), 1979-1989.
- Namdeo, A.G.** (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy reviews*. **1**(1), 69-79.
- Onrubia, M., Moyano, E., Bonfill, M., Cusidó, R.M., Goossens, A., Palazón, J.** (2013) Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology*. **170**(2), 211-219.
- Pace, L.G., Bruno, A.A. y Spanò, L.** (2009). *In vitro* plant regeneration and clonal micropropagation of *Leontopodium nivale* (Ten.) Heut ex Hand-Mazz. (Asteraceae). *Plant Biosystems*. **143**(1), 12-16.
- Park, J.I., Shim, S.Y., Kim, J.H., Lee, B.C. y Moon, H.K.** (1987) *In vitro* rapid propagation of edelweiss *Leontopodium coreanum*. *Res Rep Inst Genet*. **0**(22), 128-131.
- Park, K.Y., Lee, S.H., Min, B.K. Lee, K.S., Choi, J.S., Chung, S.R. Min, K.R. y Kim, Y.** (1999). Inhibitory effect of luteolin 4'-O-glucoside from *Kummerowia striata* and other flavonoids on interleukin-5 bioactivity. *Planta medica*. **65**(5), 457-459.
- Pierik, R.L.M.** (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores, 3rd edn. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 326.
- Prevedello, M., Vertuani, S., Besco, E., Ziosic, P. y Manfredinic, S.** (2004). Estratto di *Leontopodium alpinum* Cass.: capacità antiossidante di formulazioni cosmetiche. *L'Erborista*. Mayo 2004, 78-81.
- Quorin, M. y Lepoivre, P.** (1977). Etude de milieu adaptes aux cultures *in vitro* de Prunus. *Acta Horticulturæ*. **78**, 437-442.
- Reisinger, U., Schwaiger, S., Zeller, I., Messner, B., Stigler, R., Wiedemann, D., Mayr, T., Seger, C., Schachner, T., Dirsch, V.M., Vollmar, A.M., Bonatti, J.O., Stuppner, H., Laufer, G. y Bernhard, D.** (2009). Leoligin, the major lignin from Edelweiss, inhibits intimal hyperplasia of venous bypass grafts. *Cardiovascular Research*. **82**, 542-549.
- Rice-Evans, C.A. y Miller N.M.** (1994) Total antioxidant status In plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*. **234**, 279-29.

- Rout, G.R., Mohapatra, A. y Jain, S.M.** (2006). Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*. **24**(6), 531-560.
- Safer, S., Tremetsberg, K., Guo, Y.P., Kohl, G., Samuel, M.R., Stuessy, T.F. y Stuppner, H.** (2011). Phylogenetic relationships in the genus *Leontopodium* (Asteraceae: Gnaphalieae) based on AFLP data. *Botanical Journal of Linnean Society*. **165** (4), 364-377.
- Scalbert, A.** (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. **30**, 3875-3883.
- Scheidegger, T.** (2011). Edelweiss: la naissance d'un mythe. En: *Colloque 2011-Anne de l'edelweiss*. (Orsières, Valais. 15-16 de julio de 2011).
- Schwaiger, S., Adams, M., Seger, C., Ellmerer, E.P., Bauer, R. y Stuppner, H.** (2004). New constituents of *Leontopodium alpinum* and their *in vitro* leukotriene biosynthesis inhibitory activity. *Planta Medica*. **70**(10), 978-985.
- Schwaiger, S., Seger, C., Weisbauer, B., Schneider, P., Ellmerer, E.P., Sturm, S. y Stuppner, H.** (2006). Development of an HPLC-PAD-MS assay for the identification and quantification of major phenolic edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) constituents. *Phytochemical Analysis*. **17**(5), 291-298.
- Sharma, O.P. y Bhat, T.K.** (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*. **113**, 1202-1205.
- Speroni, E., Schwaiger, S., Egger, P., Berger, A.T., Cervellati, R., Govoni, P., Guerra, M.C. y Stuppner, H.** (2006). In vivo efficacy of different extracts of edelweiss (*Leontopodium alpinum* Cass.) in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*. **105**(3), 421-426.
- Srivastava, S., Conlan, X.A., Cahill, D.M., Adholeya, A.** (2016) *Rizhophagus irregularis* as an elicitor of rosmarinic acid and antioxidant production by transformed roots of *Ocimum basilicum* in an *in vitro* co-culture system. *Mycorrhiza*. **26**, 919-930.
- Takayama, S. y Akita, M.** (2006). Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. En: *Plant Tissue Culture Engineering*. Gupta, S.D. e Ibaraki, Y. eds. (Amsterdam, Springer). Vol.6, 83-100.
- Tamogami, S. y Kodama, O.** (2000) Coronatine elicits phytoalexin production in rice leaves (*Oryza sativa* L.) in the same manner as jasmonic acid. *Phytochemistry*. **54**, 689-694.
- Uppalapati, S.R., Ayoubi, P., Weng, H., Palmer, D.A., Mitchell, R.E., Jones, W. y Bender, C.L.** (2005) The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato. *The Plant Journal*. **42**, 201-217.
- Van Huylenbroeck, J.M. y Debergh, P.C.** (1996) Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during ex vitro acclimatization of Spathiphyllum plantlets. *Physiologia Plantarum*. **96**(2), 298-304.
- Won Suh, H., Hyun, S.H., Kim, S.H., Lee, S.Y., Choi, H.K.** (2013) Metabolomic profiling and enhanced production of phytosterols by elicitation with methyl jasmonate and silver nitrate in whole plant cultures of *Lemna paucicostata*. *Process Biochemistry*. **48**, 1581-1586.

Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C.L., Schaller, A., He, S.Y., Howe, G.A. (2003) Virulence systems of *Pseudomonas syingae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *The Plant Journal*. **36**(4), 485-499.



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

