



**Universidad  
de La Laguna**

**Trabajo fin de grado**

**Optimización de la germinación en *Hypericum perforatum*, con el fin de su uso en estudios de elicitación para aumentar las concentraciones de metabolitos con interés farmacológico**

**Senia Mohamed Fadel**

**5º Grado en Farmacia**

**Curso 2018-2019**

**Tutores:**

**Dr. Francisco Valdés González**

**Dr. David Jiménez Arias**

**Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal**

**Área de Fisiología Vegetal**



# Índice

Abstract .....	1
Resumen.....	2
Introducción .....	3
Objetivos .....	4
Material y métodos .....	5
Revisión bibliográfica .....	5
Material vegetal .....	5
Desarrollo experimental.....	6
Resultados y discusión .....	9
Ensayo 1 .....	9
Ensayo 2 .....	10
Ensayo 3 .....	12
Problemas en la realización del estudio.....	13
Conclusiones .....	14
Agradecimientos .....	14
Referencias bibliográficas .....	15

# Abstract

Nowadays, phytotherapy is presented as a new way to treat psychological disorders as depression without the secondary effects associated with classical medication therapies based in drugs. *Hypericum perforatum* commonly named St John's Herb have interesting properties in treatment against low and mid-grade depression diseases. Therapeutic activities from St John's Herb is performed by secondary metabolites, concretely Hyperforin. The plant synthesizes secondary metabolites in response against a plethora of outside stimulus. The study and use of these external signals to increase a known and pharmacological interesting metabolite is called elicitation.

In this work the initial purpose was use drought as elicitor to increase Hyperforin concentration in *Hypericum*. However, problems in germination prevent us to reach this goal. After the initial germination problems, we performed different seed pre-treatments, testing 14 different treatments using 7 climatic conditions. Among them, our results indicates that the key conditions for *Hypericum perforatum* germination is, firstly an stratification period of 1 month, using Giberilic acid at 2,5 mM and 24 hours of light photoperiod using with high luminty (1.000  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ). This preliminary work shows the difficulties to work with this specie and offers some keys to follow in future works.

Keywords: *Hypericum perforatum*, elicitation, germination, dormancy

## Resumen

Hoy en día, la fitoterapia se presenta como una nueva forma de tratar los trastornos psicológicos como la depresión, sin los efectos secundarios asociados con las terapias de medicación clásica basadas en fármacos. *Hypericum perforatum* comúnmente llamada la hierba de San Juan tiene propiedades interesantes en el tratamiento contra las enfermedades depresivas de grado bajo y medio. Las actividades terapéuticas de la hierba de San Juan se realizan a través de metabolitos secundarios, concretamente la hiperforina. La planta sintetiza metabolitos secundarios en respuesta contra una plétora de estímulos externos. El estudio y el uso de estas señales externas para aumentar un metabolito conocido y farmacológicamente interesante se llama elicitación.

En este trabajo, el propósito inicial fue usar la sequía como elicitador para aumentar la concentración de Hiperforina en *Hypericum*. Sin embargo, los problemas de germinación nos impiden alcanzar este objetivo. Después de los problemas iniciales de germinación, realizamos diferentes pretratamientos a las semillas, probando 14 pretratamientos diferentes, con 7 condiciones climáticas. Entre ellos, nuestros resultados indican que las condiciones clave para la germinación de *Hypericum perforatum* es, en primer lugar, un período de estratificación de 1 mes de semillas tratadas con ácido Giberélico a 2,5 mM y 24 horas de fotoperíodo de luz utilizando una luminancia alta de (1000  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ). Este trabajo preliminar muestra las dificultades para trabajar con esta especie y ofrece algunas claves para seguir en trabajos futuros.

Palabras claves: *hypericum perforatum*, elicitación, germinación, dormancia

## Introducción

La depresión es la principal causa de problemas de salud y discapacidad en todo el mundo y según las últimas estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de 300 millones de personas viven con depresión. En nuestro país el consumo de antidepresivos es del 7,5% y nos sitúa en el décimo puesto entre los países miembros de la Organización para Cooperación y Desarrollo Económico, (OECD) (1). España, en tan sólo 10 años ha triplicado el consumo de este tipo de fármacos, además desde el Consejo General de Farmacéuticos alertan de la existencia de un mal uso de estas sustancias (2). Este tipo de fármacos pueden provocar importantes efectos secundarios tales como la somnolencia, molestias gastrointestinales, disfunción eréctil...

