



TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN
BIOTECNOLOGÍA

Optimización del crecimiento vegetal y
biosíntesis de terpenos en *Satureja
intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.
Morales, G. López & Sánchez-Gómez
mediante cultivo *in vitro*

Alumno: Isabel Soto Ros

Tutor: Jorge Juan Vicedo

Curso: 2022/2023



Isabel Soto Ros

Índice de Figuras

Figura 1. Morfología de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez. a) hábito; b) hoja; c) detalle del margen de la hoja; d) porción de tallo con nudo y fascículo de hojas; e) verticilo de la inflorescencia; f) cáliz abierto ventralmente con gineceo; g) corola abierta ventralmente; h) cáliz en la fructificación, vista lateral; i) núcula, vista ventral; j) núcula, vista dorsal; k) núcula, sección transversal. Fuente: López González, G. 1980.

Figura 2. Etapas del proceso de micropropagación en cultivo in vitro vegetal. Elaborado por Isabel Soto Ros.

Figura 3. Técnica de cultivo in vitro en doble fase de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez donde se aprecia la fase semisólida (inferior) y la fase líquida (superior). Elaborado por Isabel Soto Ros.

Figura 4. Tres de los tratamientos realizados con 3 réplicas cada uno de la técnica de cultivo en medio líquido agitado en agitador orbital de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez. Elaborado por Isabel Soto Ros.

Figura 5. Resultados del desarrollo vegetal en la técnica de cultivo *in vitro* de doble fase. La imagen A) muestra la planta silvestre de donde se partió para la introducción del material e inicio del cultivo in vitro; la imagen B) muestra la plántula stock de donde se obtuvieron los clones para el inicio de los experimentos; las siguientes imágenes muestran los explantes obtenidos tras 30 días de cultivo *in vitro* de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez en diferentes tratamientos, más específicamente, la imagen C) muestra un ejemplo del control; la imagen D) muestra un ejemplo del tratamiento sin CA y 45 g/l de sacarosa; la imagen E) tratamiento sin CA y 60 g/l de sacarosa; la imagen F) tratamiento sin CA y 30 g/l de sacarosa; la imagen G) tratamiento con 3 g/l de CA y 45 g/l de sacarosa; la imagen H) tratamiento con 9 g/l de CA y 30 g/l de sacarosa; y la imagen I) tratamiento con 9 g/l de CA y 0 g/l de sacarosa.

Figura 6. Diferencias en la variable elongación del explante de los diferentes tratamientos en el cultivo *in vitro* en doble fase de *S. intricata* Lange var. *gracilis* a diferentes concentraciones de CA y sacarosa tras 30 días de cultivo. Las estrellas representan el nivel de significancia frente a los diferentes tratamientos ($\alpha = 0.05$).

Figura 7. Diferencias en la variable número de nodos desarrollados de los diferentes tratamientos en el cultivo *in vitro* en doble fase de *S. intricata* Lange var. *gracilis* a diferentes concentraciones de CA y sacarosa tras 30 días de cultivo. Las estrellas representan el nivel de significancia frente a los diferentes tratamientos ($\alpha = 0.05$).

Figura 8. Diferencias en la variable número de tallos desarrollados de los diferentes tratamientos en el cultivo *in vitro* en doble fase de *S. intricata* Lange var. *gracilis* a diferentes concentraciones de CA y sacarosa tras 30 días de cultivo. Las estrellas representan el nivel de significancia frente a los diferentes tratamientos ($\alpha = 0.05$).

Figura 9. Diferencias en la variable tasa de multiplicación de los diferentes tratamientos en el cultivo *in vitro* en doble fase de *S. intricata* Lange var. *gracilis* a diferentes concentraciones de CA y sacarosa tras 30 días de cultivo. Las estrellas representan el nivel de significancia frente a los diferentes tratamientos ($\alpha = 0.05$).

Figura 10. Resultados de los explantes cultivados durante 30 días *in vitro* de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez en un medio de cultivo líquido agitado a 125 rpm a diferentes concentraciones y composición de PGRs, además de medio basal compuesto por MS y sacarosa. La imagen A) muestra un explante del medio compuesto por 2 μM de GA3 y 4,44 μM de BAP; la imagen B) muestra un explante del medio compuesto por 4 μM de m-TOP y 4,44 μM de BAP; la imagen c) muestra un explante del medio compuesto por 4,44 μM de BAP y 1 μM de m-TOP; la imagen D) muestra un explante del medio control, sin PGRs; la imagen E) muestra un explante del medio compuesto por 4,44 μM de m-TOP; y la imagen F) muestra un explante del medio compuesto por 4,44 μM de BAP.

Índice de Tablas

Tabla 1. Tratamientos llevados a cabo para el proceso de multiplicación. Se muestran las concentraciones establecidas a las que se preparó el medio de la fase líquida para cada tratamiento en el que se subcultivaron explantes de 1 cm durante 30 días.

Tabla 2. Tratamientos llevados a cabo para el proceso de multiplicación. Se muestran las concentraciones establecidas a las que se preparó el medio líquido para cada tratamiento en el que se subcultivaron explantes de 1 cm durante 30 días. De cada tratamiento se realizaron 3 réplicas, cada una de ellas con 8 explantes por matraz.

Tabla 3. Efecto de 5 concentraciones de sacarosa y 4 concentraciones de carbón activo en el desarrollo vegetal durante la multiplicación de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez. Los valores que se muestran dentro de una misma columna representan la media \pm el error estándar, seguido de una letra que representa el nivel de significancia frente a los diferentes tratamientos ($\alpha = 0,05$). Los valores recogidos para cada tratamiento se tomaron tras 30 días en medio compuesto por un medio semisólido (MS, agar y sacarosa) y un medio líquido (1/2 sales Knop, CA y sacarosa).

Tabla 4. Efecto de 6 tratamientos con diferentes concentraciones y combinaciones de PGRs en el desarrollo vegetal durante la multiplicación de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez. Los valores que se muestran dentro de una misma columna representan la media \pm el error estándar, seguido de una letra que representa el nivel de significancia frente a los diferentes tratamientos ($\alpha = 0,05$). Los valores recogidos para cada tratamiento se tomaron tras 30 días de un cultivo de medio líquido agitado en agitador orbital a 125 rpm.

Tabla 5. Porcentaje (área pico, PA) de los volátiles detectados *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez del control y las muestras compuestas por 0 g/l de CA y concentraciones crecientes de sacarosa. TR, tiempo de retención; ND, compuesto no detectado. Muestras analizadas por HS-SPME-GC/MS.

Tabla 6. Porcentaje (área pico, PA) de los volátiles detectados en *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez del

control y las muestras compuestas por 3 g/l de CA y concentraciones crecientes de sacarosa. TR, tiempo de retención; ND, compuesto no detectado. Muestras analizadas por HS-SPME-GC/MS.

Tabla 7. Porcentaje (área pico, PA) de los volátiles detectados en *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez del control y las muestras compuestas por 6 g/l de CA y concentraciones crecientes de sacarosa. TR, tiempo de retención; ND, compuesto no detectado. Muestras analizadas por HS-SPME-GC/MS.

Tabla 8. Porcentaje (área pico, PA) de los volátiles detectados en *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez del control y las muestras compuestas por 9 g/l de CA y concentraciones crecientes de sacarosa. TR, tiempo de retención; ND, compuesto no detectado. Muestras analizadas por HS-SPME-GC/MS.

Tabla 9. Contenido ($\mu\text{g/g}$) en terpenos de los extractos metanólicos de las plantas obtenidas del control y de los tratamientos de cultivo *in vitro* de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez en doble fase correspondientes a 0 g/l de CA y concentraciones crecientes de sacarosa, analizados por SPME-GC/MS. Los datos se presentan como medias \pm SD. TR, tiempo de retención. LQ, límite de cuantificación.

Tabla 10. Contenido ($\mu\text{g/g}$) en terpenos de los extractos metanólicos de las plantas obtenidas del control y de los tratamientos de cultivo *in vitro* de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez en doble fase correspondientes a 3 g/l de CA y concentraciones crecientes de sacarosa, analizados por SPME-GC/MS. Los datos se presentan como medias \pm SD. TR, tiempo de retención. LQ, límite de cuantificación.

Tabla 11. Contenido ($\mu\text{g/g}$) en terpenos de los extractos metanólicos de las plantas obtenidas del control y de los tratamientos de cultivo *in vitro* de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez en doble fase correspondientes a 6 g/l de CA y concentraciones crecientes de sacarosa, analizados por SPME-GC/MS. Los datos se presentan como medias \pm SD. TR, tiempo de retención. LQ, límite de cuantificación.

Tabla 12. Contenido ($\mu\text{g/g}$) en terpenos de los extractos metanólicos de las plantas obtenidas del control y de los tratamientos de cultivo *in vitro* de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez en doble

Isabel Soto Ros

fase correspondientes a 3 g/l de CA y concentraciones crecientes de sacarosa, analizados por SPME-GC/MS. Los datos se presentan como medias \pm SD. TR, tiempo de retención. LQ, límite de cuantificación.

Listado de Abreviaturas

(PGR): Regulador del crecimiento de las plantas

(BAP): Bencilaminopurina

(mT): Meta-topolina

(HCl): Ácido clorhídrico

(NaOH): Hidróxido de sodio

(MS): Medio Murashige & Skoog

(LSD): Diferencia Menos Significativa

(KIN): Kinetina

(TDZ): Thidiazurón

(NAA): Ácido α -naftalenacético

(IAA): Ácido indol-3-acético

(IBA): Ácido indol-butírico

(2,4-D): Ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético

(ZEA): Zeatina

(PIC): Picloram

(GA3): Giberelina

(CA): Carbón vegetal activo

(GC/MS): Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas

(SPME): Micro - Extracción de Fase Sólida

(HS): Headspace

(%PA): Porcentaje de área del pico

Resumen

Se pretende estudiar el efecto de dos sistemas de cultivo *in vitro* (doble fase y medio líquido agitado) en plantas de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez con el objetivo de estudiar su efecto en el desarrollo vegetal, así como el impacto que pudieran tener en la biosíntesis de metabolitos secundarios (terpenos) de interés por las actividades biológicas descritas. Para ello, se trataron las plántulas iniciadas *in vitro* con diferentes concentraciones de carbón activo y sacarosa (cultivo en doble fase), y con los reguladores del crecimiento mT, BAP y GA3 (medio líquido agitado) durante 4 semanas. Tras este periodo, se midieron diversos parámetros del desarrollo vegetal (elongación, número de nodos y tallos desarrollados y tasa de multiplicación). Posteriormente, el material vegetal fue secado, y analizado mediante dos técnicas basadas en cromatografía de gases: HS-SPME-GC/MS, y SPME-GC/MS.

Los resultados muestran que el sistema de cultivo *in vitro* en doble fase proporcionó buenos resultados de crecimiento y desarrollo vegetal, destacando los tratamientos con 3 g/l de CA y 45 g/l de sacarosa, 0 g/l de CA y 45 g/l de sacarosa, y 0 g/l de CA y 60 g/l de sacarosa. En estos, se obtuvo valores significativamente mayores en los parámetros anteriormente mencionados. Sin embargo, el cultivo en medio líquido no resultó un buen método para los objetivos deseados debido a una alta tasa de contaminación y alteraciones fisiológicas (hiperhidratación).

Los análisis químicos realizados muestran que los compuestos más abundantes son carvacrol, beta-cariofileno, gamma-terpineno y linalool en todos los tratamientos.

En conclusión, el cultivo en doble fase proporcionó buenos resultados en términos de crecimiento vegetal *in vitro*, y estimuló la biosíntesis de terpenos de interés en la mayoría de los tratamientos con elevadas concentraciones de sacarosa.

Palabras clave: *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez, carbón activo, sacarosa, doble fase, medio líquido, micropropagación, terpenos.

Abstract

The aim was to study the effect of two *in vitro* culture systems (double phase and agitated liquid medium) on plants of *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez with the objective of studying their effect on plant development, as well as the impact they could have on the biosynthesis of secondary metabolites (terpenes) of interest for the biological activities described. For this purpose, *in vitro* initiated seedlings were treated with different concentrations of activated charcoal and sucrose (double-phase culture), and with the growth regulators mT, BAP and GA3 (agitated liquid medium) for 4 weeks. After this period, various parameters of plant development (elongation, number of developed nodes and stems, and multiplication rate) were measured. Subsequently, the plant material was dried and analyzed using two techniques based on gas chromatography: HS-SPME-GC/MS, and SPME-GC/MS.

The results show that the dual-phase *in vitro* culture system provided good results in plant growth and development, with the treatments with 3 g/l of CA and 45 g/l of sucrose, 0 g/l of CA and 45 g/l of sucrose, and 0 g/l of CA and 60 g/l of sucrose standing out. In these, significantly higher values were obtained in the above-mentioned parameters. However, the liquid medium culture did not prove to be a good method for the desired objectives due to a high contamination rate and physiological alterations (hyperhydration).

Chemical analysis showed that the most abundant compounds were carvacrol, beta-caryophyllene, gamma-terpinene and linalool in all treatments.

In conclusion, the double-phase culture provided good results in terms of *in vitro* plant growth, and stimulated the biosynthesis of terpenes of interest in most of the treatments with high sucrose concentrations.

Key words: *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez, activated carbon, sucrose, double phase, liquid medium, micropropagation, terpenes.

Índice

1.	Introducción	1
1.1	Características de <i>Satureja intricata</i> Lange var. <i>gracilis</i> (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez.....	1
1.2	Generalidades cultivo <i>in vitro</i>	3
1.3	Micropropagación	4
1.4	Reguladores del crecimiento empleados en cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales	6
1.4.1	Auxinas	7
1.4.2	Citoquininas	7
1.5	Técnica de cultivo en doble fase.....	7
1.5.1	Carbón vegetal activado.....	9
1.6	Técnica de cultivo en medio líquido agitado.....	9
1.7	Cromatografía de Gases.....	11
2.	Objetivos.....	13
3.	Material y métodos.....	15
3.1	Material vegetal.....	15
3.2	Multiplicación y elongación.....	15
3.2.1	Técnica de cultivo en doble fase	15
3.2.2	Técnica de cultivo en medio líquido agitado	17
3.3	Extracción y análisis químico de la planta.....	18
3.3.1	Micro-Extracción en Fase Sólida (SPME)	18
3.3.2	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS). Técnica Headspace (HS)	18
3.4	Análisis estadístico	19
4.	Resultados	21
4.1	Técnica de cultivo en doble fase	21
4.2	Técnica de cultivo en medio líquido agitado	27
4.3	Extracción y análisis químico	30
4.3.1	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS). Técnica Headspace (HS)	30
4.3.2	Micro-Extracción en Fase Sólida (SPME).....	38
5.	Discusión	43
5.1	Técnica de cultivo en doble fase	43
5.2	Técnica de cultivo en medio líquido agitado.....	44
5.3	Extracción y análisis químico	45

6. Conclusiones	47
7. Bibliografía	49

Isabel Soto Ros

1. Introducción

1.1 Características de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez

S. intricata (Lamiaceae) es un endemismo del centro, este y sur de la Península Ibérica, que se desarrolla en una amplia variedad de suelos y condiciones climáticas (Arrebola et al., 1997; Morales et al., 2007).

Esta especie tiene un destacable elenco de usos y aplicaciones: cabe destacar el papel que juega en gastronomía, medicina popular, así como en apicultura. Además, debido al sistema de raíces tan desarrollado con el que cuenta, son útiles para estabilizar los suelos previniendo la erosión. Son consideradas de interés mundial como plantas medicinales y, por ello, tienen un potencial de producción comercial (Arrebola et al., 1997).