Actualmente se tiende a emplear tratamientos alternativos para la depresión de leve-moderada tales como la fitoterapia, entendiéndose como tal el empleo terapéutico de plantas, tanto enteras como partes de ella o extractos (3). Un ejemplo de ello es la utilización de *Hypericum perforatum* L. (*H. perforatum*), tanto en tinturas o extractos fluidos estandarizados y extractos hidroalcohólicos, en concentraciones en torno a 0,2-1 mg de hipericina (4). Incluso podemos encontrarlos en supermercados en la sección de complementos alimenticios en formato de capsulas gelatinosas. Para este trabajo se ha elegido la especie *H. perforatum* (Hierba de San Juan), por su acción farmacológica. Tiene una actividad similar a fármacos antidepresivos como Fluoxetina o Sertralina (3-6), ha demostrado también acción antiinflamatoria, antibacteriana, anticonceptiva y citotóxica (3).

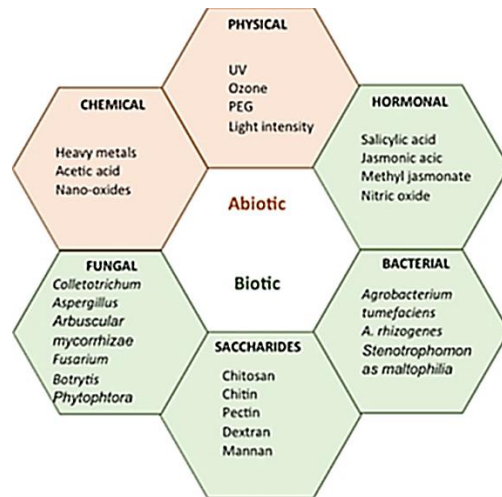
Los compuestos activos empleados en fitoterapia son generalmente metabolitos secundarios (7). Con el fin de aumentar este tipo de compuestos en plantas medicinales se han desarrollado diferentes estrategias, entre ellas la ingeniería genética y metabólica, la selección y mejoramiento de la línea celular, la adición de precursores o el uso de elicitores (8). La elicitación es una estrategia atractiva para incrementar la concentración de metabolitos secundarios de interés, puesto que actualmente las herramientas de ingeniería metabólica o biología sintética no pueden ser empleadas sin un alto grado de sofisticación técnica (9), además de los requisitos legales y permisos que se necesitan en el uso de este tipo de técnica.

Un elicitor es una molécula o factor ambiental capaz de activar la biosíntesis de metabolitos secundarios. Existen numerosos ejemplos en la bibliografía acerca del uso de distintos elicitores en *H. perforatum* (**Figura 1**) logrando resultados interesantes:

- En cultivos celulares de *H. perforatum*, el ácido salicílico incrementa la concentración hipericina y pseudohipericina en 1.5 veces (10).

- En brotes de *H. perforatum* en condiciones *In vitro*, el empleo de sacarosa, polietilenglicol, metil-Jasmonato o *Agrobacterium tumefaciens* tienen acción en la acumulación de hipericina e hiperforina (11).

- En planta adulta de *H. perforatum*, la sequía consigue aumentar la concentración de Uliginosina-B hasta 40 veces con respecto a los niveles del control (5;12).



**Figura 1:** esquema de los tipos de elicitors (abióticos y bióticos) empleados en el género *Hypericum*. Están agrupados por su naturaleza: bacterias, hongos, químicos o físicos, etc. La imagen fue tomada de (Shakya *et al.*, 2019).

De todos los elicitors, el empleo de la sequía permite un control sencillo en el laboratorio con el fin de aumentar los metabolitos de interés. Sin embargo, uno de los problemas que lleva la sequía es la pérdida de biomasa por parte de la planta (13), que resta rendimiento y, por tanto, rentabilidad. Este trabajo pretendía optimizar en laboratorio la germinación y el cultivo de *H. perforatum*, con el fin de testar la influencia de la sequía como elicitor abiótico, combinado al tratamiento con ácido piroglutámico, que ha demostrado aumentar la tolerancia frente al estrés hídrico en lechuga (14), y así intentar obtener mayor cantidad de biomasa con mayor concentración del compuesto de interés.

## Objetivos

Optimización de la germinación en semillas silvestres de *H. perforatum*


# Material y métodos

## Revisión bibliográfica

La revisión bibliográfica se realizó con bases de datos como *MedLine*, *Scielo*, *Science Direct* o *Springer Link*, con el buscador PuntoQ de la Biblioteca de la Universidad de La Laguna y Google Académico. Se combinaron las diferentes palabras clave para la búsqueda. Como gestor bibliográfico utilizamos el programa *Mendeley Desktop*, y su *Plug-in de Microsoft Word 2016* para la referenciar bibliográfica.

## Material vegetal

El material vegetal empleado fue suministrado por un recolector autorizado de Las Palmas de Gran Canaria. Para los ensayos se emplearon semillas de planta silvestre de la especie *H. perforatum* recolectadas con la última cosecha en la localidad de Moya en Las Palmas de Gran Canaria. En la **tabla 1** se describe brevemente la taxonomía y se acompaña de una imagen de esta planta.

	<b>Familia:</b>	<i>Hypericaceae (clusiáceas)</i>
	<b>Subfamilia:</b>	<i>Hypericoideae</i>
	<b>Género:</b>	<i>Hypericum</i>
	<b>Especie:</b>	<i>Perforatum</i>
	<b>Designación completa:</b>	<i>Hypericum perforatum L.</i>

**Tabla 1:** Breve descripción taxonómica, acompañada de una imagen de la planta que se obtuvo en la página web de Wikipedia.



## Desarrollo experimental

En todos los ensayos y antes de usar pretratamientos, caso de los ensayos 2 y 3, las semillas fueron sometidas a lavado bajo grifo con corriente de agua constante durante 15 minutos, seguido de un lavado en etanol al 70% (5 s). Todo ello para eliminar inhibidores de la germinación presentes en las cubiertas de la semilla. Seguidamente para eliminar los restos de etanol se realizaron tres lavados con agua destilada (3 - 5 minutos cada lavado).

Se realizaron 3 ensayos diferentes. En el ensayo 1 se realizó una siembra en sustrato comercial. En los ensayos 2 y 3 las siembras fueron en placas de *Petri* de vidrio borosilicato, con algodón y papel de filtro estériles e humedecido periódicamente con agua esterilizada, todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las condiciones ambientales y pretratamientos vienen resumidos en las **tablas 2 y 3**. Se consideró una semilla germinada cuando, bajo una lupa, se observaba claramente la radícula (**Figura 2**), además de tener un tamaño aproximado de 0.5 cm, medido con un calibrador digital (*powerfix*).



**Figura 2:** La imagen muestra lo que se consideró como semilla germinada. Cuando observada bajo lupa con aumento 10X20 se vea claramente la radícula. Imagen obtenida en este trabajo.

---

En la **tabla 2** se exponen las diferentes siembras y se detallan las variables ambientales, número de semillas empleadas y duración del ensayo.

El ensayo 1 pretendía ser el control con el que comparar los pretratamientos empleados en los siguientes ensayos. Se buscaron condiciones de incubación ideales comprando temperatura constante (25° C) condición S1A con termoperiodo (25/15° C) condición S1B en la **tabla 2**.

En el ensayo 2 y 3 se incorporan más condiciones ambientales (S2A, S2B) y (S3A, S3B, S3C) respectivamente. En el ensayo 2 se comparó fotoperiodo de 16h de luz y 8h en oscuridad (16/8h) con 24h de luz y en el ensayo 3 además se probaron diferentes intensidades de luz: (150; 300-400 y 1.000  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ). Los detalles se encuentran en la **tabla 2**.

<b>Ensayo nº1</b>					
<b>Sistema de siembra y nomenclatura experimental</b>	<b>nº de semillas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Fotoperiodo (horas de luz)</b>	<b>Intensidad de luz (<math>\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}</math>)</b>	<b>Periodo de germinación (semanas)</b>
Siembra en sustrato comercial (S1A)	3x100	25	16/8	150	6
Siembra en sistema hidropónico (S1B)	3x100	25/15		300-400	
<b>Ensayo nº2</b>					
<b>Sistema de siembra y nomenclatura experimental</b>	<b>nº de semillas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Fotoperiodo (horas)</b>	<b>Intensidad de luz (<math>\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}</math>)</b>	<b>Periodo de germinación Con luz (semanas)</b>
Placas de <i>Petri</i> (S2A)	3x10	20	16/8	150	10
Placas de <i>Petri</i> (S2B)	3x10	15	24	300-400	6
<b>Ensayo nº3</b>					
<b>Sistema de siembra y nomenclatura experimental</b>	<b>nº de semillas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Fotoperiodo (horas de luz)</b>	<b>Intensidad de luz (<math>\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}</math>)</b>	<b>Periodo de germinación (semanas)</b>
Placas de <i>Petri</i> (S3A)	3x20	20	16/8	150	6
Placas de <i>Petri</i> (S3B)	3x20		24	1.000	
Placas de <i>Petri</i> (S3C)	3x20	15	24	300-400	

**Tabla 2:** Resumen de las condiciones empleadas en los diferentes ensayos. Tipo de siembra, condiciones ambientales y período de germinación estudiados en los ensayos 1,2,3. En el ensayo 2 la condición experimental (S2B) procede de las semillas en condiciones de oscuridad en la condición (S2A) con el fin de estudiar el efecto de la luz sobre la germinación, transcurrido este tiempo se incubaron a la luz durante otras 6 semanas que es el tiempo que se refleja en esta tabla. Se resaltan en fondo gris las variables más importantes de cada ensayo: temperatura en el ensayo (1), fotoperiodo en el (2) e intensidad lumínica (3)

Los pretratamientos sirven a incrementar la germinación por distintos mecanismos; la fitohormona, ácido giberélico ( $GA_3$ ) induce enzimas hidrolíticas para “ablandar” la cubierta seminal y el endospermo, la auxina ácido indol-3-acético (IAA) induce la elongación de las células, la lejía ( $NaClO$ ), para ayudar a escarificar la semilla y aumentar la permeabilidad de la misma y el calor ( $40^\circ C$ ) a modo de estratificación cálida. El  $KNO_3$  se empleó porque disminuye los requerimientos de luz en semillas fotosensibles, este se usó en el ensayo 2 para impregnar las placas manteniéndolas húmedas durante todo el ensayo, y en el ensayo 3 como pretratamiento a las semillas. Todos los pretratamientos fueron de 24 h, excepto: el  $GA_3$  estuvo 6 y 24 horas, el de calor fue de 40 minutos y el  $NaClO$  fue de 15 min. Los detalles de las concentraciones, tiempo y donde se usó cada uno se encuentran en la **tabla 3**.