La variedad *gracilis* incluye plantas de tallos más elevados, a menudo difusos, que no son espinescentes. Las flores se agrupan en verticilastros (conjunto de flores muy próximas entre sí) de 6 o más flores, y cáliz acampanado con dientes inferiores más largos que el tubo (Figura 1). Esta variedad se distribuye en ambientes de montañas de elevación media de Castellón, Valencia y Alicante, aunque existen ciertas diferencias morfológicas constantes que permiten separarlas de las poblaciones típicas de Aragón y Castilla (Morales et al., 2007).

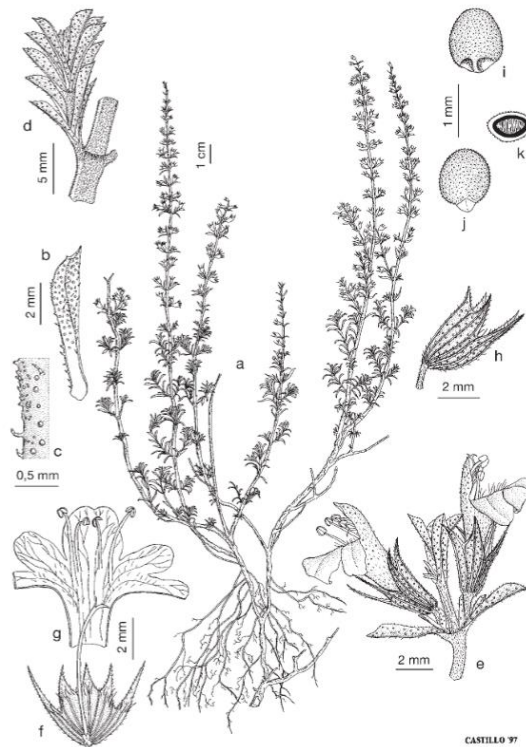


Figura 1. Morfología de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R. Morales, G. López & Sánchez-Gómez. a) hábito; b) hoja; c) detalle del margen de la hoja; d) porción de tallo con nudo y fascículo de hojas; e) verticilo de la inflorescencia; f) cáliz abierto ventralmente con gineceo; g) corola abierta ventralmente; h) cáliz en la fructificación, vista lateral; i) núcula, vista ventral; j) núcula, vista dorsal; k) núcula, sección transversal. Fuente: López González, G. 1980.

A lo largo de los años, las personas han utilizado el conocimiento y el uso tradicional para aplicar los recursos vegetales de nuestro entorno, ayudando al desarrollo de la etnobotánica. La etnobotánica es de naturaleza interdisciplinaria, con una amplia variedad de aplicaciones y enfoques, la cual consiste en el uso tradicional de plantas (silvestres o cultivadas) en recetas tradicionales, remedios caseros y conserva de los alimentos (Peñarda et al., 2012) debido a la presencia de diferentes compuestos en sus aceites esenciales.

Las especies del género *Satureja* contienen altos niveles de monoterpenos y diterpenos tales como el carvacrol, p-cimeno, borneol, y sesquiterpenos, en sus aceites esenciales, los cuales participan en actividades biológicas relacionadas con la promoción de la salud en humanos. De entre las actividades biológicas descritas para los extractos y compuestos de las especies de este género están la actividad antioxidante, antifúngica, bactericida, antiséptica, aperitiva, digestiva, espasmolítica, astringente, antidiarreica, hemostática local, cicatrizante, balsámica y diurética (María, L., & Centeno, M., 2003; Yesiloglu et al., 2013).

La actividad bactericida ha motivado el uso de estas especies en sistemas de conservación de alimentos, pudiendo aumentar la seguridad de estos, aunque presenta ciertas limitaciones debido a su fuerte olor cuando se aplican las dosis necesarias para que sea efectivo (Chorianopoulos et al., 2006). Su olor resulta parecido al tomillo y un sabor algo picante y aromático (María, L., & Centeno, M., 2003).

1.2 Generalidades cultivo *in vitro*

A causa del incremento de la población mundial estos últimos años, ha aumentado el interés por la biotecnología vegetal con el objetivo de producir alimentos, mejorar los cultivos y adaptarlos a diferentes condiciones climáticas para obtener metabolitos de interés comercial (Llorente, 2002, p.28-31).

La propagación en plantas mediante la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* cuenta con dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de patógenos) y el control de los factores que afectan al crecimiento. Reproducir en el laboratorio los factores que componen el ambiente natural de la planta resulta muy complejo, por lo que se simplifica el proceso eligiendo aquellos factores que se pueden mantener controlados, por lo que exige un control específico del ambiente, tanto químico como físico (Llorente, 2002, p.28-31).

Se utiliza el término explante para referirse a la parte del órgano o tejido vegetal que se cultiva *in vitro*. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de las cámaras de crecimiento, la cual se regula a una temperatura de 21-23°C y controlando las horas de exposición de luz. Por otro lado, el medio de cultivo que soporta y aporta los nutrientes necesarios y deseados para el crecimiento de la planta se puede componer de sales minerales, vitaminas reguladoras del crecimiento, azúcar, agua destilada y agar. Esta composición depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación. Entre los factores no biológicos que pueden afectar al desarrollo de la planta se encuentran los factores químicos, como la composición del medio de cultivo y el pH; y en el caso de factores físicos, afecta la temperatura, luz y fotoperiodo y la humedad.

Los medios nutritivos para el cultivo de células y tejidos vegetales son menos complejos que los de cultivos microbianos y son formulas en formas más o menos empírica. Normalmente, se puede utilizar un medio sencillo y complementarlo con

diferentes componentes y reguladores de crecimiento para llegar a la fórmula que le aporte el tejido las mejores condiciones para su crecimiento y producción. La composición mineral se define en forma precisa en cada uno de los medios y está dada tanto por los macroelementos (N, P, K, S, Mg y Ca) como por los microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe). Estos nutrientes deben estar en una concentración tal que permita el adecuado crecimiento celular. Los requerimientos de nitrógeno son generalmente provistos por una mezcla de nitrato y amonio en concentraciones variables.

Si bien las plantas son autótrofas, puede ser necesario añadir al medio de cultivo algunas vitaminas hasta que los cultivos prosperen. Las vitaminas favorecedoras del desarrollo de cultivos *in vitro* y que se añaden rutinariamente en la mayoría de los cultivos son tiamina (B1), piridoxina (B6), cianocobalamina (B12) y ácido fólico. Debido a que las células cultivadas *in vitro* son generalmente heterotróficas respecto a la fuente de carbono, se debe agregar azúcares al medio de cultivo. Estos actúan como fuente energética y de carbono e incrementan el potencial osmótico del medio. Otros azúcares capaces de sostener el crecimiento o incrementar la producción de metabolitos son la glucosa, fructosa, maltosa y lactosa (Llorente, 2002, p.28-31).

1.3 Micropropagación

La micropropagación es una técnica de propagación clonal que permite la multiplicación masiva de las plantas en cortos periodos de tiempo, reduciendo las necesidades de espacio dedicado al cultivo, y bajo condiciones asépticas. Las plantas micropropagadas son cultivadas a partir de explantes, estabilizados en recipientes cerrados con medio nutritivos y hormonas que dan lugar a altos niveles de uniformidad genética y fenotípica (Lopez D. & Suarez P., 2018, Polo, L. A. L. A. T. P. T. 2019).

El cultivo *in vitro* es considerado una tecnología muy útil para la producción masiva de plantas, y para la obtención de productos naturales derivados del metabolismo vegetal, de forma controlada. Las principales ventajas de este conjunto de herramientas biotecnológicas son:

- Permite el cultivo de plantas con independencia del suelo, clima, problemas socio-políticos e incluso, distribución geográfica.

- Tiene capacidad de establecer un sistema de producción definido, en función de las demandas del mercado en un momento dado, y la producción no está sujeta a la variabilidad estacional.
- Facilita el cultivo de especies no domesticadas y/o difíciles de propagar o conservar mediante métodos convencionales (por ejemplo, especies con semillas recalcitrantes).
- Permite la producción de metabolitos secundarios, enzimas, entre otros, con interés aplicado.
- La obtención de enzimas y sistemas de biotransformaciones para ser usados solos o combinados con síntesis química y la producción de plantas transgénicas resistentes a patógenos, herbicidas o a estrés abiótico que actúen como biorreactores en la producción de proteínas, carbohidratos o lípidos, entre otros (Llorente, 2002, p.28-31).

El proceso de micropropagación consiste en una serie de etapas que, de forma general, se pueden resumir en el siguiente esquema basado en la propuesta de Llorente (2002):

Fase 0. Preparación de la planta madre. Consiste en cultivar la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para asegurar un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades que asegure el éxito del posterior establecimiento de la planta en condiciones de cultivo *in vitro*.

Fase 1. Desinfección del material vegetal. Una vez obtenida la planta madre, se extraen fragmentos a partir de los cuales se obtienen los explantes que pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Previo a la extracción de los explantes, se lleva a cabo su desinfección, empleando agentes físicos, químicos o combinas de ambos, para eliminar posibles contaminantes externos, siendo los más comunes hongos y bacterias que habitan de manera natural en el ambiente, y en los tejidos de las plantas.

Fase 2. Introducción del material *in vitro*. Posterior a la desinfección superficial, se seleccionan y preparan los explantes en condiciones de flujo laminar, para transferirlos al medio de cultivo estéril, e iniciar el cultivo *in vitro*.

Fase 3. Multiplicación y elongación. En esta fase, los explantes que han sobrevivido de la fase anterior se tratan con reguladores del crecimiento (fundamentalmente citoquininas) para promover la formación y elongación de nuevos brotes axilares o adventicios. Estos nuevos brotes se han de subcultivar periódicamente

en un nuevo medio de cultivo en tubos de cultivo u otros recipientes aptos, todo ello en cabinas de flujo laminar para mantener las condiciones de asepsia.

Fase 4. Enraizamiento de las plántulas. En primer lugar, los explantes deben tener un tamaño aproximado de 2 cm, estos se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo cuente con hormonas del tipo auxinas, aunque no es necesario para todas las especies vegetales. En esta etapa tendrá lugar el desarrollo de raíces, fundamentalmente.

Fase 5. Aclimatación de los explantes enraizados. Esta fase constituye la etapa de preparación, previa a la transferencia de las plántulas micropropagadas a condiciones de cultivo ambiental *ex vitro*. Para ello, las plantas deben ser adaptadas de forma progresiva a las condiciones naturales ya que los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, por lo que esta fase es crítica para la supervivencia o muerte de la planta. Las plantas sufrirán cambios de diferente tipo, como de humedad, temperatura y luz, que permitirán la adaptación de estas a vivir en condiciones naturales. De forma general, las plantas micropropagadas pasarán por diferentes estancias en las que se disminuirá progresivamente la humedad relativa e incrementará la intensidad de luz para ir adaptando de manera progresiva a las condiciones ambientales del cultivo *ex vitro* (Castillo, A., s.f.) (Figura 2).

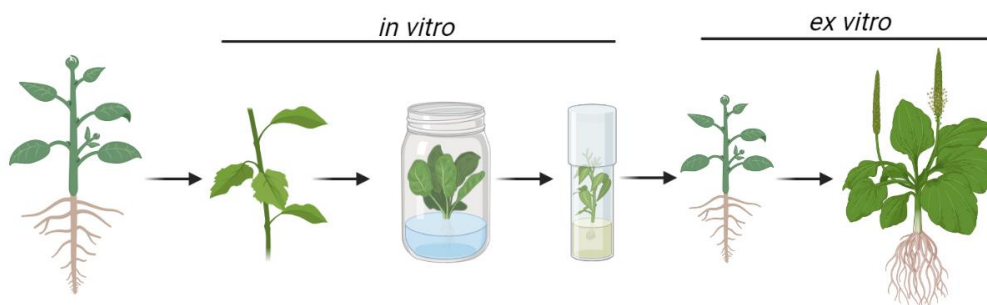


Figura 2. Etapas del proceso de micropropagación en cultivo *in vitro* vegetal. Elaborado por Isabel Soto Ros.

1.4 Reguladores del crecimiento empleados en cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

Los reguladores del crecimiento (u hormonas) son sustancias que actúan sobre el desarrollo de las plantas y son complementarios a los nutrientes principales (sacarosa y macro y micronutrientes). Además, tienen generalmente muchos efectos opuestos. Afectan al metabolismo de la planta y a la síntesis de componentes químicos durante el

cultivo *in vitro*. Entre los reguladores de crecimiento más comúnmente usados en cultivo *in vitro* se encuentran las auxinas y las citoquininas. (Kulus & Tymoszuk, 2020).

Las auxinas, citoquininas y las interacciones entre estas son considerados los más importantes para la regulación del crecimiento y el desarrollo organizado en el tejido y los órganos de la planta. Sin embargo, el ácido abscísico, etileno, gibelinas y otras hormonas tienen papeles de regulación que no deben ser ignorados en el sistema de cultivo (Gaspar et al., 1996).

1.4.1 Auxinas

Las auxinas son esenciales para el crecimiento celular, las cuales afectan tanto a la división celular como a la expansión celular. Bajo condiciones *in vitro*, las auxinas suelen estimular el desarrollo de raíces y callos. Las más populares en el cultivo *in vitro* son 2,4-D, ácido indol-3-acético (IAA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido 1-naftalacético (NAA) y picloram (PIC) (Gaspar et al., 1996).

1.4.2 Citoquininas

Las citoquininas promueven la división y diferenciación celular. Bajo condiciones *in vitro*, suelen estimular la activación de brotes axilares/adventicios y la maduración de embriones somáticos. Los más comúnmente usados son 6-benziladenina (BA), kinetina (KIN), tiazurón (TDZ) y zeatina (ZEA) (Kulus & Tymoszuk, 2020).

1.5 Técnica de cultivo en doble fase

La técnica (o sistema) de cultivo de doble fase se caracteriza en que los explantes permanecen en el medio semisólido y el medio líquido es renovado periódicamente a través de todo el cultivo (Figura 3), eliminando así la necesidad de subcultivar y la posibilidad de contaminación durante el subcultivo puede ser reducida o eliminada. Hasta la fecha, existen artículos que demuestran la eficiencia del desarrollo *in vitro* de las raíces como este sistema, como el de Kadota et al. (2000). La composición de los medios de cultivo, tanto semisólido como líquido, es la misma, pudiendo variar la fase líquida al añadir otros componentes, como hormonas, antioxidantes u otros. Muchos estudios demuestran que la misma composición en ambas fases provocan un aumento

en la eficiencia en la elongación de los explantes, aunque pueden fomentar el enraizamiento y elongación a la vez (Senapati, S., 2015).

La técnica de cultivo en doble fase se ha implementado para reducir costes comparado con la micropropagación usando sistemas semisólidos, además de aumentar las tasas de multiplicación (Lopez D. & Suarez P., 2018). También implica una mejor disponibilidad de nutrientes y componentes del medio líquido en comparación con el medio semisólido en solitario, debido a una mayor superficie de absorción de estos componentes y existe una mayor difusión de las moléculas además de mejor capacidad de eliminación y dilución de los productos de desecho derivados del explante.

Esta técnica aporta muchos beneficios, como la producción de metabolitos secundarios, el desarrollo de nuevas técnicas de mejora vegetal permite obtener plantas libres de virus y mucho más. Se caracterizan por la disposición de una capa estática de medio líquido por encima de un medio semisólido. Algunos de sus objetivos son la búsqueda de un método para incrementar la elongación y calidad de los explantes; la optimización del cultivo *in vitro*; la solución de desórdenes fisiológicos como la hiperhidratación o la minimización del coste y la manipulación para elongar y enraizar explantes en la micropropagación de especies de interés comercial. Aunque tiene ciertas desventajas, como la posibilidad de provocar hiperhidratación en los explantes y otros cambios morfológicos asociados a la aplicación de este sistema y su respuesta fisiológica (Serrano-Martínez et al., 2011).



Figura 3. Técnica de cultivo *in vitro* en doble fase de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez donde se aprecia la fase semisólida (inferior) y la fase líquida (superior). Elaborado por Isabel Soto Ros.