El ensayo 2 duro 10 semanas en total, las 4 primeras semanas solo existía la condición S2A en fotoperiodo (16/8 h). Pasado este tiempo las placas en oscuridad que ahí habían, se trasladaron a una nueva condición S2B en **tabla 2**, donde están 6 semanas más, esta vez con exposición a la luz, las placas de S2A estuvieron las 10 semanas en esa condición ambiental y siempre en expuestas a la luz. En este ensayo se probó la estratificación a temperatura ambiente a parte de los pretratamientos ya explicados en el texto y descritos en la **tabla 3**.

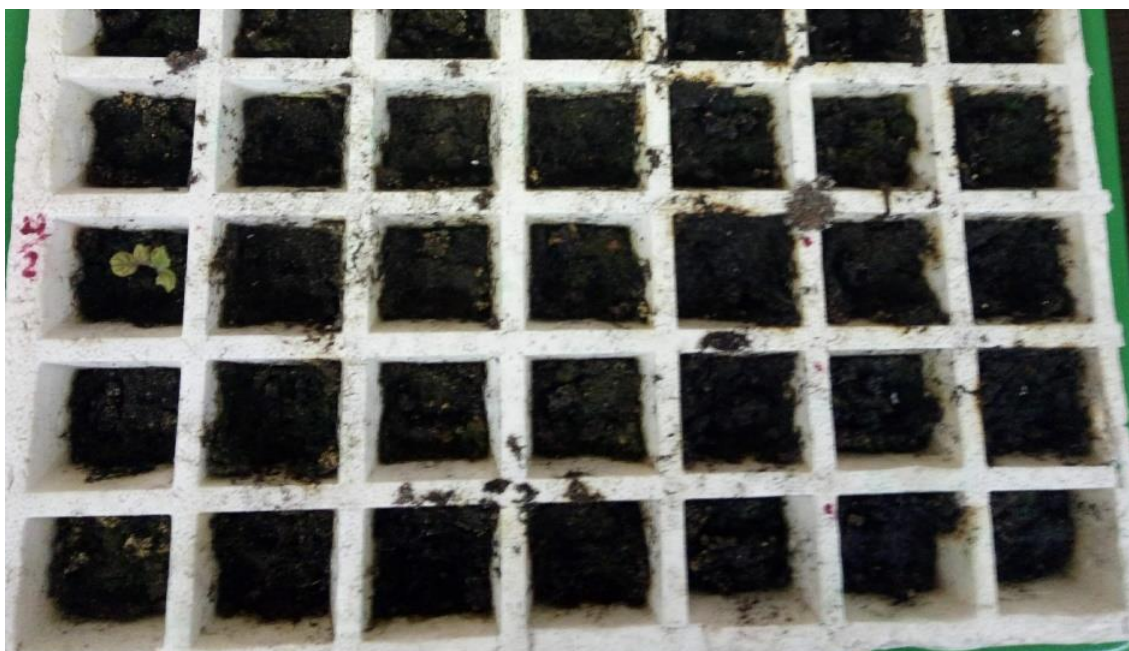
<b>Ensayo nº 1 (S1A, S1B)</b>		<b>Renombrados</b>
Alcohol al 70% durante (5 s.)		TTR 1
<b>Ensayo nº 2 (S2A, S2B)</b>		<b>Renombrados</b>
<b>Pretratamientos empleados en semilla</b>	<b>Algodón impregnado con</b>	
Agua 6h.	Agua	TTR 2
Agua 6h.	$KNO_3$ [10 mM]	TTR 3
Agua 24h.	Agua	TTR 4
Agua 24h.	$KNO_3$ [10 mM]	TTR 5
$GA_3$ [2,5 mM] 6h	Agua	TTR 6
$GA_3$ [2,5 mM] 6h.	$KNO_3$ [10 mM]	TTR 7
$GA_3$ [2,5 mM] 24h.	Agua	TTR 8
$GA_3$ [2,5 mM] 24h.	$KNO_3$ [10 mM]	TTR 9
<b>Ensayo nº 3 (S3A, S3B, S3C)</b>		<b>Renombrados</b>
<b>Pretratamientos empleados en semilla</b>		
$KNO_3$ [100mM] 24 h.		TTR 10
$GA_3$ [150mM] 24 h.		TTR 11
AIA [100mM] 24 h.		TTR 12
Calor $40^\circ C$ 40 min.		TTR 13
$NaHClO_3$ (5%) 15 min.		TTR 14

**Tabla 3.** Diferentes pretratamientos a las semillas en los ensayos 1, 2 y 3.  $GA_3$ : ácido giberélico. AIA: ácido indol-acético. La función de cada uno de los pretratamientos esta descrita en texto.  $KNO_3$  [10 mM], no fue pretratamiento en la semilla. Se uso para la impregnar el algodón en las placas del ensayo 2, el  $KNO_3$  [100 mM] si fue un pretratamiento en la semilla.

## Resultados y discusión

### Ensayo 1

En este ensayo, pese al elevado número de semillas empleadas no se obtuvieron resultados destacables, sólo germinaron 2 semillas de 300(**Figura 3**), la media en (%) y desviación estándar fueron  $(0,48 \pm 0)$ . Por lo que solo el lavado y pretratamiento con etanol 70% no es suficiente para eliminar la inhibición generada por los exudados de las cubiertas seminales. Ello nos llevó a plantear usar otros pretratamientos en los siguientes ensayos (ensayos 2 y 3).



**Figura 3:** Detalle de semilla germinada de *H. perforatum* en el ensayo 1, sobre sustrato comercial en semillero de poliestireno.

Debido a los resultados obtenidos, se afinó la búsqueda con los problemas de germinación de esta especie y encontramos que Campbell (1985) en un estudio demuestra que el enterramiento es inversamente proporcional a la germinación de *H. perforatum* (15), esto concuerda con nuestro resultado.

Otra razón importante de este resultado es la dormancia de las semillas, entendiéndose como tal, período en el ciclo biológico de una semilla en el que el crecimiento y desarrollo se suspenden temporalmente, permitiendo a la semilla reducir la actividad metabólica con el fin de preservar en el tiempo su viabilidad. En el mismo trabajo Campbell demuestra que la siembra de semillas jóvenes de *H. perforatum* se encuentran influenciadas por la

temperatura, siendo la óptima para su germinación 20°C, viéndose está comprometida a temperaturas mayores.

## Ensayo 2

El primer resultado que obtuvimos en este ensayo fue que las semillas de *H. perforatum* mantenidas en oscuridad tras 4 semanas de período de experimentación no germinaban, por lo que parece ser que la luz es necesaria para la germinación de esta especie. Pérez-García y colaboradores en 2006 (16), demuestran que *H. perforatum*, tiene un alto requerimiento de luz durante su germinación. Nuestros resultados son comparables a los de este estudio ya que sólo se obtuvieron resultados positivos en condiciones de luz. Posteriormente, aquellas placas que en principio fueron sometidas a un régimen de oscuridad, fueron incubadas con 24 horas luz (condición S2B) como se explica en el apartado Método. El segundo resultado se obtiene al observar cómo se duplican los porcentajes en S2B, obteniendo el porcentaje más altos de los 3 ensayo 20% de germinación en TTR 9 tras el mes en oscuridad frente a S2A que estuvo a la luz todo el periodo de germinación y que para el mismo tratamiento obtuvo 13,33% de germinación **tabla 4.1**.

Nedkov en 2007(17) demostró que *H. perforatum* mejora considerablemente su germinación tras un período de estratificación a temperatura ambiente durante 7 días, al mantener las semillas en placas húmedas y temperatura ambiente, estábamos realizando esta estratificación, permitiendo luego que tras su paso a la luz se desatara más rápidamente la germinación, aunque el tiempo empleado fuera superior al observado por Nedkov en 2007 (17) en sus experimentos.

Ensayo nº 2			
Pretratamiento	Renombrado	Porcentajes de germinación (%) y su desviación estándar en 10 semanas	
		Condición S2A	Condición S2B
Agua 6h.	<b>TTR 3</b>	6.67 ±0,057	10 ± 0
Agua 24h.	<b>TTR 5</b>	-	10 ± 0
GA <sub>3</sub> [2,5mM] 6h.	<b>TTR 7</b>	6.67 ±0,057	16.67 ±0,057
GA <sub>3</sub> [2,5 mM] 24h.	<b>TTR 9</b>	13,33 ±0,057	20 ± 3,39 E <sup>-17</sup>