1.5.1 Carbón vegetal activado

El carbón vegetal activado (CA) es usado como componente purificante y decolorante para líquidos. Antiguamente, los carbones utilizados se producían únicamente por pirólisis, pero actualmente se oxidan y purifican para producir el carbón activado. El CA es cualquier forma de carbón caracterizada por una alta capacidad de absorción de gases, vapores y sólidos coloidales. Diferentes tipos de carbón vegetal activado se prepara para diferentes objetivos. Este se puede producir a partir de diferentes fuentes, como la madera, desperdicios de madera, licores de residuos de papeleras y turba.

El CA muestra gran adsorción de productos de insaturación aromáticos que intercambia átomos entre dos productos. Por otro lado, compuestos aromáticos, como los fenoles y otras oxidaciones, auxinas, citoquininas y hormonas podrían tener buena adsorción de afinidad por el CA.

Los efectos del CA en los tejidos en respuesta al cultivo *in vitro* parecen ser dependientes no solo del tipo de CA y su grado de activación, sino también en la especie de planta cultivada (Pan & Van Staden, 1998).

La adición de CA podría tener efectos tanto beneficiosos como negativos en el crecimiento y desarrollo, dependiendo del medio, el tejido usado y/o los objetivos que se quieran llevar a cabo. Entre los efectos beneficiosos están la absorción de complejos fenólicos, crecimiento del rizoma, mejora del desarrollo y absorción de sustancias tóxicas presentes en el medio (Moraes et al., 2005).

1.6 Técnica de cultivo en medio líquido agitado

La técnica de cultivo en medio líquido agitado consiste en el empleo de un sistema de cultivo líquido en agitación con renovación pasiva de la atmósfera interna en un frasco de cultivo de vidrio, en el cual se colocan explantes y el medio de cultivo (Figura 4) con los tratamientos que se haya diseñado (Cabrera et al., 2008). El cultivo mediante sistemas en medio líquido, proporcionan condiciones de cultivo uniformes, el medio puede ser renovado fácilmente sin necesidad de cambiar de recipiente, la limpieza del recipiente luego de un período de cultivo es más fácil y se reducen los subcultivos. Su uso a menudo resulta en mayores tasas de crecimiento en relación con el medio semisólido. Esto se debe a que una mayor superficie del explante está en contacto con el medio y, cuando es aireado o agitado, se reducen los gradientes de difusión entre

éste y el explante. Al mismo tiempo, los metabolitos tóxicos que pueden acumularse en las proximidades de los tejidos son eficientemente dispersados.



Figura 4. Tres de los tratamientos realizados con 3 réplicas cada uno de la técnica de cultivo en medio líquido agitado en agitador orbital de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez. Elaborado por Isabel Soto Ros.

El principal limitante del uso de esta tecnología es la aparición de hiperhidricidad o vitrificación, que es un desorden morfológico y fisiológico de los tejidos que están en contacto directamente con el líquido, durante el cultivo, debido al exceso de agua que absorbe la planta (Tascan et al., 2007). Se manifiesta como una malformación de hojas y tallos que presentan aspecto vítreo o traslúcido con hojas rizadas, arrugadas, alargadas, empapadas de agua, gruesas y quebradizas, además de cortos entre nudos que, en definitiva, generan plantas malformadas, que no son funcionales desde el punto de vista fisiológico (Ross & Castillo, 2009; Tascan et al., 2007).

Las principales consecuencias derivadas de la vitrificación son el cierre estomático dificultado, anomalías en tejidos vasculares y epidérmicos, afección de fotosíntesis, lo que resulta en plantas que no se adaptan al trasplante *ex vitro*. Otro de los trastornos es que reduce las síntesis de lignina, pero este proceso puede ser reactivado agregando al medio de cultivo floricitina o alguno de sus precursores (Ross & Castillo, 2009).

1.7 Cromatografía de Gases

En la caracterización del perfil químico de los extractos vegetales se emplean diversas técnicas analíticas de las que la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) representa la técnica más usada, ya que permite identificar los componentes mediante la comparación del espectro de masas experimentales con datos almacenados en bibliotecas de bases de datos (Rodríguez-Maecker et al., 2017).

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica desarrollada para compuestos volátiles que no se descomponen al calentarse. Es una técnica rápida y con buena resolución, además de ser muy eficiente con una cantidad muy pequeña de muestra (del orden de unos pocos μL). La muestra de interés se volatiliza e inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, por lo que es importante que la muestra sea volátil y estable térmicamente. Aunque, esta técnica cuenta con algunas desventajas y la reproducibilidad de la inyección puede generar variaciones en la precisión, ya que afecta el volumen y la velocidad de inyección, pero puede resolverse si se establecen relaciones entre la muestra y una sustancia de características similares a la muestra, para así normalizar las variables que afectan a la inyección, debido a que la muestra y el estándar se ven afectados de la misma manera (Baquero, 1954).

La Micro-extracción en fase sólida (SPME) es utilizada como una herramienta fundamental en los laboratorios analíticos. No obstante, cuenta con una selectividad limitada, aunque se dispone de gran diversidad de fibras que abarcan diferentes rangos de polaridad consiguiendo así que especies de la matriz sean co-extraídas con los analitos dificultando su determinación final. El uso de esta metodología ha permitido determinar diferentes compuestos, como compuestos fenólicos (Díaz-Álvarez et al., 2018).

Por otro lado, la técnica Headspace (HS) es una técnica de preparación de muestras muy sencilla y común para la GC. En ella, los analitos volátiles se extraen de muestras líquidas o sólidas colocándolas en un vial sellado, llevando el sistema al equilibrio y recogiendo una muestra del vapor. Alternativamente, se puede hacer pasar una corriente de gas a través de la muestra, evaporando los analitos que se recogen en una trampa de fase sólida (Sithersingh & Snow, 2021).

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es la optimización de las condiciones de cultivo *in vitro* para estimular la biosíntesis de terpenos presentes en *S. intricata* var. *gracilis*. Para alcanzar este objetivo general, el trabajo se ha estructurado mediante la consecución de los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de un sistema de cultivo en doble fase, basado en tratamientos con diferentes concentraciones de carbón activo y sacarosa, en parámetros de desarrollo vegetal *in vitro*, tales como la producción de nodos, nuevos tallos generados por explante y elongación, así como la aparición de alteraciones fisiológicas (vitrificación e hiperhidratación).
- Estudiar el efecto de un sistema de cultivo en medio líquido con diferentes concentraciones de PGRs, sobre los mismos parámetros de desarrollo vegetal *in vitro* comentados en la anterior técnica.
- Determinar el perfil en terpenos, tanto cualitativo como cuantitativo, en extractos realizados sobre las plantas cultivadas en doble fase, mediante dos técnicas de cromatografía (HS- y SPME-GC/MS).

3. Material y métodos

3.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado para los distintos experimentos desarrollados en el presente Trabajo Fin de Grado corresponde a un quimiotipo seleccionado de *Satureja intricata* var. *gracilis*, y mantenido en condiciones de cultivo *in vitro* en las instalaciones de la Universidad Católica de Valencia desde 2021.

3.2 Multiplicación y elongación

Los experimentos de multiplicación y elongación se basaron en 20 tratamientos utilizando la técnica de cultivo en doble fase y 5 tratamientos usando la técnica de cultivo en medio líquido aplicados ambas técnicas a segmentos nodales tal y como se detalla a continuación.

3.2.1 Técnica de cultivo en doble fase

Se utilizaron tubos de ensayo de 14.5 x 2.5 cm (Carolina, Burlington, USA) cerrados con tapón. Una vez los tubos fueron esterilizados mediante autoclavado, se dispensó el medio de cultivo. Para la preparación del medio se utilizó un vaso de 3000 ml y un agitador magnético (Velp científica, Usmate Velate, Italia). En el recipiente se añadió los componentes básicos que componen el medio basal de cultivo en las siguientes cantidades: 4,4 g/l de MS (Duchefa Biochemie, Haarlem, Países Bajos), 5,5 g/l de *Plant Agar* (Duchefa Biochemie, Haarlem, Países Bajos) y 30 g/l de sacarosa. Además de estos componentes base, se añadió, 3 días posteriores a la introducción de los explantes en el medio semisólido, 500 µl de fase líquida compuesta por ½ de la concentración de sales Knop (0,1 g/l KNO₃; 0,4 g/l Ca (NO₃)₂; 0,1 g/l KH₂PO₄ y 0,1 g/l MgSO₄·7H₂O), diferentes concentraciones de sacarosa y de CA (Duchefa Biochemie, Haarlem, Países Bajos). El pH de cada medio fue ajustado mediante un Phímetro GLP21 (Crison, Barcelona, España), previamente calibrado con soluciones tampón pH 7.00 y 4.00, para disminuir al máximo cualquier probabilidad de error en la medición. El ajuste del pH del medio para que su valor estuviera entorno al 5,7-5,8 (en caso del medio semisólido) y valor de 5 (en caso del medio líquido) se llevó a cabo con soluciones *stock* de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N y de ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N.

Los explantes se cultivaron en tubos de ensayo que contenían medio basal. Éste fue suplementado con una fase líquida con sales Knop, CA y sacarosa, la cual se

renovaba cada 7 días, excepto para el caso del control que carecía de fase líquida. Se llevaron a cabo 20 tratamientos para la multiplicación y elongación del material vegetal. Los explantes se sometieron a 4 concentraciones (0 g/l; 3 g/l; 6 g/l y 9 g/l) de CA y 5 concentraciones (0 g/l; 15 g/l; 30 g/l; 45 g/l y 60 g/l) de sacarosa.

El tamaño de los explantes empleados para la multiplicación fue de 1 cm, tratándose de segmentos nodales, incluyendo una proporción de tallo con un par de hojas del nudo apical o lateral. Las condiciones de la cámara se fijaron a 23°C y un fotoperiodo de 16 horas. Las plántulas se cultivaron durante 30 días y, una vez finalizado este tiempo, se realizó una medición de parámetros morfogénicos como son: elongación de los tallos del explante (cm), número de nodos producidos, número de tallos nuevos generados por explante, la tasa de multiplicación (el número de nodos multiplicado por el número de tallos formados), biomasa fresca, la presencia o ausencia de raíces desarrolladas, además de la presencia de signos de vitrificación. Los datos recogidos se midieron con papel milimétrico, y la biomasa fue tomada mediante una balanza de precisión (224 Basic, XS Balance, Carpi, Italia).

Tabla 1. Tratamientos llevados a cabo para el proceso de multiplicación. Se muestran las concentraciones establecidas a las que se preparó el medio de la fase líquida para cada tratamiento en el que se subcultivaron explantes de 1 cm durante 30 días.

Tratamiento	CA (g/l)	Sacarosa (g/l)
1	0	0
2		15
3		30
4		45
5		60
6	3	0
7		15
8		30
9		45
10		60
11	6	0
12		15
13		30
14		45
15		60
16	9	0
17		15
18		30
19		45
20		60

3.2.2 Técnica de cultivo en medio líquido agitado

Por otro lado, para esta técnica se utilizaron matraces Erlenmeyer de 100 ml tapados con algodón, Parafilm y papel de plata. Una vez esterilizados, se vertió un medio líquido compuesto por medio basal, pero en este caso sin agar, además de añadir 30 mg/l de eritromicina. También se añadieron diferentes concentraciones de PGRs, como BAP (Duchefa Biochemie, Haarlem, Holanda), GA3 y mT. El pH fue ajustado a valores aproximados de 5,7.

Los explantes fueron desinfectados previamente a una concentración alta (60 mg/l) de eritromicina durante 2 horas, después se introdujeron 8 explantes por cada tratamiento. Se realizaron 6 tratamientos que contenían 30 mg/l de eritromicina, 4,4 g/l de MS y 30 g/l de sacarosa como composición común, además de diferente composición de mT (1 μ M; 4 μ M y 4,4 μ M), BAP (4,4 μ M) y GA3 (2 μ M), excepto el control al que no se le añade ningún tipo de PGRs.

Una vez introducidos los explantes en los diferentes medios, se colocaron en la cámara de cultivo con las mismas condiciones que en el apartado anterior, pero en un agitador orbital (Labbox Labware, Premio de Dalt, Barcelona) a 125 rpm. Las plántulas se cultivaron durante 30 días y, una vez finalizado este tiempo, se realizó la medición de los mismos parámetros morfogénicos que los medidos en la técnica nombrada anteriormente.

Tabla 2. Tratamientos llevados a cabo para el proceso de multiplicación. Se muestran las concentraciones establecidas a las que se preparó el medio líquido para cada tratamiento en el que se subcultivaron explantes de 1 cm durante 30 días. De cada tratamiento se realizaron 3 réplicas, cada una de ellas con 8 explantes por matraz.

Tratamiento	mT (μ M)	BAP (μ M)	GA3 (μ M)
1	0	0	0
2	4,44	0	0
3	0	4,44	0
4	4	4,44	0
5	0	4,44	2
6	1	4,44	0

3.3 Extracción y análisis químico de la planta

3.3.1 Micro-Extracción en Fase Sólida (SPME)

Se estudió el contenido de terpenos de aquellas plántulas con diferentes tratamientos cultivadas *in vitro*. Las muestras de plantas se secaron en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente (aprox. 22°C) durante un periodo máximos de 15 a 20 días. Después del secado, dos réplicas de muestra (aproximadamente 0,02 g del material vegetal), se sometieron a dos análisis químicos complementarios. El método de extracción de la planta y las metodologías analíticas se basaron en estudios previos realizados por el grupo de investigación sobre compuestos químicos similares (Asensio et al., 2022; Boscherini & Michelozzi, 1993; Gutiérrez et al., 2002; Rodríguez-Maecker et al., 2017).

Se realizó una Micro-Extracción en Fase Sólida (SPME) con posterior análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS) utilizando la técnica Headspace (HS). En este enfoque, la caracterización química de la muestra es directa y no es necesaria la extracción, porque los análisis se basan en la emisión de compuestos volátiles vegetales. Las muestras se prepararon de la siguiente manera: se secaron y pulverizaron 0,02 g de hojas. Luego, el material vegetal se colocó en un vial de vidrio, se sometió a calentamiento y agitación con la fibra de SPME. A continuación, los compuestos volátiles adsorbidos por la fibra se analizaron mediante GC/MS. Esta metodología no se ve afectada por el solvente, en comparación con los análisis realizados en extractos de plantas. Las estimaciones sobre el contenido de fitoquímicos se realizaron mediante el cálculo del porcentaje de área (% PA).

3.3.2 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS). Técnica Headspace (HS)

Se extrajeron 0,02 g de muestras de plantas secas en 4 mL de metanol al 80% (v/v) en tubos de ensayo. A continuación, los tubos se incubaron durante 30 min en un baño de ultrasonidos y los extractos obtenidos finalmente se filtraron (0,45 mm) y se almacenaron a 4°C hasta su análisis por SPME-GC/MS. Este enfoque permite que la cuantificación de los compuestos identificados se pueda realizar mediante una calibración estándar externa y, cuando se combina con el HS-SPME-GC/MS, permite una mejor comprensión de la composición química de las plantas.

La identificación de metabolitos volátiles se llevó a cabo utilizando la biblioteca de espectros presente en el software NIST Chemistry WebBook. Se cuantificaron 16 compuestos utilizando 12 estándares de terpenos establecidos. Se prepararon soluciones mixtas de patrones usando metanol al 80% en un rango de concentraciones e inyectando en SPME-GS-MS usando las mismas condiciones cromatográficas que las muestras. Los compuestos detectados se cuantificaron utilizando los estándares correspondientes. En ausencia de estándares correspondientes, se utilizó un compuesto similar para la cuantificación.

La determinación del perfil químico del material vegetal cultivado en condiciones in vitro se ha realizado en colaboración con la Dra. Esther Asensio Casas, del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza.

3.4 Análisis estadístico

Los resultados de los experimentos se recogieron en el programa Microsoft Excel. Estos datos dan lugar a la información de la medida de parámetros de desarrollo vegetal tomada en la etapa de multiplicación. Posteriormente, los resultados fueron analizados mediante el programa estadístico GraphPad Prism (San Diego, California) e Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). El análisis de los datos se llevó a cabo mediante análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias significativas fueron reveladas con la prueba LSD de Fisher y t-Student con un nivel de confianza del 95% (error $\alpha = 0,05$).

4. Resultados

4.1 Técnica de cultivo en doble fase

Utilizando la técnica de cultivo en doble fase se obtuvo una supervivencia de entorno al 39,8%, con muy pocos casos de vitrificación y alrededor de un 6,15% de contaminación por hongos tras 30 días de ciclo de cultivo. Tras el cultivo de los segmentos nodales cultivados en las diferentes concentraciones de CA y sacarosa, recogidos en la Tabla 1, la multiplicación del explante fue medida por los diferentes parámetros, recogidos en la Tabla 3, los resultados fueron los siguientes:

En la **elongación del explante** (Figura 5) los resultados más significativos respecto al control fueron obtenidos con el control, con una media de 3,72 cm, además de los tratamientos de 0 g/l de CA y 45 y 60 g/l de sacarosa con medias de 3,5 y 3,35 cm, respectivamente; también se obtuvieron buenos resultados con el tratamiento de 3 g/l de CA y 45 g/l de sacarosa con una media de 3,27 cm y, por último, el tratamiento de 9 g/l de CA y 30 g/l de sacarosa con una media de 3,75 cm.

Respecto al **número de nodos**, los resultados más significativos respecto al control fueron obtenidos con el tratamiento sin CA y con 45 y 60 g/l de sacarosa con medias de 8,36 y 7,63 nodos, respectivamente, además del tratamiento de 3 g/l de CA y 45 g/l de sacarosa con una media de 9 nodos.

Con el **número de tallos**, los resultados más significativos respecto al control se obtuvieron con los tratamientos sin CA y 45 g/l de sacarosa, y 3 g/l de CA con 0 y 15 g/l de sacarosa, con medias de 2, 1,94 y 2,27 tallos, respectivamente.

Por último, la mejor **tasa de multiplicación** se obtuvo con dos tratamientos: sin CA y 45 g/l de sacarosa y 3 g/l de CA y 45 g/l de sacarosa, con medias de 22,45 y 21,14, respectivamente.

Tabla 3. Efecto de 5 concentraciones de sacarosa y 4 concentraciones de carbón activo en el desarrollo vegetal durante la multiplicación de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez. Los valores que se muestran dentro de una misma columna representan la media ± el error estándar, seguido de una letra que representa el nivel de significancia frente a los diferentes tratamientos ($\alpha = 0,05$). Los valores recogidos para cada tratamiento se tomaron tras 30 días en medio compuesto por un medio semisólido (MS, agar y sacarosa) y un medio líquido (1/2 sales Knop, CA y sacarosa).

		Elongación explante (cm)	Número nodos	Número tallos	Tasa multiplicación	Raíces (%)	Supervivencia (%)	Vitrificación (%)
Control		3,72 ± 1,44 a	6,05 ± 1,58 bcd	1,21 ± 0,42 c	5,88 ± 4,35 d	42,11	83,33	12,5
CA (g/l)	Sacarosa (g/l)							
0	0	1,94 ± 0,53 defg	5,17 ± 1,8 cde	1,25 ± 0,45 c	7,08 ± 5,09 d	33,33	50	0
	15	2,95 ± 0,55 abc	8,4 ± 2,37 a	1,7 ± 0,48 abc	15 ± 7,02 abcd	40,00	41,67	0
	30	2,63 ± 0,74 bcd	5,31 ± 1,32 cde	1,15 ± 0,38 c	6,38 ± 3,55 d	30,77	50	0
	45	3,5 ± 1,11 a	8,36 ± 4,57 a	2 ± 1,41 ab	22,45 ± 25,27 a	27,27	45,83	0
	60	3,35 ± 1,31 a	7,63 ± 3,88 ab	1,81 ± 1,11 abc	17,44 ± 18,98 abc	18,75	66,67	4,17
3	0	1,8 ± 0,55 efg	5,13±1,67 cde	1,94 ± 0,77 ab	10,81 ± 6,59 bcd	25,00	66,67	0
	15	1,79 ± 0,57 efg	6,82±3,87 abc	2,27 ± 1,19 a	19,27 ± 21,38 ab	36,36	45,83	12,5
	30	1,7 ± 0,16 efg	4,92±2,47 cde	1,46 ± 0,88 bc	9,08 ± 12,27 cd	23,08	54,17	8,33
	45	3,27 ± 0,95 ab	9±4,69 a	1,86 ± 1,21 abc	21,14 ± 25,6 a	57,14	29,17	20,83
	60	2,32 ± 0,7 bcdefg	4,5±2,74 cde	1,33 ± 0,82 bc	7,5 ± 9,69 cd	16,67	25	8,33
6	0	1,62 ± 0,49 fg	4,27 ± 1,68 de	1,55 ± 0,93 bc	7,82 ± 7,85 cd	27,27	45,83	0
	15	2,04 ± 0,84 defg	4,89 ± 2,52 cde	1,44 ± 0,53 bc	3 ± 5,49 cd	33,33	37,5	0

	30	2,46 ± 0,92 bcde	4,38 ± 1,06 de	1,13 ± 0,35 c	1,67 ± 2,71 d	62,50	33,33	0
	45	2,37 ± 1,21 bcdef	4,9 ± 2,23 cde	1,4 ± 0,69 bc	3,21 ± 5,61 cd	40,00	41,67	0
	60	1,52 ± 0,39 g	4,57 ± 1,87 cde	1,43 ± 0,51 bc	4,25 ± 5,31 d	21,43	58,33	0
9	0	2,25 ± 0,53 cdefg	4 ± 0,53 e	1,27 ± 0,47 c	2,58 ± 4,17 d	18,18	45,83	0
	15	1,57 ± 0,35 g	3,57 ± 1,5 e	1,43 ± 0,51 bc	3,33 ± 4,22 d	28,57	58,33	0
	30	3,75 ± 1,86 a	5,5 ± 1,93 cde	1,38 ± 0,74 bc	2,83 ± 6,01 cd	25,00	33,33	0
	45	2,2 ± 0,55 cdefg	3,86 ± 0,89 e	1,14 ± 0,38 c	1,33 ± 2,48 d	28,57	29,17	0
	60	2,07 ± 0,54 defg	4,5 ± 1,18 de	1,3 ± 0,67 c	2,63 ± 4,4 d	20,00	41,67	0

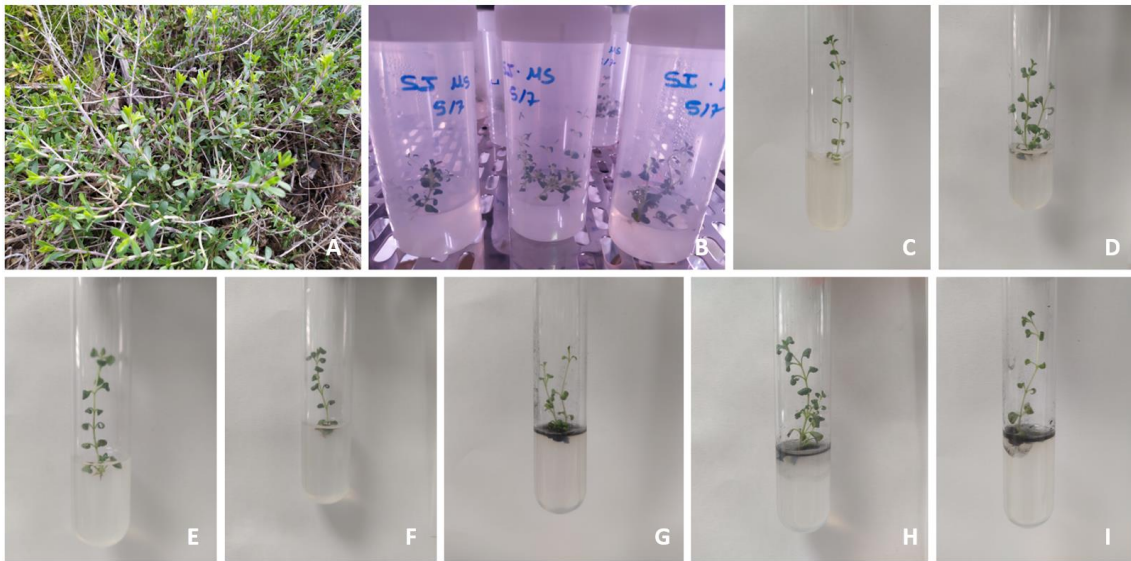


Figura 5. Resultados del desarrollo vegetal en la técnica de cultivo *in vitro* de doble fase. La imagen A) muestra la planta silvestre de donde se partió para la introducción del material e inicio del cultivo *in vitro*; la imagen B) muestra la plántula stock de donde se obtuvieron los clones para el inicio de los experimentos; las siguientes imágenes muestran los explantes obtenidos tras 30 días de cultivo *in vitro* de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez en diferentes tratamientos, más específicamente, la imagen C) muestra un ejemplo del control; la imagen D) muestra un ejemplo del tratamiento sin CA y 45 g/l de sacarosa; la imagen E) tratamiento sin CA y 60 g/l de sacarosa; la imagen F) tratamiento sin CA y 30 g/l de sacarosa; la imagen G) tratamiento con 3 g/l de CA y 45 g/l de sacarosa; la imagen H) tratamiento con 9 g/l de CA y 30 g/l de sacarosa; y la imagen I) tratamiento con 9 g/l de CA y 0 g/l de sacarosa.

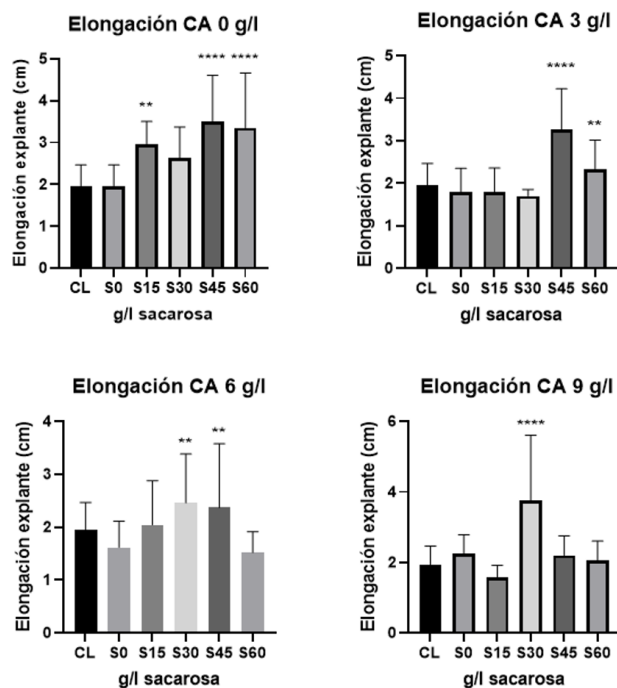


Figura 6. Diferencias en la variable elongación del explante de los diferentes tratamientos en el cultivo *in vitro* en doble fase de *S. intricata* Lange var. *gracilis* a diferentes concentraciones de CA y sacarosa tras 30 días de cultivo. Las estrellas representan el nivel de significancia frente a los diferentes tratamientos ($\alpha = 0.05$).

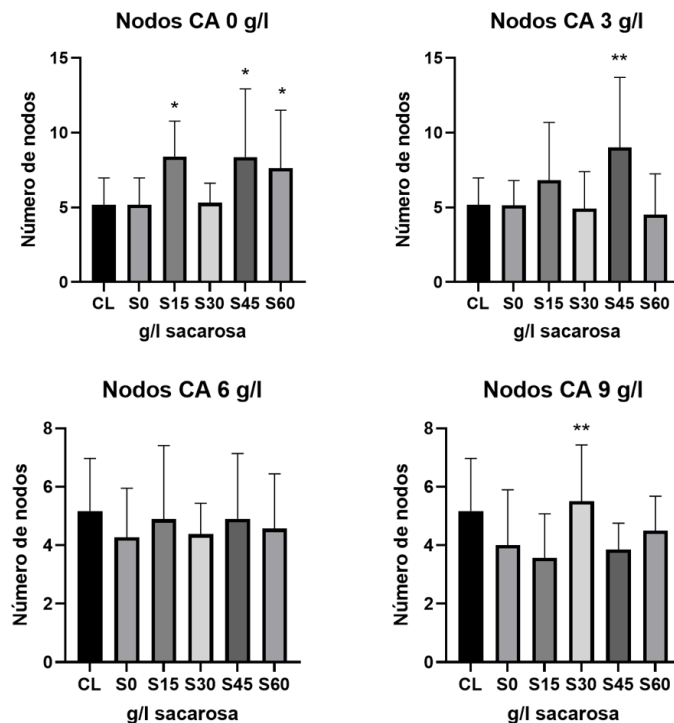


Figura 7. Diferencias en la variable número de nodos desarrollados de los diferentes tratamientos en el cultivo *in vitro* en doble fase de *S. intricata* Lange var. *gracilis* a diferentes concentraciones de CA y sacarosa tras 30 días de cultivo. Las estrellas representan el nivel de significancia frente a los diferentes tratamientos ($\alpha = 0.05$).

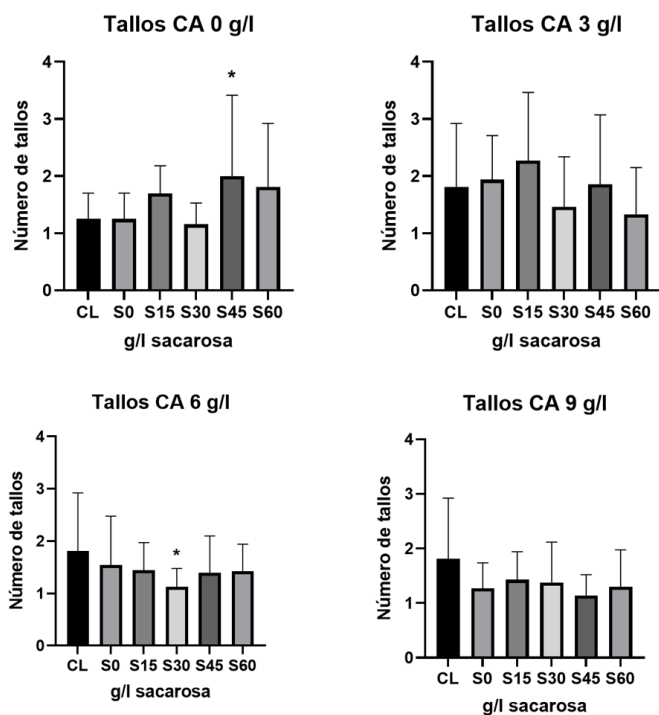


Figura 8. Diferencias en la variable número de tallos desarrollados de los diferentes tratamientos en el cultivo *in vitro* en doble fase de *S. intricata* Lange var. *gracilis* a diferentes concentraciones de CA y sacarosa tras 30 días de cultivo. Las estrellas representan el nivel de significancia frente a los diferentes tratamientos ($\alpha = 0.05$).