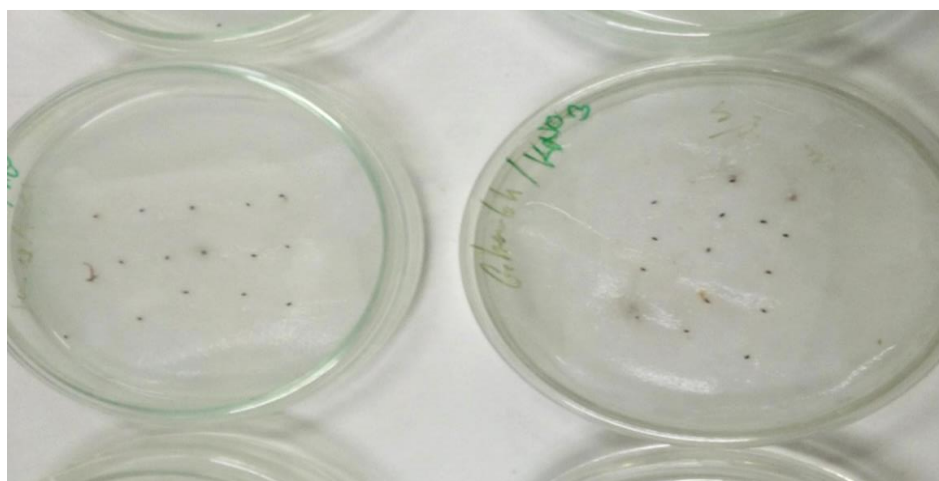
**Tabla 4.1:** Porcentajes de germinación en las dos condiciones de ensayo S2A y S2B en el periodo total de germinación, 10 semanas. S2B: estuvo 1 mes en oscuridad lo que hizo duplicar los resultados de S2A. (sólo se muestran aquellos pretratamientos donde hubo germinación de este ensayo en la **tabla 4.1** y **4.2**, (- Significa ausencia de germinación))

Para evaluar la eficacia de los pretratamientos observamos la condición S2A a las 6 y 10 semanas, atendiendo a los resultados mostrados en la **tabla 4.2**. Vemos que aquellas placas en las que se utilizaba el  $\text{KNO}_3$  para impregnar el algodón daban resultados, cosa que no ocurría con aquellas impregnadas sólo con agua. Además, aquellas semillas pretratadas con  $\text{GA}_3$  a [2,5 mM] demostró eficaz en combinación con  $\text{KNO}_3$ , obteniéndose mayor porcentaje de germinación 13,33 %, cuando el pretratamiento es de 24 h respecto a 6 horas donde fue del 3,33%. Sin embargo, el  $\text{GA}_3$  solo no fue eficaz tras 6h o 24h de pretratamiento, caso de los TTR 6 Y 8 que no se presentan en la tabla.

Ensayo nº 2			
Porcentajes de germinación (%) y su desviación estándar			
Condición S2A			
Pretratamiento	Renombrado	Tras 6 semanas	Tras 10 semanas
Agua 6h.	TTR 3	6.67 $\pm$ 0,057	6.67 $\pm$ 0,057
Agua 24h.	TTR 5	-	-
$\text{GA}_3$ [2,5mM] 6h.	TTR 7	3,33 $\pm$ 0,057	6.67 $\pm$ 0,057
$\text{GA}_3$ [2,5 mM] 24h.	TTR 9	10 $\pm$ 0	13,33 $\pm$ 0,057

**Tabla 4.2.** Porcentaje de germinación a las 6 y 10 semanas en el ensayo 2, para las condiciones S2A, (- Significa ausencia de germinación)

El tratamiento en semilla con  $\text{GA}_3$  es un tratamiento muy empleado en la bibliografía, que intenta activar los mecanismos metabólicos de la germinación (18;19). El  $\text{KNO}_3$  ayuda a romper la dormancia en la semilla, y es también ampliamente utilizado con este fin en protocolos de germinación (20). Se ha demostrado que el empleo conjunto de ambas sustancias mejora considerablemente la germinación en especies con dormancia muy pronunciadas como es el caso de *H. perforatum* (21).



**Figura 4:** Detalle de las placas de Petri empleadas en el ensayo 2 en la condición S2B.

Pérez-García y colaboradores en 2006 (16), demuestran que el  $\text{KNO}_3$  ayuda a paliar las necesidades de altas intensidades de luz que tiene la especie *H. perforatum*, por lo que esto explica que en nuestros ensayos sólo germinasen aquellas placas donde el algodón era impregnado con nitrato potásico, **tabla 4.2**. Es de destacar también que aunque el  $\text{KNO}_3$  acelera la germinación no aumenta el porcentaje como si lo hace la hormona  $\text{GA}_3$ , esto se ve en TTR3 donde solo se usó  $\text{KNO}_3$ , y se mantiene el porcentaje de germinación (6,67%) tanto en 6 como en 10 semanas, mientras los TTR 7 y 9, si incrementaron el porcentaje de germinación respectivamente de 3,33% y 10,0% en 6 semanas a 6,67% y 13,33% en 10 semanas con en el mismo orden, **tabla 4.2**.

### Ensayo 3

En este ensayo, se introdujeron LED de alta potencia (**Figura 5**).