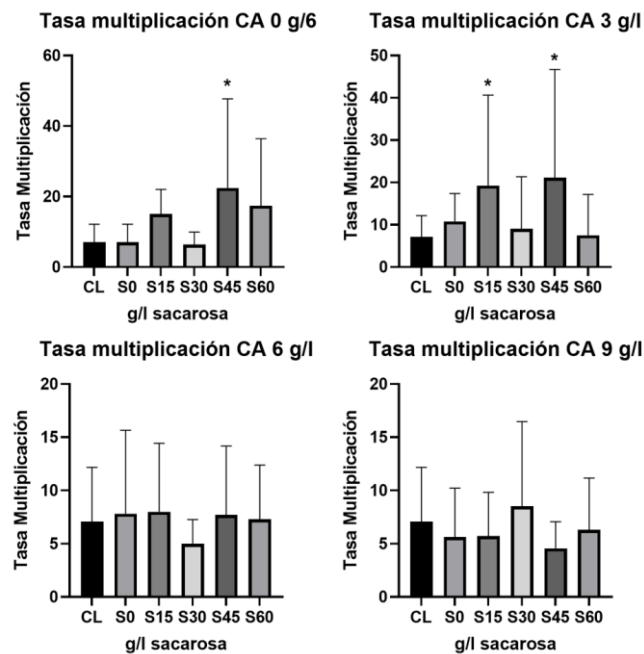


Figura 9. Diferencias en la variable tasa de multiplicación de los diferentes tratamientos en el cultivo *in vitro* en doble fase de *S. intricata* Lange var. *gracilis* a diferentes concentraciones de CA y sacarosa tras 30 días de cultivo. Las estrellas representan el nivel de significancia frente a los diferentes tratamientos ($\alpha = 0.05$).

4.2 Técnica de cultivo en medio líquido agitado

Con la técnica de cultivo en medio líquido con agitación orbital se obtuvo una supervivencia completa, pero con una tasa muy alta de alteraciones morfológicas del explante e, incluso, casos de contaminación aún con el uso y pretratamiento de diferentes concentraciones de antibiótico en los explantes tras 30 días de ciclo de cultivo.

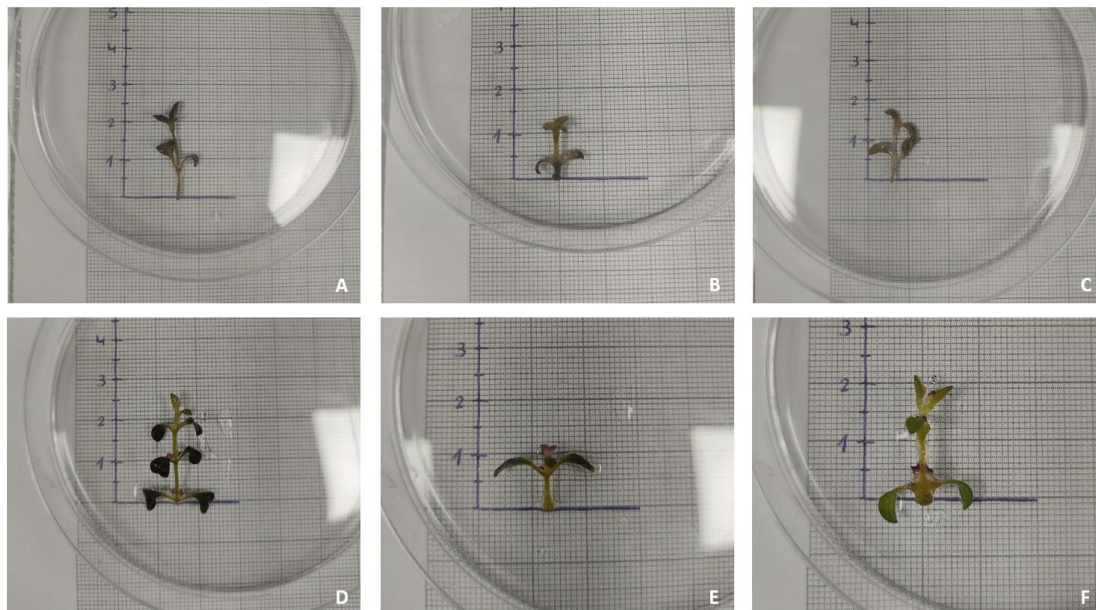


Figura 10. Resultados de los explantes cultivados durante 30 días *in vitro* de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez en un medio de cultivo líquido agitado a 125 rpm a diferentes concentraciones y composición de PGRs, además de medio basal compuesto por MS y sacarosa. La imagen A) muestra un explante del medio compuesto por 2 μ M de GA3 y 4,44 μ M de BAP; la imagen B) muestra un explante del medio compuesto por 4 μ M de m-TOP y 4,44 μ M de BAP; la imagen c) muestra un explante del medio compuesto por 4,44 μ M de BAP y 1 μ M de m-TOP; la imagen D) muestra un explante del medio control, sin PGRs; la imagen E) muestra un explante del medio compuesto por 4,44 μ M de m-TOP; y la imagen F) muestra un explante del medio compuesto por 4,44 μ M de BAP.

La multiplicación de los distintos explantes se midió de la misma manera que la técnica anterior, quedando los diferentes parámetros recogidos en la Tabla 4, tras el cultivo de los segmentos nodales cultivados con los diferentes tratamientos y combinaciones de PGRs reflejados en la Tabla 2, los resultados fueron los siguientes:

En la **elongación del explante** (Figura 10) los resultados más significativos respecto al control fueron obtenidos con de tratamiento de 2 μ M GA3 + 4,44 μ M BAP

con un medio de 1,38 cm, teniendo en cuenta que no existe una diferencia significativa con el resto de los tratamientos.

En el caso del **número de nodos**, los resultados más significativos respecto al control se obtuvieron con el control y el tratamiento de 4,44 μM de m-TOP, dando como resultados una media de 2,04 y 1,96 de nodos, respectivamente.

Respecto al **número de tallos**, el resultado más significativo respecto al control se observó con el tratamiento de 4 μM m-TOP + 4,44 μM BAP, dando como resultado una media de 1,21 tallos, muy superior al resto de tratamientos.

Por último, en la **tasa de multiplicación** se obtuvo ninguna diferencia significativa, debido a que se obtuvieron resultados muy similares entre los tratamientos.

Tabla 4. Efecto de 6 tratamientos con diferentes concentraciones y combinaciones de PGRs en el desarrollo vegetal durante la multiplicación de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez. Los valores que se muestran dentro de una misma columna representan la media \pm el error estándar, seguido de una letra que representa el nivel de significancia frente a los diferentes tratamientos ($\alpha = 0,05$). Los valores recogidos para cada tratamiento se tomaron tras 30 días de un cultivo de medio líquido agitado en agitador orbital a 125 rpm.

Tratamiento	Elongación explante (cm)	Número nodos	Número tallos	Tasa multiplicación	Raíces (%)	Alteraciones morfológicas (%)
Control	1,08 \pm 0,73 bc	2,04 \pm 0,63 a	0,92 \pm 0,28 b	2,04 \pm 1,63 a	0	8,33
4,44 μ M m-TOP	1,08 \pm 0,21 bc	1,96 \pm 1,23 a	1,04 \pm 0,2 ab	2,21 \pm 2,65 a	0	87,5
4,44 μ M BAP	1,02 \pm 0,44 c	1,5 \pm 0,93 ab	0,92 \pm 0,28 b	1,5 \pm 0,93 a	0	91,7
4 μ M m-TOP + 4,44 μ M BAP	1,17 \pm 0,17 abc	1,58 \pm 0,72 ab	1,21 \pm 0,51 a	2,13 \pm 1,94 a	0	100
4,44 μ M BAP + 1 μ M m-TOP	1,26 \pm 0,27 ab	1,33 \pm 0,48 b	1,04 \pm 0,2 ab	1,42 \pm 0,72 a	0	100
2 μ M GA3 + 4,44 μ M BAP	1,38 \pm 0,44 a	1,63 \pm 0,92 ab	1,08 \pm 0,28 ab	1,75 \pm 1,03 a	0	100

Las alteraciones morfológicas observadas se trataron de un alto porcentaje de hiperhidratación, entorno a un 52,78%, dando lugar a un explante más oscuro y grueso debido a la mayor cantidad de agua en hojas y tallo; también se observaron casos de clorosis, entorno al 17,36%, en los cuales se pudo observar su falta de pigmentación característica de la clorofila y más fragilidad del explante; e, incluso, unos pocos casos de vitrificación, entorno a un 10%, caracterizado por un aspecto cristalino o acuoso observado tanto en hojas y tallo.

Por último, los casos de contaminación fueron producidos en la mayor parte de los casos por hongos, llegando a generar grandes cantidades de hifas.

4.3 Extracción y análisis químico

4.3.1 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS). Técnica Headspace (HS)

Se identificaron alrededor de 32 compuestos volátiles por HS-SPME-GC/MS. Los compuestos más abundantes según el porcentaje del área pico fueron gamma-terpineno, carvacrol y beta-cariofileno en el caso de todos los tratamientos.

Tabla 5. Porcentaje (área pico, PA) de los volátiles detectados *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez del control y las muestras compuestas por 0 g/l de CA y concentraciones crecientes de sacarosa. TR, tiempo de retención; ND, compuesto no detectado. Muestras analizadas por HS-SPME-GC/MS.

Componentes	TR (min)	Control (%PA)	0/0 (%PA)	0/15 (%PA)	0/30 (%PA)	0/45 (%PA)	0/60 (%PA)
beta-tujeno	7,85	0,14	0,2	0,17	0,14	0,26	0,22
alfa-pineno	8,06	0,05	0,12	0,06	0,08	0,15	0,14
canfeno	8,56	0,04	0,08	0,03	0,04	0,12	0,11
beta-pineno	9,52	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05
1-octen-3-ol	9,83	0,10	0,16	0,55	0,14	0,19	0,25
beta-mirceno	10,17	0,38	0,54	ND	0,47	0,98	0,63
alfa-felandreno	10,63	0,05	0,07	0,08	0,05	0,11	0,10
alfa-terpineno	11,00	0,54	0,75	0,73	0,52	1,10	0,84
p-cimeno	11,27	1,44	2,78	2,24	2,26	4,29	2,22
D-limoneno	11,42	0,39	0,74	0,54	0,5	0,78	0,66
beta-cis-ocimeno	12,17	0,07	0,05	0,06	0,04	0,08	0,07
gamma-terpineno	12,48	5,26	5,86	6,67	4,99	8,47	7,08
cis-sabineno hidrato	12,74	0,28	0,30	0,29	0,20	0,30	0,30
linalool	13,91	3,64	3,2	3,42	2,44	3,12	3,48
(-)-canfor	15,16	0,33	0,45	0,14	0,36	0,77	0,62
endo-borneol	15,84	0,64	1,14	0,68	0,96	1,38	1,39

terpinen-4-ol	16,16	0,17	0,22	0,18	0,2	0,22	0,24
metilcarvacrol	17,71	0,12	0,29	0,14	0,17	0,31	0,18
timoquinona	18,06	0,70	0,34	0,18	0,28	0,27	0,24
carvona	18,19	0,09	0,16	0,19	0,18	0,07	0,14
dodecano, 2,6,11-trimetil-	18,42	ND	ND	ND	ND	ND	ND
carvacrol	19,07	73,40	69,56	74,03	76,9	66,67	70,15
isómero de elemeno	19,50	0,06	0,03	ND	ND	ND	ND
acetato de carvacrol	20,06	ND	ND	0,13	0,07	ND	0,9
beta-cariofileno	20,87	9,62	10,79	7,95	7,62	9,02	8,26
10,10-dimetil-2,6-dimetilenbicyclo[7.2.0]undecano	20,94	0,09	0,1	0,07	0,12	0,09	0,09
alfa-panasinseno	21,04	0,02	ND	ND	ND	ND	ND
aromandendreno	21,10	0,19	0,11	0,06	0,06	0,08	0,13
selina-5,11-dieno	21,15	0,05	0,03	ND	ND	ND	0,04
cis-beta-farneseno	21,25	0,88	1,06	0,73	0,56	0,61	0,7
humuleno	21,31	0,46	0,46	0,4	0,4	0,45	0,38
gamma-muuroleno	21,60	ND	0,02	ND	ND	ND	ND
biciclogermaceno	21,89	0,39	0,22	0,1	0,1	ND	0,28
beta-bisaboleno	22,00	0,08	0,1	0,08	0,07	0,08	0,05
2,4-di-terc-butilfenol	22,03	0,19	ND	ND	ND	ND	ND
gamma-cadineno	22,22	0,04	0,05	0,04	0,04	ND	0,05
biformeno	27,55	0,06	ND	ND	ND	ND	ND

En el caso de la Tabla 5, representa los 5 tratamientos sin CA, se observa un aumento en el porcentaje de ciertos aceites esenciales respecto al control, dichos aceites son p-cimeno, linalool y enbo-borneal, siendo estos dos últimos también superiores respecto al control en el resto de los tratamientos.

Tabla 6. Porcentaje (área pico, PA) de los volátiles detectados en *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez del control y las muestras compuestas por 3 g/l de CA y concentraciones crecientes de sacarosa. TR, tiempo de retención; ND, compuesto no detectado. Muestras analizadas por HS-SPME-GC/MS.

Componentes	TR (min)	Control (%PA)	3/0 (%PA)	3/15 (%PA)	3/30 (%PA)	3/45 (%PA)	3/60 (%PA)
beta-tujeno	7,85	0,14	0,39	0,21	0,22	0,17	0,2
alfa-pineno	8,06	0,05	0,2	0,13	0,13	0,14	0,12
canfeno	8,56	0,04	0,13	0,08	0,08	0,13	0,07
beta-pineno	9,52	0,05	0,05	0,08	0,08	0,07	0,08
1-octen-3-ol	9,83	0,10	0,14	0,18	0,09	0,12	0,15
beta-mirceno	10,17	0,38	1,21	0,72	0,74	0,67	0,59
alfa-felandreno	10,63	0,05	0,09	0,08	0,1	0,02	0,12
alfa-terpineno	11,00	0,54	0,96	0,73	0,73	0,75	0,75
p-cimeno	11,27	1,44	7,28	2,71	2,36	1,66	2,95
D-limoneno	11,42	0,39	0,81	0,61	0,53	0,45	0,52
beta-cis-ocimeno	12,17	0,07	0,09	0,07	0,07	0,06	0,05
gamma-terpineno	12,48	5,26	6,26	60,9	5,58	6,75	5,9
cis-sabineno hidrato	12,74	0,28	0,24	0,28	0,2	0,09	ND
linalool	13,46	3,64	ND	0,22	0,19	0,15	0,25
(-)-canfor	13,91	0,33	3,4	4,96	3,81	3,66	3,24
endo-borneol	15,16	0,64	0,57	0,94	0,95	0,78	0,6
terpinen-4-ol	15,84	0,17	1,01	1,29	1,07	1,06	1,66
metilcarvacrol	16,16	0,12	0,23	0,28	0,22	0,26	0,21
timoquinona	17,41	0,70	ND	ND	0,14	ND	0,08
carvona	17,71	0,09	1,05	0,55	0,99	0,19	0,32
dodecano, 2,6,11-trimetil-	18,06	ND	0,9	0,38	0,41	0,24	0,55
carvacrol	18,19	73,40	0,05	0,15	0,03	0,16	
isómero de elemeno	18,42	0,06	ND	0,02	0,05	ND	0,06

acetato de carvacrol	19,07	ND	61,98	67,39	69,16	70,11	69,27
beta-cariofileno	19,50	9,62	ND	ND	ND	0,05	ND
10,10-dimetil-2,6-dimetilenbicyclo[7.2.0]undecano	20,06	0,09	0,61	0,19	0,84	0,43	ND
alfa-panasinseno	20,11	0,02	ND	ND	ND	ND	0,03
aromandendreno	20,42	0,19	ND	0,07	0,14	0,03	0,08
selina-5,11-dieno	20,61	0,05	ND	0,05	0,06	0,04	0,07
cis-beta-farneseno	20,87	0,88	10,11	9,92	9,61	9,54	10,88
humuleno	20,94	0,46	0,11	0,1	0,09	0,09	0,11
gamma-muroleno	21,04	ND	ND	0,13	0,06	0,02	0,03
biciclogermaceno	21,10	0,39	0,06	ND	ND	0,25	ND
beta-bisaboleno	21,15	0,08	0,03	0,04	0,04	0,05	ND
2,4-di-terc-butilfenol	21,25	0,19	1,22	0,54	0,47	0,88	0,54
gamma-cadineno	21,31	0,04	0,51	0,45	0,43	0,39	0,52
biformeno	21,60	0,06	ND	0,02	ND	ND	ND
beta-tujeno	21,67	0,14	ND	ND	ND	0,02	ND
alfa-pineno	21,89	0,05	0,13	0,24	0,29	0,42	ND
canfeno	22,00	0,04	0,13	0,05	ND	0,08	ND
beta-pineno	22,03	0,05	ND	ND	ND	ND	ND
1-octen-3-ol	22,22	0,10	0,05	0,05	0,04	0,04	ND
beta-mirceno	27,55	0,38	ND	ND	ND	ND	ND

En la Tabla 6, se observa que los tratamientos con 3 g/l de CA mejoran el porcentaje de PA en los p-cimeno, linalool y enbo-borneal. Además, se identifica por primera vez los compuestos tetradecano y dodecano, 2,6,11-trimetil-, los cuales se seguirán identificando en los siguientes tratamientos.

Tabla 7. Porcentaje (área pico, PA) de los volátiles detectados en *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez del control y las muestras compuestas por 6 g/l de CA y concentraciones crecientes de sacarosa. TR, tiempo de retención; ND, compuesto no detectado. Muestras analizadas por HS-SPME-GC/MS.

Componentes	TR (min)	Control (%PA)	6/0 (%PA)	6/15 (%PA)	6/30 (%PA)	6/45 (%PA)	6/60 (%PA)
beta-tujeno	7,85	0,14	2,47	0,84	0,25	0,22	0,84
alfa-pineno	8,06	0,05	1,72	0,47	0,14	0,08	0,45
canfeno	8,56	0,04	1,33	0,3	0,11	0,07	0,34
beta-pineno	9,52	0,05	0,56	0,24	0,10	0,08	0,27
1-octen-3-ol	9,83	0,10	ND	ND	0,14	0,12	0,34
beta-mirceno	10,17	0,38	ND	2,68	0,75	0,68	2,96
alfa-felandreno	10,63	0,05	2,07	0,24	0,09	0,09	ND
alfa-terpineno	11,00	0,54	3,16	2,75	0,85	0,77	2,53
p-cimeno	11,27	1,44	40,64	16,9	2,98	4,91	12,58
D-limoneno	11,42	0,39	9,94	1,46	0,50	0,49	1,65
beta-cis-ocimeno	12,17	0,07	ND	ND	0,06	0,08	0,26
gamma-terpineno	12,48	5,26	19	22,15	7,00	6,44	17,14
cis-sabineno hidrato	12,74	0,28	ND	ND	0,31	ND	0,35
linalool	13,46	3,64	ND	ND	0,28	0,22	0,46
(-)-canfor	13,91	0,33	ND	ND	3,19	2,21	12,75
endo-borneol	15,16	0,64	4,26	1,88	1,04	0,89	4,34
terpinen-4-ol	15,84	0,17	1,72	0,89	2,29	0,88	3,99
metilcarvacrol	16,16	0,12	ND	ND	0,29	0,21	0,85
timoquinona	16,64	0,70	ND	ND	0,64	1,93	ND
carvona	17,41	0,09	ND	ND	0,08	0,13	0,74
dodecano, 2,6,11-trimetil-	17,71	ND	ND	1,33	0,21	0,26	3,11
carvacrol	18,06	73,40	ND	1,68	2,10	2,42	4,25

isómero de elemeno	18,19	0,06	ND	ND	ND	ND	0,38
acetato de carvacrol	18,42	ND	ND	0,08	ND	ND	0,55
beta-cariofileno	19,07	9,62	11,74	26,59	62,79	68,72	ND
10,10-dimetil-2,6-dimetilbenciclo[7.2.0]undecano	19,50	0,09	ND	ND	ND	ND	ND
alfa-panasinseno	20,42	0,02	ND	ND	0,08	0,15	0,39
aromandendreno	20,61	0,19	ND	ND	0,08	0,07	0,22
selina-5,11-dieno	20,87	0,05	1,35	19,14	12,15	7,27	25,51
cis-beta-farneseno	20,94	0,88	ND	ND	0,12	0,07	0,30
humuleno	21,04	0,46	ND	ND	ND	ND	ND
gamma-muuroleno	21,10	ND	ND	ND	0,09	0,04	0,41
biciclogermaceno	21,15	0,39	ND	ND	ND	ND	ND
beta-bisaboleno	21,25	0,08	ND	ND	0,32	0,06	0,14
2,4-di-terc-butilfenol	21,31	0,19	ND	ND	0,57	ND	1,25
gamma-cadineno	21,89	0,04	ND	0,35	0,20	ND	0,65
biformeno	22,00	0,06	ND	ND	0,21	0,43	ND
beta-tujeno	22,03	0,14	ND	ND	ND	ND	ND
alfa-pineno	22,22	0,05	ND	ND	ND	ND	ND
canfeno	27,55	0,04	ND	ND	ND	ND	ND

En la Tabla 7, se observa que los tratamientos con 9 g/l de CA mejoran el porcentaje de PA en los compuestos linalool, endo-borneal, además de (-)-canfor.

Tabla 8. Porcentaje (área pico, PA) de los volátiles detectados en *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez del control y las muestras compuestas por 9 g/l de CA y concentraciones crecientes de sacarosa. TR, tiempo de retención; ND, compuesto no detectado. Muestras analizadas por HS-SPME-GC/MS.

Componentes	TR (min)	Control (%PA)	9/0 (%PA)	9/15 (%PA)	9/30 (%PA)	9/45 (%PA)	9/60 (%PA)
beta-tujeno	7,85	0,14	1,27	0,58	0,28	0,47	0,93
alfa-pineno	8,06	0,05	1,04	0,31	0,13	0,17	0,57
canfeno	8,56	0,04	0,63	0,24	0,09	0,25	0,31
beta-pineno	9,52	0,05	0,34	0,22	0,11	0,18	0,25
1-octen-3-ol	9,83	0,10	ND	ND	0,12	0,08	0,13
beta-mirceno	10,17	0,38	1,86	1,88	0,92	1,98	2,20
alfa-felandreno	10,63	0,05	1,31	0,23	0,10	0,17	0,32
alfa-terpineno	11,00	0,54	2,14	1,93	1,02	1,86	1,86
p-cimeno	11,27	1,44	29,55	9,30	4,08	7,14	15,29
D-limoneno	11,42	0,39	ND	1,16	0,55	1,18	1,25
beta-cis-ocimeno	12,17	0,07	ND	ND	0,10	0,13	0,16
gamma-terpineno	12,48	5,26	14,93	15,87	8,25	14,14	12,01
cis-sabineno hidrato	12,74	0,28	ND	ND	0,26	ND	ND
linalool	13,46	3,64	ND	ND	0,34	0,46	0,46
(-)-canfor	13,91	0,33	ND	4,99	3,20	4,60	2,20
endo-borneol	15,16	0,64	1,88	3,32	1,33	3,49	1,22
terpinen-4-ol	15,84	0,17	1,18	1,72	1,22	1,09	1,46
metilcarvacrol	16,16	0,12	ND	ND	0,28	0,42	ND
timoquinona	16,64	0,70	ND	ND	1,37	0,07	ND
carvona	17,41	0,09	ND	0,24	0,18	0,09	0,69
dodecano, 2,6,11-trimetil-	17,71	ND	ND	0,62	0,52	0,42	0,67
carvacrol	18,06	73,40	ND	1,29	1,78	1,33	1,76
isómero de elemeno	18,19	0,06	ND	ND	ND	ND	ND

acetato de carvacrol	18,42	ND	ND	ND	ND	ND	0,19
beta-cariofileno	19,07	9,62	40,28	43,91	56,06	33,45	52,92
10,10-dimetil-2,6-dimetilbenciclo[7.2.0]undecano	19,50	0,09	ND	ND	ND	ND	ND
alfa-panasinseno	20,11	0,02	ND	ND	ND	0,20	ND
aromandendreno	20,42	0,19	ND	ND	0,18	ND	ND
selina-5,11-dieno	20,61	0,05	ND	ND	0,13	0,15	ND
cis-beta-farneseno	20,87	0,88	3,58	12,20	15,74	21,97	2,86
humuleno	20,94	0,46	ND	ND	0,19	0,36	ND
gamma-muuroloeno	21,04	ND	ND	ND	ND	ND	ND
biciclogermaceno	21,10	0,39	ND	ND	0,19	0,90	ND
beta-bisaboleno	21,15	0,08	ND	ND	ND	ND	ND
2,4-di-terc-butilfenol	21,25	0,19	ND	ND	0,50	ND	ND
gamma-cadineno	21,31	0,04	ND	ND	0,55	1,41	0,09
biformeno	21,89	0,06	ND	ND	ND	1,56	0,19
beta-tujeno	22,00	0,14	ND	ND	ND	ND	ND
alfa-pineno	22,03	0,05	ND	ND	0,22	ND	ND
canfeno	22,22	0,04	ND	ND	ND	0,27	ND
beta-pineno	27,55	0,05	ND	ND	ND	ND	ND

Por último, en la Tabla 8 se observa que los tratamientos con 9 g/l de CA aumentan el porcentaje de PA de un número mayor de compuestos, siendo estos beta-mirceno, alfa-terpineno, beta-cimeno, D-limoneno, linalol, (-)-canfor y timoquinón.

4.3.2 Micro-Extracción en Fase Sólida (SPME)

De los compuestos identificados, 16 se cuantificaron en extractos de metanos mediante SPME-GC/MS. En estos experimentos, el carvacrol, gamma-terpineno y beta-cariofileno fueron los más abundantes (con concentraciones superiores a 100 µg/g); otros compuestos como alfa-terpineno, p-cimeno y humuleno presentaron mayores concentraciones que el control, pero con concentraciones inferiores a 100 µg/g; mientras que el resto de los componentes no fueron detectados o se presentaron en menor cantidad que el resto, siendo aun así valores superiores a las plantas control (Tablas 9, 10, 11 y 12).

Tabla 9. Contenido (µg/g) en terpenos de los extractos metanólicos de las plantas obtenidas del control y de los tratamientos de cultivo *in vitro* de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez en doble fase correspondientes a 0 g/l de CA y concentraciones crecientes de sacarosa, analizados por SPME-GC/MS. Los datos se presentan como medias ± SD. TR, tiempo de retención. LQ, límite de cuantificación.

Componentes	TR (min)	Control (µg/g)	0/0 (µg/g)	0/15 (µg/g)	0/30 (µg/g)	0/45 (µg/g)	0/60 (µg/g)
alfa-pineno	7,79	< LQ	7,38 ± 0,64 a	2,97 ± 0,59 cd	1,09 ± 0,39 ghij	3,74 ± 0,82 c	2,77 ± 0,32 cde
canfeno	8,51	< LQ	8,91 ± 0,16 a	0,66 ± 0,33 de	0,06 ± 0,03 e	2,76 ± 2,05 cde	3,21 ± 0,87 bcd
beta-pineno	9,52	ND	2,06 ± 1,03 b	0,43 ± 0,1 cde	0,67 ± 0,33 cd	0,66 ± 0,32 cde	0,88 ± 0,17 cd
alfa-terpineno	10,97	7,53 ± 0,71 hijk	11,79 ± 3,82 defg	15,27 ± 0,11 c	9,15 ± 2,12 fghi	15,17 ± 1,79 c	10,65 ± 0,92 defg
p-cimeno	11,24	12,11 ± 0,95	24,84 ± 6,1	20,05 ± 0,09	16,69 ± 2,57	25,86 ± 2,95	14,80 ± 1,02
D-limoneno	11,39	< LQ	0,85 ± 0,76	0,71 ± 0,58	1,44 ± 0,72	1,44 ± 0,6	0,92 ± 0,01
gamma-terpineno	12,50	98,74 ± 5,91	135,19 ± 39,7	159,22 ± 1,02	96,96 ± 17,81	156,52 ± 15,77	112,30 ± 8,54
terpinoleno	13,46	0,18 ± 0,01	0,77 ± 0,25	0,63 ± 0,03	0,36 ± 0,08	1,00 ± 0,03	0,56 ± 0,05
(-)-canfor	15,16	ND	ND	ND	ND	< LQ	< LQ

endo-borneol	15,84	ND	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
terpinen-4-ol	16,16	ND	ND	ND	ND	20,14 ± 6,06	ND
metilcarvacrol	16,64	ND	ND	ND	ND	ND	ND
carvacrol	18,97	622,89 ± 75,94	1163,87 ± 104,09	1438,16 ± 197,62	804,30 ± 32,2	1460,44 ± 317,77	763,58 ± 22,98
acetato de carvacrol	20,06	ND	ND	ND	ND	ND	ND
beta-cariofileno	20,80	47,17 ± 4,6	91,48 ± 16,07	125,81 ± 8,49	71,90 ± 4,65	180,13 ± 16,09	80,65 ± 3,92
humuleno	21,31	4,29 ± 0,32	9,42 ± 1,34	12,14 ± 1,3	6,84 ± 0,05	15,67 ± 0,61	7,19 ± 0,03

Tabla 10. Contenido ($\mu\text{g/g}$) en terpenos de los extractos metanólicos de las plantas obtenidas del control y de los tratamientos de cultivo *in vitro* de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez en doble fase correspondientes a 3 g/l de CA y concentraciones crecientes de sacarosa, analizados por SPME-GC/MS. Los datos se presentan como medias \pm SD. TR, tiempo de retención. LQ, límite de cuantificación.

Componentes	TR (min)	Control ($\mu\text{g/g}$)	3/0 ($\mu\text{g/g}$)	3/15 ($\mu\text{g/g}$)	3/30 ($\mu\text{g/g}$)	3/45 ($\mu\text{g/g}$)	3/60 ($\mu\text{g/g}$)
alfa-pineno	7,79	< LQ	3,14 \pm 0,23 cd	5,41 \pm 0,79 b	4,89 \pm 0,92 b	5,56 \pm 0,01 b	5,44 \pm 0,29 b
canfeno	8,51	< LQ	1,96 \pm 0,07 cde	2,28 \pm 0,47 cde	4,55 \pm 1,10 bc	4,28 \pm 0,58 bc	2,60 \pm 0,04 cde
beta-pineno	9,52	ND	0,86 \pm 0,04 cd	2,05 \pm 0,53 b	2,65 \pm 1,03 b	3,43 \pm 1,07 a	2,17 \pm 0,02 b
alfa-terpineno	10,97	7,53 \pm 0,71 hijk	10,21 \pm 0,21 efgh	13,48 \pm 1,95 cd	12,60 \pm 0,29 cde	23,35 \pm 3,37 b	26,55 \pm 0,42 a
p-cimeno	11,24	12,11 \pm 0,95	22,91 \pm 0,12	26,68 \pm 3,15	22,27 \pm 0,97	25,94 \pm 4,11	39,34 \pm 0,73
D-limoneno	11,39	< LQ	0,72 \pm 0,12	2,15 \pm 0,13	1,25 \pm 0,04	2,09 \pm 0,38	2,65 \pm 0,42
gamma-terpineno	12,50	98,74 \pm 5,91	103,93 \pm 1,38	127,59 \pm 16,30	139,08 \pm 8,06	230,66 \pm 32,95	275,59 \pm 4,64
terpinoleno	13,46	0,18 \pm 0,01	0,66 \pm 0,06	0,82 \pm 0,12	0,95 \pm 0,01	1,04 \pm 0,23	1,09 \pm 0,05
(-)-canfor	15,16	ND	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
endo-borneol	15,84	ND	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
terpinen-4-ol	16,16	ND	ND	ND	ND	ND	ND
metilcarvacrol	16,64	ND	848,00 \pm 25,39	524,89 \pm 35,48	508,30 \pm 22,32	306,49 \pm 14,23	486,93 \pm 7,80
carvacrol	18,97	622,89 \pm 75,94	1068,03 \pm 156,12	1228,50 \pm 104,74	1194,23 \pm 340,89	1648,77 \pm 444,86	1330,28 \pm 99,13
acetato de carvacrol	20,06	ND	319,21 \pm 4,67	232,58 \pm 6,20	297,12 \pm 13,47	ND	ND
beta-cariofileno	20,80	47,17 \pm 4,6	89,14 \pm 3,33	151,81 \pm 15,46	100,75 \pm 12,43	171,98 \pm 33,19	175,66 \pm 7,21
humuleno	21,31	4,29 \pm 0,32	7,76 \pm 0,53	11,55 \pm 1,63	8,02 \pm 1,21	10,47 \pm 0,71	14,82 \pm 0,56

Tabla 11. Contenido ($\mu\text{g/g}$) en terpenos de los extractos metanólicos de las plantas obtenidas del control y de los tratamientos de cultivo *in vitro* de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez en doble fase correspondientes a 6 g/l de CA y concentraciones crecientes de sacarosa, analizados por SPME-GC/MS. Los datos se presentan como medias \pm SD. TR, tiempo de retención. LQ, límite de cuantificación.