**Figura 5:** Detalle de los LED empleados en el ensayo 3, con una intensidad de luz de 1.000 ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ )

En la **tabla 5** se muestran solo aquellos tratamientos que germinaron de este ensayo, podemos observar que no existen grandes diferencias en el empleo de las diferentes intensidades de luz. El mayor porcentaje de germinación correspondió a las semillas que se mantuvieron a 1.000 ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) durante 6 semanas con un porcentaje del 10%.

Tratamientos	Experimento 3		
	Condición S3A Intensidad luz 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	Condición S3B Intensidad luz 1.000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	Condición S3C Intensidad luz 300- 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$
	Tras 6 semanas		
KNO <sub>3</sub> [100mM] 24h.	5 ± 0	5 ± 0	-
GA <sub>3</sub> [150mM] 24h.	-	10 ± 0	-

**Tabla 5.** Porcentaje de germinación en las diferentes condiciones ambientales. (- Significa ausencia de germinación).

Los resultados presentados por Cirak y colaboradores en 2004 (22) demuestran que la intensidad lumínica adecuada esta entre 600-1.800 lux, aunque la ideal es de 2.102 lux para la germinación en *H. perforatum*, nuestros datos no reflejan claramente esta tendencia, ya que obtuvimos germinación por debajo de estas intensidades y el aumento de casi 10 veces de intensidad lumínica (condición S3A con 150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) frente a condición S3B con (1.000  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ), no tuvo un incremento considerable en los porcentajes de germinación **tabla 5**, siendo estos parecidos a los obtenidos para los mismos pretratamientos en el experimento número 2 **tabla 4.2**.

## Problemas en la realización del estudio

En primer lugar, es evidente que una de las conclusiones de este trabajo es que, no se han podido cumplir los objetivos planteados al principio del mismo, puesto que las bajas tasas germinación obtenidas, no permite llevar acabo los estudios que el grupo de investigación (GBVa) tenía previsto y que requieren unas tasas de germinación de semillas silvestres más elevadas, para testar la biodiversidad fisiológica de la especie.

Cabe mencionar que los datos del estudio realizado por Pérez-García y colaboradores en 2006 (16), nos muestran como la procedencia de la semilla es muy importante, ya que en las mismas condiciones una puede alcanzar porcentajes de germinación superiores al 90% y otros no llegar al 5%. Además, la edad de las semillas también es muy importante, puesto que las semillas de *H. perforatum* están impregnadas por inhibidores que impide la germinación en semillas jóvenes. Aunque en teoría el lavado de estas permite eliminarlos, en nuestro caso empleamos semillas (muy jóvenes) y de una única procedencia, por lo que esto ha podido perjudicar considerablemente nuestro trabajo. El pequeño tamaño de las semillas nos ha impedido realizar una prueba de viabilidad de la misma (Test de Tetrazolio). A esto, también se une a que en el Grupo donde he realizado el trabajo fin de grado, es la primera vez que se enfrenta a esta especie y que el proveedor, aunque autorizado, puede haber influido si no realizo su trabajo adecuadamente.



Pese a la cantidad de pretratamientos probados a las semillas (14 en total) y las distintas condiciones ambientales empleadas (7 en total), el largo tiempo necesario para llevar a cabo la germinación y el coordinamiento del TFG entre tiempo, presupuestos y a veces espacio en laboratorio, ha limitado el número de pruebas que hemos podido realizar.

## Conclusiones

1. Las semillas de *H. perforatum* ensayadas requieren un período de estratificación de 1 mes para romper la dormancia.
2. El mejor ensayo fue el pretratamiento a la semilla con GA<sub>3</sub>, combinado con KNO<sub>3</sub> para humedecer el algodón en las placas de *Petri*.
3. La luz es fundamental para la germinación de semillas de *H. perforatum*.
4. La presencia de luz es un factor con mayor importancia que los fotoperíodos, intensidades y temperaturas a los que se sometieron estas semillas en su germinación.

Por último, nos gustaría concluir con las condiciones ideales para la germinación según nuestros resultados:

Semillas lavadas con etanol al 70%, seguido de tres lavados de agua destilada y sometidas a un periodo de estratificación, para posterior pretratamiento con GA<sub>3</sub> e humedeciendo el algodón en placas de *Petri* con KNO<sub>3</sub> durante la germinación y bajo fotoperiodo de 16/8h.

## Agradecimientos

Quiero agradecer encarecidamente al Dr. Francisco Valdés González que se ofreciese a ser mi tutor y me brindara la oportunidad de realizar este Trabajo Fin de Grado. Sin su ayuda, planteamiento y orientación, este trabajo no hubiera sido posible.

Del mismo modo, agradecer al Dr. David Jiménez Arias por sus consejos, su tiempo y su inestimable ayuda en la búsqueda de información.

Al Dr. Juan C. Luis Jorge por su continuo apoyo en las tardes de laboratorio.