Componentes	TR (min)	Control ($\mu\text{g/g}$)	6/0 ($\mu\text{g/g}$)	6/15 ($\mu\text{g/g}$)	6/30 ($\mu\text{g/g}$)	6/45 ($\mu\text{g/g}$)	6/60 ($\mu\text{g/g}$)
alfa-pineno	7,79	< LQ	0,78 \pm 0,04 hijk	< LQ	1,75 \pm 0,88 efgh	< LQ	0,53 \pm 0,05 ijk
canfeno	8,51	< LQ	< LQ	< LQ	1,04 \pm 0,52 de	1,79 \pm 0,00 cde	1,79 \pm 0,13 cde
beta-pineno	9,52	ND	< LQ	< LQ	0,58 \pm 0,29 cde	< LQ	< LQ
alfa-terpineno	10,97	7,53 \pm 0,71 hijk	5,11 \pm 0,25 jkl	4,93 \pm 1,10 jklm	6,97 \pm 3,01 ijk	4,88 \pm 0,96 jklm	6,27 \pm 0,05 ijk
p-cimeno	11,24	12,11 \pm 0,95	15,78 \pm 0,17	17,82 \pm 0,49	16,22 \pm 5,00	13,04 \pm 1,70	12,53 \pm 0,93
D-limoneno	11,39	< LQ	0,53 \pm 0,18	< LQ	0,52 \pm 0,07	< LQ	0,37 \pm 0,02
gamma-terpineno	12,50	98,74 \pm 5,91	51,54 \pm 0,26	56,24 \pm 11,31	70,99 \pm 23,79	55,24 \pm 9,49	70,29 \pm 4,78
terpinoleno	13,46	0,18 \pm 0,01	0,23 \pm 0,00	0,31 \pm 0,00	0,38 \pm 0,18	0,18 \pm 0,03	0,37 \pm 0,02
(-)-canfor	15,16	ND	< LQ	< LQ	< LQ	ND	< LQ
endo-borneol	15,84	ND	< LQ	< LQ	< LQ	ND	< LQ
terpinen-4-ol	16,16	ND	ND	ND	ND	ND	ND
metilcarvacrol	16,64	ND	547,81 \pm 12,85	437,09 \pm 17,48	351,96 \pm 22,19	397,28 \pm 26,16	406,80 \pm 0,97
carvacrol	18,97	622,89 \pm 75,94	310,63 \pm 1,37	366,85 \pm 58,82	608,55 \pm 36,69	425,85 \pm 38,23	476,57 \pm 70,32
acetato de carvacrol	20,06	ND	ND	ND	ND	ND	ND
beta-cariofileno	20,80	47,17 \pm 4,6	62,09 \pm 0,24	< LQ	45,77 \pm 11,98	52,24 \pm 6,47	48,85 \pm 1,48
humuleno	21,31	4,29 \pm 0,32	5,81 \pm 0,23	0,25 \pm 0,02	4,40 \pm 0,68	3,99 \pm 0,78	4,94 \pm 0,30

Tabla 12. Contenido ($\mu\text{g/g}$) en terpenos de los extractos metanólicos de las plantas obtenidas del control y de los tratamientos de cultivo *in vitro* de *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R.Morales, G.López & Sánchez-Gómez en doble fase correspondientes a 3 g/l de CA y concentraciones crecientes de sacarosa, analizados por SPME-GC/MS. Los datos se presentan como medias \pm SD. TR, tiempo de retención. LQ, límite de cuantificación.

Componentes	TR (min)	Control ($\mu\text{g/g}$)	9/0 ($\mu\text{g/g}$)	9/15 ($\mu\text{g/g}$)	9/30 ($\mu\text{g/g}$)	9/45 ($\mu\text{g/g}$)	9/60 ($\mu\text{g/g}$)
alfa-pineno	7,79	< LQ	< LQ	1,86 \pm 0,06 efg	< LQ	< LQ	< LQ
canfeno	8,51	< LQ	< LQ	1,81 \pm 0,41 cde	< LQ	< LQ	< LQ
beta-pineno	9,52	ND	< LQ	0,37 \pm 0,12 de	< LQ	< LQ	< LQ
alfa-terpineno	10,97	7,53 \pm 0,71 hijk	4,63 \pm 0,74 klmn	7,60 \pm 0,30 hij	9,06 \pm 0,14 ghi	1,91 \pm 0,09 no	6,07 \pm 1,41 jk
p-cimeno	11,24	12,11 \pm 0,95	13,60 \pm 0,90	21,47 \pm 0,68	20,87 \pm 0,24	10,65 \pm 0,49	15,30 \pm 2,69
D-limoneno	11,39	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,22 \pm 0,11
gamma-terpineno	12,50	98,74 \pm 5,91	50,46 \pm 4,74	75,80 \pm 2,22	84,50 \pm 2,03	20,35 \pm 0,60	58,98 \pm 8,62
terpinoleno	13,46	0,18 \pm 0,01	0,14 \pm 0,06	0,44 \pm 0,02	0,27 \pm 0,02	0,08 \pm 0,02	0,59 \pm 0,30
(-)-canfor	15,16	ND	ND	< LQ	< LQ	< LQ	ND
endo-borneol	15,84	ND	ND	ND	ND	ND	ND
terpinen-4-ol	16,16	ND	ND	ND	ND	ND	ND
metilcarvacrol	16,64	ND	456,11 \pm 69,19	402,79 \pm 2,44	608,36 \pm 1,57	488,80 \pm 0,51	431,69 \pm 27,24
carvacrol	18,97	622,89 \pm 75,94	ND	ND	ND	ND	558,84 \pm 68,31
acetato de carvacrol	20,06	ND	ND	ND	ND	ND	ND
beta-cariofileno	20,80	47,17 \pm 4,6	47,85 \pm 1,58	69,89 \pm 1,46	52,03 \pm 0,34	30,63 \pm 1,07	43,91 \pm 4,38
humuleno	21,31	4,29 \pm 0,32	4,86 \pm 0,48	6,69 \pm 0,23	4,31 \pm 0,46	3,60 \pm 0,01	4,24 \pm 0,30

5. Discusión

5.1 Técnica de cultivo en doble fase

Una micropropagación eficiente depende de la rapidez, extensión y uniformidad de la proliferación de los brotes. El crecimiento y la multiplicación bajo condiciones *in vitro* depende de un número de factores, entre los cuales, uno de los factores que contribuye con el desarrollo es el tipo y la concentración de la fuente de carbono suministrada de manera exógena en el medio. Muchos de los cultivos utilizan eficientemente sacarosa como la fuente de carbono para el desarrollo *in vitro* de brotes como el carbohidrato sintetizado más común y transportado en el floema de muchas plantas (Yaseen et al., 2013).

Ćosić et al. (2021), Piqueras et al. (1998) y Yaseen et al. (2013), entre otros, demuestran que los azúcares muestran funciones como moléculas señalizadoras cuyas rutas de transducción afectan al metabolismo y proceso de desarrollo en plantas, potencial de interacción con hormonas de regulación y al mantenimiento de la regulación estricta a nivel de transcripción, postranscripción y postraducción. Los azúcares pueden influir en la activación de las rutas por fitohormonas a través de alternar la expresión y actividad de componentes de esas rutas.

Los niveles de azúcar, puesto que influyen en el desarrollo de la planta, glucosa y sacarosa, están involucradas en la regulación de la división y expansión celular, así como en la acumulación de carbohidratos de reserva. Estos impactos son logrados debido al hecho de que los azúcares actúan como moléculas de señalización y pueden regular la expresión de varios genes (Ćosić et al., 2021).

La fuente de carbono más usada es la sacarosa, la cual además de ser una fuente de carbono, juega un papel significativo como regulador osmótico pudiendo modificar la fuerza osmótica del medio en función de la concentración de carbohidratos y la alta concentración de la fuerza osmótica está relacionada con una reducción en el crecimiento de la planta y su multiplicación (Ćosić et al., 2021; Piqueras et al., 1998). La concentración óptima de la fuente de carbono no solo depende de la especie de la planta, también de los diferentes genotipos y variedades.

Las diferentes concentraciones de los constituyentes del medio nutritivo afectan a la morfogénesis y al crecimiento de las células vegetales cultivadas, tejidos y órganos parcialmente debido a su valor nutricional (Ćosić et al., 2021).

En nuestro caso, la elongación del explante (Figura 6) y el número de nodos (Figura 7) fue aumentando a medida que también lo hacía la concentración de sacarosa; en cambio el número de tallos (Figura 8) disminuía; y la presencia o ausencia de raíces y la tasa de multiplicación (Figura 9) no se vieron afectados. Comparando ambos controles (un control sin medio líquido y otro con medio líquido sin CA ni sacarosa) no se observó mejora significativa respecto al control con el uso del sistema de doble capa en el caso de la elongación del explante y el número de nodos, aunque posteriormente al añadir los diferentes componentes a la fase líquida, sí se observaron mejoras, resultando ser la concentración de 3 g/l de CA y 45 g/l de sacarosa la que mejor resultados obtuvo para las variables elongación del explante, número de nodos y tasa de multiplicación; además de la concentración 0 g/l de CA y 45 g/l de sacarosa dando los mejores resultados en todas las variables (Tabla 3). También cabe destacar la concentración de 0 g/l de CA y 60 g/l de sacarosa que también dio mejoras significativas respecto al control en las variables elongación del explante y número de nodos.

Por otro lado, parece que el suplemento de sacarosa puede ayudar a aumentar el nivel de antioxidantes no enzimáticos y puede justificar el gran efecto de protección de este tratamiento contra la hiperhidricidad y vitrificación (Piqueras et al., 1998), ya que se tienen valores inferiores al 3,5% de individuos con signos de estas alteraciones morfológicas en el presente Trabajo Fin de Grado.

Por todo ello, el uso del medio líquido en el sistema en doble fase permite, muy probablemente, una mejor disponibilidad de nutrientes para los explantes, penetrando en la capa semisólida y envolviendo directamente los tejidos mientras que el CA puede jugar un papel importante en la eliminación de sustancias inhibitorias del crecimiento (Cano-Castillo et al., 2009).

5.2 Técnica de cultivo en medio líquido agitado

En el presente estudio, el sistema de cultivo en medio líquido ha mostrado valores de desarrollo vegetal poco satisfactorios (con menores tasas de multiplicación), junto a una mayor aparición de desórdenes morfológicos y fisiológicos. El resultado más destacable ha sido la elongación del tallo con el tratamiento basado en la adición combinada de BAP y GA3 (Tabla 4), posiblemente debido a que las funciones de estos reguladores son promover la elongación del explante mediante un aumento en la división celular afectan al aumento del número de nodos mediante el crecimiento y la división celular (Polat & Eskimez, 2022).

A la luz de los resultados obtenidos, parece que este sistema de cultivo genera una baja resistencia a la difusión de gases, por lo que pudo haber existido una mínima interrupción de intercambio de gases entre los segmentos nodales y la atmósfera interna del recipiente de cultivo. Al ser un sistema de inmersión sin renovación, podría ocurrir que no se renueve completamente la atmósfera interna, dando lugar a un efecto negativo en el balance de gases como oxígeno y dióxido de carbono, y favoreciendo la acumulación de gases nocivos como el etileno en el interior del recipiente de cultivo, impidiendo así el crecimiento correcto de los brotes. Ross y Castillo (2010) demostraron que la aireación es uno de los factores más importantes, siendo determinante en el comportamiento de distintas especies respecto a la aparición de trastornos de hiperhidricidad (Ross & Castillo, 2009). Tascan et al., (2007) observaron que el medio líquido en agitación puede aportar más oxígeno y sacarosa comparado con el medio líquido estático y el medio semisólido con agar, además de que los explantes obtenían mayor biomasa en fresco. Sin embargo, la biomasa es menor en seco debido a la hiperhidratación de los tejidos cultivados en estas condiciones, liberando exudados relacionados con el estrés y aportando un color bronceado al medio de cultivo, como se ha observado en el presente Trabajo Fin de Grado.

Aun siendo una técnica que no da buenos resultados debido a las alteraciones morfológicas y tasas de multiplicación, tiene una gran ventaja y es que permite reducir los costos de producción al no utilizar agentes gelificantes tradicionalmente usados. También es posible disminuir la manipulación del material vegetal, reducir el número de frascos de cultivo, así como una menor utilización del espacio en las cámaras de crecimiento (Cabrera et al., 2008), por lo que es una buena técnica en función del objetivo buscado, ya que en otros casos sí se obtuvieron buenos resultados respecto a la elongación del explante llegando a duplicar los nodos de la plántula, independientemente del volumen utilizado, en nuestro caso 50 ml (Sandal et al., 2001).

5.3 Extracción y análisis químico

Los análisis químicos realizados por HS-SPME-GC/MS permitieron identificar 32 compuestos volátiles en las muestras de *S. intricata* cultivadas *in vitro*. De acuerdo con esta técnica, los compuestos mayoritarios, en orden descendente, fueron: carvacrol, beta-cariofileno, gamma-terpineno y linalool, donde el carvacrol corresponde al 73,40 %PA de los volátiles en todas las muestras analizadas, mientras que los otros compuestos constituyen entre el 5,26 y el 9,62 %PA. Los análisis SPME-GC/MS de los extractos, y la cuantificación de terpenos, confirmó la mayoría de los resultados

cualitativos sobre volátiles obtenidos en las medidas directas realizadas por HS-SPME-GC/MS. Combinar las dos técnicas ha permitido comprender mejor la composición volátil de los extractos de las plantas, ya que ambos métodos han revelado que el carvacrol es el componente principal, alcanzando valores de hasta $1648,77 \pm 444,86 \mu\text{g/g}$ (Tablas 9, 10, 11 y 12).

García-Rellán et al. (2015) estudiaron la composición química de los aceites esenciales en diferentes especies de *Satureja* mediante GC y GC/MS, y encontrando 72 compuestos, de los cuales los mayoritarios coinciden con los resultados obtenidos en el presente trabajo, siendo estos el carvacrol y el gamma-terpineno. A excepción del timol, compuesto también mayoritario en *Satureja*, el cual no es identificado en ninguno de los tratamientos, incluso en la planta control, pudiendo ser este compuesto más común en *S. montana*, en el cual constituye casi la mitad del total de los aceites esenciales sintetizados (Radonic & Milos, 2002).

Los mejores resultados obtenidos en las concentraciones de los diferentes compuestos de aceites esenciales, en la mayoría, corresponden a los tratamientos compuestos por 0 g/l de CA y 45 g/l de sacarosa, 3 g/l de CA y 45 g/l de sacarosa, 3 g/l de CA y 60 g/l de sacarosa que, como vimos en el apartado 5.1 también eran las concentraciones que mejor resultados generaron en las variables morfológicas de la planta, pudiendo conllevar a concentraciones de sacarosa óptimas para el crecimiento y desarrollo de la planta, además del CA que impulse esa bioestimulación.

Cabe destacar los compuestos tetradecano y dodecano, 2,6,11-trimetil, ya que estos no se habían identificado anteriormente ni existen estudios recientes de estos compuestos en otras especies de *Satureja* y han sido detectados mediante HS-SPME-GC/MS (valores entre 0,10 y 0,30 %PA). Estos aparecen con la presencia de las diferentes concentraciones de CA, además de verse afectado por la concentración de sacarosa, siendo mayor el %PA cuanto mayor concentración de sacarosa está presente en el medio, por lo que podría significar que el CA estimula la síntesis de estos compuestos, aunque en poca medida.

6. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas basadas en los resultados de este estudio con las diferentes técnicas de cultivo *in vitro* utilizadas, son las siguientes:

- En la técnica de cultivo en doble fase se obtuvo los mejores resultados en las variables elongación de explante, número de nodos y tasa de multiplicación con el tratamiento compuesto por 3 g/l de CA y 45 g/l de sacarosa; también el tratamiento compuesto por 0 g/l de CA y 45 g/l de sacarosa dio muy buenos resultados en todas las variables medidas; incluso, el tratamiento compuesto por 0 g/l de CA y 60 g/l de sacarosa, destacando en las variables elongación del explante y el número de nodos.
- En el caso de la técnica de cultivo *in vitro* en medio líquido agitado, no se obtuvieron resultados satisfactorios debido a la presencia de contaminación en todas las réplicas y tratamientos, además de una alta tasa de alteraciones fisiológicas (hiperhidricidad).
- Respecto al análisis químico de los compuestos volátiles procedentes de las muestras de la técnica de cultivo en doble fase, se observaron aumentos significativos en carvacrol, beta-cariofileno, gamma-terpineno y linalool, en todos los tratamientos respecto del control, con un aumento de forma prácticamente lineal al aumento en la concentración de sacarosa.

7. Bibliografía

- Arrebola, M., Socorro, O., Barceló-Muñoz, A., Simón-Pérez, E., & Pliego-Alfaro, F. (1997). Micropropagation of *Satureja obovata* Lag. *Hortscience*, 32(7), 1278-1280. <https://doi.org/10.21273/hortsci.32.7.1278>
- Asensio, E. P., De Medinacelli Juan-Méndez, R., & Juan-Vicedo, J. (2022). In Vitro Propagation and Phytochemistry of Thymol-Producing Plants from a Horticultural Form of *Thymus × josephi-angeli* Mansanet & Aguil. (Lamiaceae). *Horticulturae*, 8(12), 1188. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8121188>
- Bakro, F., Jędrzycka, M., Wielgusz, K., Sgorbini, B., Inchingolo, R., & Cardenia, V. (2020). Simultaneous determination of terpenes and cannabidiol in hemp (*Cannabis sativa* L.) by fast gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Separation Science*, 43(14), 2817-2826. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900822>
- Bektaş, E. (2020). Changes in essential oil composition, phenylalanine ammonia lyase gene expression and rosmarinic acid content during shoot organogenesis in cytokinin-treated *Satureja spicigera* (C. Koch) boiss. shoots. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s13562-020-00552-1>
- Bezić, N., Šamanić, I., Dunkić, V., Besendorfer, V., & Puizina, J. (2009). Essential Oil Composition and Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequence Variability of Four South-Croatian *Satureja* Species (Lamiaceae). *Molecules*, 14(3), 925-938. <https://doi.org/10.3390/molecules14030925>
- Boscherini, G., & Michelozzi, M. (1993). Capillary Gas Chromatography of the Terpene Components of *Picea abies* K.
- Cabrera Jova, Manuel, Gómez Kosky, Rafael, Rodríguez Morales, Sergio, López Torres, Jorge, Rayas Cabrera, Aymé, Basail Pérez, Milagros, Santos Pino, Arletys,

- Medero Vega, Víctor, & Rodríguez Rodríguez, Germán. (2008). Multiplicación in vitro de segmentos nodales del clon de ñame Blanco de Guinea (*Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata*) en sistemas de cultivo semiautomatizado. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 97-103. Retrieved June 29, 2023, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752008000200011&lng=en&tlng=es.
- Cano-Castillo, M., Serrano-Martínez, F., & Casas, J. L. (2009). In Vitro Propagation of *Astragalus nitidiflorus* (Leguminosae), an Endemic and Endangered Species from South-East of Spain.
- Castillo, A. (s. f.). Propagación de plantas por cultivo in vitro una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. inia.uy. Recuperado 3 de junio de 2023, de <http://inia.uy/en/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>
- Chorianopoulos, N., Evergetis, E., Mallouchos, A., Kalpoutzakis, E., Nychas, G. J., & Haroutounian, S. A. (2006). Characterization of the essential oil volatiles of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica*: Influence of harvesting time and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 3139-3145. <https://doi.org/10.1021/jf053183n>
- Cioloaca, M., Tican, A., Bădărău, C., Bărăscu, N., & Popa, M. (2022). In vitro Medium TerConservation of Sweet Potato Genotypes Using Mannitol and Sorbitol. *Romanian Agricultural Research*, 38, 123-132. <https://doi.org/10.59665/rar3813>
- Ćosić, T., Motyka, V., Savić, J., Raspor, M., Marković, M., Dobrev, P. I., & Ninković, S. (2021). Sucrose interferes with endogenous cytokinin homeostasis and expression of organogenesis-related genes during de novo shoot organogenesis in kohlrabi. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85932-w>

- De Oliveira, S. O. D., Sayd, R. M., Balzon, T. A., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2013). A new procedure for in vitro propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. *Scientia Horticulturae*, 161, 204-209. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.039>
- Díaz-Álvarez, M., Turiel, E., & Martín-Esteban, A. (2018). EMPLEO DE POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR (MIPs) EN TÉCNICAS DE MICRO-EXTRACCIÓN.
- Ekiert, H., Kokotkiewicz, A., Marzec-Wróblewska, U., Buciński, A., & Luczkiewicz, M. (2015). Accumulation of dibenzocyclooctadiene lignans in agar cultures and in stationary and agitated liquid cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9), 3965-3977. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7230-9>
- García-Rellán, D., Blázquez, M. A., & Boira, H. (2015). Differential essential oil composition and morphology between perennial *Satureja* species growing in Spain. *Records of Natural Products*, 9(4), 623.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (1996). Review PLANT HORMONES AND PLANT GROWTH REGULATORS IN PLANT TISSUE CULTURE. En *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* (Vol. 32).
- Gutiérrez, M. C., Droguet, M., Carmen, M., Bouzán, G., & En Química, D. (2002). LA CROMATOGRFÍA DE GASES Y LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS: IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CAUSANTES DE MAL OLOR. En *No* (Vol. 122).
- Hicklenton, P. R. (1991). GA3 and Benzylaminopurine Delay Leaf Yellowing in Cut *Alstroemeria* Stems. *Hortscience*, 26(9), 1198-1199. <https://doi.org/10.21273/hortsci.26.9.1198>

Juan-Vicedo, J., Pavlov, A., Ríos, S., & Casas, J. S. (2019). In vitro culture and micropropagation of the Baetic-Moroccan endemic plant *Lapiedra martinezii* Lag. (Amaryllidaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10031-5>

Juan-Vicedo, J., Serrano-Martínez, F., Cano-Castillo, M., & Casas, J. S. (2022). In Vitro Propagation, Genetic Assessment, and Medium-Term Conservation of the Coastal Endangered Species *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Cupressaceae) from Adult Trees. *Plants*, 11(2), 187. <https://doi.org/10.3390/plants11020187>

Kadota, M., Imizu, K., & Hirano, T. (2001). Double-phase in vitro culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. *Scientia Horticulturae*, 89(3), 207-215. [https://doi.org/10.1016/s0304-4238\(00\)00234-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4238(00)00234-x)

Kaviani, B., & Bahari, B. (2019b). In vitro proliferation and ex vitro rooting of microshoots of *lisianthus* using auxin and cytokinin on the solid, liquid and double-phase culture systems. *Acta Scientiarum Polonorum-hortorum Cultus*. <https://doi.org/10.24326/asphc.2019.4.5>

Khalilsaraie, M. F., Meti, N. T., & Karibasappa, G. (2015). EFFECT OF DIFFERENT CYTOKININS AND ACTIVATED CHARCOAL FOR THE SHOOT MULTIPLICATION IN *VITIS VINIFERA* L. «THOMPSON SEEDLESS». *Acta horticulturae*. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2015.1083.50>

Kikowska, M., Chanaj-Kaczmarek, J., Derda, M., Budzianowska, A., Thiem, B., & Ekiert, H. (2022). The Evaluation of Phenolic Acids and Flavonoids Content and Antiprotozoal Activity of *Eryngium* Species Biomass Produced by Biotechnological Methods. *Molecules*, 27(2), 363. <https://doi.org/10.3390/molecules27020363>

Isabel Soto Ros

Kulus, D., & Tymoszuk, A. (2020). Induction of callogenesis, organogenesis, and embryogenesis in non-meristematic explants of bleeding heart and evaluation of chemical diversity of key metabolites from callus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 1-18. <https://doi.org/10.3390/ijms21165826>

Llorente, B. E. (2002). CULTIVO IN VITRO 4.1. CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES: GENERALIDADES.

Lopez D., C. M., & Suarez P., I. E. (2018). In vitro arrow cane (*Gynerium sagittatum* Aubl.) multiplication in double phase medium. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 35(2), 5-13. <https://doi.org/10.22267/rcia.183502.86>

López González, G. (1980). Satureja L - Flora Iberica. floraiberica.es. Recuperado 25 de abril de 2023, de http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/borradores/vol_XII/12_140_23_Satureja.pdf

Maene, L. J., & Debergh, P. (1985). Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting in vivo. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 5(1), 23-33. <https://doi.org/10.1007/bf00033566>

Marco-Medina, A., & Casas, J. S. (2014). In vitro multiplication and essential oil composition of *Thymus moroderi* Pau ex Martinez, an endemic Spanish plant. *SPRINGER LINK*, 120(1), 99-108. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0583-4>

Moraes, L. M., Faria, R. M., & Cuquel, F. L. (2005). ACTIVATED CHARCOAL FOR IN VITRO PROPAGATION OF BRAZILIAN ORCHIDS. *Acta horticulturae*, 683, 383-390. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2005.683.50>

Niubó, E., Díaz, P., Oliva, O., Portieles, R., Díaz, A., Ancheta, O., Rodríguez, S., Soto, A., & Sánchez, C. (2004). Metodología para la obtención in vitro de plantas y

- tejidos de la caña de azúcar libres de contaminantes exófitos y endófitos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 35(3), 155-161.
- Pan, M. J., & Van Staden, J. (1998). The use of charcoal in in vitro culture-A review. En *Plant Growth Regulation* (Vol. 26).
- Peñaranda, J. M., de Castro, C. O., & MADRA, M. (2012) Etnobotánica, contribución al Desarrollo Sostenible de una zona rural. Ejemplo de aplicación en Casasimarro (Cuenca) y pueblos de alrededor.
- Piqueras, A., Han, B. H., Van Huylbroeck, J. M., & Debergh, P. C. (1998). Effect of different environmental conditions in vitro on sucrose metabolism and antioxidant enzymatic activities in cultured shoots of *Nicotiana tabacum* L. En *Plant Growth Regulation* (Vol. 25, Número 5).
- Pirbalouti, A. G., Neshat, S. H., Rahimi, E., Hamed, B., & Malekpoor, F. (2014). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of Iranian Herbs Against *Staphylococcus Aureus* Isolated from Milk. *International Journal of Food Properties*, 17(9), 2063-2071. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.741175>
- Pullman, G. S., & Skryabina, A. (2007). Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Reports*, 26(7), 873-887. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0296-1>
- Radonić, A., & Miloš, M. (2003). Chemical Composition and In Vitro Evaluation of Antioxidant Effect of Free Volatile Compounds From *Satureja montana* L. *Free Radical Research*, 37(6), 673-679. <https://doi.org/10.1080/1071576031000105643>
- Rodriguez, R., Díaz-Sala, C., Cuozzo, L., & Ancora, G. (1991). Pear in Vitro Propagation Using a Double-phase Culture System. *Hortscience*, 26(1), 62-64. <https://doi.org/10.21273/hortsci.26.1.62>

- Rodríguez-Maecker, R., Vyhmeister, E., Meisen, S., Rosales Martinez, A., Kuklya, A., & Telgheder, U. (2017). Identification of terpenes and essential oils by means of static headspace gas chromatography-ion mobility spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(28), 6595-6603. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0613-2>
- Ross, Silvia, & Castillo, Alicia. (2010). Micropropagación de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. en medios de cultivo líquidos. *Agrociencia (Uruguay)*, 14(1), 1-7. Recuperado en 29 de junio de 2023, de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482010000100001&lng=es&tlng=es.
- Sandal, I., Bhattacharya, A., & Ahuja, P. S. (2001). An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation. *SPRINGER LINK*, 65(1), 75-80. <https://doi.org/10.1023/a:1010662306067>
- Scherwinski-Pereira, J. E., Da C Araruna Lima, E., Da Silva, T. F., Mesquita, A. G. G., De Alencar Maciel, S., & Da Silva Costa, F. H. (2011). Double-phase culture system for large scale production of pineapple. *SPRINGER LINK*, 109(2), 263-269. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0091-8>
- Senapati, S. (2015). A Double Phase Culture System: An Economic and Time Saving Protocol for in vitro Propagation of Plant. *Scholarena journal of biotechnology*. <https://doi.org/10.18875/2375-6713.1.301>
- Sithersingh, M., & Snow, N. H. (2021). Headspace gas chromatography. En *Elsevier eBooks* (pp. 251-265). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820675-1.00012-5>

- SK, S. (2015). A Double Phase Culture System: An Economic and Time Saving Protocol for in vitro Propagation of Plant. *Scholarena Journal of Biotechnology*, 1(3). <https://doi.org/10.18875/2375-6713.1.301>
- Polo, L. A. L. A. T. P. T. (2019). Informe 1 Cultivo de tejidos - INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS. unisucre. https://www.academia.edu/40263061/Informe_1_Cultivo_de_tejidos_INTRODUCCI%C3%93N_AL_LABORATORIO_DE_CULTIVO_DE_TEJIDOS
- Tascan, A., Adelberg, J., Tascan, M., Joshee, N., & Yadav, A. K. (2007). LIQUID CULTURE SYSTEM FOR SCUTELLARIA SPECIES. *Acta horticulturae*, 756, 163-170. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2007.756.18>
- Venegas-Martínez, F., Castillo, M., & Medina, A. M. B. (2011). El medio en doble fase y su aplicación en el cultivo in vitro de plantas amenazadas. *Cuadernos de biodiversidad*, 37, 3-8. <https://doi.org/10.14198/cdbio.2011.37.01>
- Wilson, H. L., Eisa, M. Z., & Irwin, S. W. B. (1976c). The Effects of Agitated Liquid Medium on in vitro Cultures of *Hevea brasiliensis*. *Physiologia Plantarum*, 36(4), 399-402. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1976.tb02264.x>
- Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., & Hafiz, I. A. (2013). Review: Role of carbon sources for in vitro plant growth and development. En *Molecular Biology Reports* (Vol. 40, Número 4, pp. 2837-2849). <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2299-z>
- Yesiloglu, Y., Sıt, L., & Kılıc, I. H. (2013). in vitro Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Various Extracts of *Satureja hortensis* L. Collected from Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 25(15), 8311-8316. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2013.14731>