## Referencias bibliográficas

1. OECD. OECD Health Statistics 2018 [Sede Web]. Francia: OECD;2018[cited 2019 Jun 17]. Available from: <https://www.oecd.org/health/health-data.htm>
2. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. La intervención del farmacéutico, clave en la adherencia a los tratamientos antidepressivos.[ Sede Web ].Madrid: CGCOF; 2017[cited 2019 Jun 20]. Available from: <https://www.portalfarma.com/Profesionales/consejoinforma/Paginas/Dia-Mundial-Salud-2017.aspx>
3. Iris F. F. Benzie, Sissi Wachtel-Galor. Herbal Medicine, Biomolecular and Clinical Aspects: Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). En Nueva York, Editor Taylor & Francis Group, LLC;2011. p. 211-229.
4. VILLAR DEL FRESNO ÁM, CARRETERO ACCAME ME. Hipérico revisión. Farmacia profesional. 2003;17(5): p.76–82.
5. Nacif de Abreu I, Mazzafera P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. Plant Physiol Biochem. 2005;43(3): p. 241–8.
6. Zanolli P. Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. CNS Drug Rev. 2004;10(3): p. 203–18.
7. Hussein RA, El-Anssary AA. Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. En: Builders P, editor. Herbal Medicine. IntechOpen;2019. p. 11-30
8. Guerriero G, Berni R, Muñoz-Sanchez JA, Apone F, Abdel-Salam EM, Qahtan AA, "et al". Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. Genes (Basel). 2018 ;9(6).
9. Shakya P, Marslin G, Siram K, Beerhues L, Franklin G. Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. J Pharm Pharmacol. 2019;71(1): p. 70–82.
10. Wang J, Qian J, Yao L, Lu Y. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. Bioresour Bioprocess. 2015;2(1): p. 5.
11. Pavlík M, Vacek J, Klejdus B, Kubáň V. Hypericin and hyperforin production in St. John's wort in vitro culture: Influence of saccharose, polyethylene glycol, methyl jasmonate, and *Agrobacterium tumefaciens*. J Agric Food Chem. 2007;55(15): p. 6147–53.

12. Stein AC, Viana AF, Müller LG, Nunes JM, Stolz ED, Do Rego JC, Costentin J, von Poser GL, Rates SM. Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: A promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. *Behav Brain Res.* 2012;228(1): p. 66–73.
13. Borges AA, Jiménez-Arias D, Expósito-Rodríguez M, Sandalio LM, Pérez JA. Priming crops against biotic and abiotic stresses: MSB as a tool for studying mechanisms. *Front Plant Sci.* 2014; 5: p. 642.
14. Jiménez-Arias D, García-Machado FJ, Morales-Sierra S, Luis JC, Suarez E, Hernández M, "et al". Lettuce plants treated with L-pyroglutamic acid increase yield under water deficit stress. *Environ Exp Bot.* 2019; 158: p. 215–22.
15. CAMPBELL MH. Germination, emergence and seedling growth of *Hypericum perforatum* L. *Weed Res.* 1985;25(4): p. 259–66.
16. Pérez-García F, Huertas M, Mora E, Peña B, Varela F, González-Benito ME. *Hypericum perforatum* L. seed germination: Interpopulation variation and effect of light, temperature, presowing treatments and seed desiccation. *Genet Resour Crop Evol.* 2006;53(6): p. 1187–98.
17. N. NEDKOV. Research on the effect of pre-sowing treatment on seed germination of *Hypericum perforatum* L. *science NN-BJ of A.* 2007; 13: p. 31-37
18. Cuneyt Cirak, Ali Kemal Ayan and Kudret Kevseroglu. The Effects of Light and Some Pre-soaking Treatments on Germination Rate of St. John's Worth (*Hypericum perforatum* L.) *Seeds.* *Pakistan J Biol Sci.* 2004;7(2): p. 182–6.
19. Chen D, Gunawardena TA, Naidu BP, Fukai S, Basnayake J. Seed treatment with gibberellic acid and glycinebetaine improves seedling emergence and seedling vigour of rice under low temperature. *Seed Sci Technol [Internet].* 2005; 33(2): p. 471–9.
20. Bian L, Yang L, Wang J, Shen H. Effects of KNO<sub>3</sub> pretreatment and temperature on seed germination of *Sorbus pohuashanensis*. *J For Res.* 2013; 24(2): p. 309–16.
21. Bekim Gashi, Kasamedin Abdullai, Valbona Mata and Efigjeni Kongjika. Effect of gibberellic acid and potassium nitrate on seed germination of the resurrection plants *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae*. *African Journal of Biotechnology.* 2012; 11(20): p. 4537-4542
22. Cuneyt Cirak, Ali Kermal Ayan, Kudret Keveseoglu and Omer Caliskan. Germination Rate of St. John's Worth (*Hypericum perforatum* L.) Seeds Exposed to Different Light Intensities and Illumination Periods. *J Biol Sci.* 2004; 4(3): p. 279–82.

