



**NEPETA TEYDEA WEBB & BERTHEL.
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y CINÉTICA DE LA
RESPUESTA ESTRÉS LUMÍNICO.
DESARROLLO DE UN MODELO BIOLÓGICO DE DETECCIÓN DE
CAMBIO CLIMÁTICO.**

TESIS DOCTORAL

Niza Mar Escuela Izquierdo

Director: Juan Ignacio Frías Viera

Co-director: Francisco Javier Valdés González

2017

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Dpto. Ecología, Botánica y Fisiología Vegetal

TESIS DOCTORAL

***NEPETA TEYDEA* WEBB & BERTHEL.
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y CINÉTICA DE
LA RESPUESTA ESTRÉS LUMÍNICO.
DESARROLLO DE UN MODELO BIOLÓGICO DE
DETECCIÓN DE CAMBIO CLIMÁTICO.**

**Memoria que presenta la Licenciada Niza Mar Escuela Izquierdo
para optar al Grado de Doctora en Biología
La Laguna, 27 de junio 2017**

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

D. JUAN GNACIO FRIAS VIERA, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética. Facultad de Ciencias, Universidad de La Laguna Y **D. FRANCISCO JAVIER VALDÉS GONZALEZ** Profesor Titular del Departamento de Ecología, Botánica, Fisiología Vegetal de la Universidad de La Laguna

HACEMOS CONSTAR: Que la presente memoria titulada **"NEPETA TEYDEA WEBB & BERTHEL. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y CINÉTICA DE LA RESPUESTA ESTRÉS LUMÍNICO. DESARROLLO DE UN MODELO BIOLÓGICO DE DETECCIÓN DE CAMBIO CLIMÁTICO."** presentada por la licenciada en Biología Dña. **NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO**, ha sido realizada bajo nuestra dirección en las dependencias de la ULL y que reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Biología.

La Laguna, a 20 junio de 2017.

Fdo.: Dr. Ignacio Frias Viera

Fdo.: Dr. Francisco Valdés González

Facultad de Ciencias. Sección Biología. Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética. Apartado de correo: 456; 38.200; San Cristóbal de la Laguna; S/C de Tenerife. España. Tfn: 922318390. Email: frías@ull.es

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

AGRADECIMIENTOS

A mi director Dr. Juan Ignacio Frías Viera y a mi co-director Dr. Francisco Valdés González, les agradezco que me admitieran en su equipo de investigación y me dieran la oportunidad de iniciar este proyecto con vuestro laboratorio.

A los profesores, personal y compañeros del Dpto. Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal de la ULL. Muchas gracias a todos por su colaboración.

Al Parque Nacional del Teide, en especial a Ana Carmen Rivero Méndez por facilitarnos la tramitación de los permisos necesarios para la realización de Actividades de Investigación en el Parque Nacional del Teide, y a José Luis Martín Esquivel (jefe Conservación del Parque Nacional del Teide) y técnicos del parque por proporcionarnos el material vegetal necesario de *N. teydea* para llevar a cabo esta Tesis.

A mi familia y amigos, por su apoyo condicional y por su constante ayuda. Ojalá pudiera compensarles por tanto paciencia. A todos ellos, que han estado siempre en los mejores y en los peores momentos, les debo que esta Tesis sea un hecho.

¡Gracias a todos!

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

INDICE DEL MANUSCRITO

Abreviaturas	I
Símbolos y fórmulas	XI
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I.1. Luz	1
I.1.1. Radiación solar	1
I.1.2. Espectro electromagnético	1
I.2. Radiación ultravioleta	2
I.2.1. Factores que influyen en la radiación ultravioleta que alcanza la superficie terrestre	3
I.2.2. Efectos de la radiación ultravioleta sobre las plantas	4
I.2.3. Plantas aclimatadas a condiciones de alta incidencia de radiación ultravioleta. Adaptaciones de plantas de alta montaña	10
I.3. Estrés en plantas	12
I.3.1. Concepto de estrés en fisiología vegetal	12
I.3.2. Tipos de estrés	13
I.3.3. Estrés por luz ultravioleta. Estrés oxidativo	14
I.3.3.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS). Concepto, papel fisiológico y tipos de ROS	15
I.3.3.2. Efecto nocivo de los ROS	17
I.3.3.3. Defensa de las plantas frente a la luz ultravioleta. Sistema antioxidante de las células	18
I.4. Bibliografía	21
II. OBJETIVOS	31
III. FAMILIA LAMIACEAE. TAXONOMÍA, ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN	32
III.1. Introducción	32

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

III.1.1. Descripción de la familia Lamiaceae	33
III.1.2. Distribución geográfica de la familia Lamiaceae	34
III.1.3. Usos e importancia económica de la familia Lamiaceae	35
III.2. Género <i>Nepeta</i>	36
III.2.1. Descripción del género <i>Nepeta</i>	37
III.2.2. Distribución geográfica de <i>Nepeta teydea</i>	38
III.2.3. Usos e importancia económica del género <i>Nepeta</i>	39
III.3. Especie <i>Nepeta teydea</i>	39
III.3.1. Clasificación botánica de <i>Nepeta teydea</i>	39
III.3.2. Descripción botánica de <i>Nepeta teydea</i>	40
III.3.3. Distribución geográfica de <i>Nepeta teydea</i>	43
III.3.4. Características biológicas y ecológicas de <i>Nepeta teydea</i>	44
III.3.5. Usos medicinales de <i>Nepeta teydea</i>	44
III.3.6. Composición química de <i>Nepeta teydea</i>	44
III.4. Bibliografía	46
IV. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE PLANTAS SUPERIORES	48
IV.1. Introducción	48
IV.1.1. Fundamentos del cultivo <i>in vitro</i>	48
IV.1.2. Aplicaciones del cultivo de tejidos <i>in vitro</i> en biotecnología	48
IV.1.3. Tipos de cultivo	50
IV.1.4. Factores que afectan al desarrollo <i>in vitro</i>	51
IV.1.4.1. Medio de cultivo <i>in vitro</i>	51
IV.1.4.2. Condiciones físicas del cultivo <i>in vitro</i>	55
IV.1.5. Micropropagación. Aspectos generales	57
IV.1.6. Tipos de micropropagación	57

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

IV.1.7. Etapas de la micropropagación	58
IV.1.8. Callos	60
IV.1.8.1. Inducción y cultivo de callos	60
IV.2. Materiales y métodos	63
IV.2.1. Micropropagación de plantas de <i>Nepeta teydea</i>	63
IV.2.1.1. Fase de germinación	63
IV.2.1.1.1. Materiales	63
IV.2.1.1.2. Metodología	64
IV.2.1.1.2.1. Esterilización del material vegetal	64
IV.2.1.1.2.2. Esterilización del material de laboratorio	68
IV.2.1.1.2.3. Ensayos de germinación	70
IV.2.1.1.2.4. Siembra	72
IV.2.1.1.2.5. Condiciones de incubación de las semillas	73
IV.2.1.2. Fase de establecimiento	74
IV.2.1.2.1. Materiales	74
IV.2.1.2.2. Metodología	75
IV.2.1.2.2.1. Esterilización del medio de cultivo y material de laboratorio	75
IV.2.1.2.2.2. Medio de cultivo	75
IV.2.1.2.2.2.1. Composición del medio de cultivo	75
IV.2.1.2.2.3. Siembra	80
IV.2.1.2.2.4. Condiciones de incubación de los cultivos	80
IV.2.1.3. Fase de multiplicación	81
IV.2.1.3.1. Material	81
IV.2.1.3.2. Metodología	82

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

IV.2.1.4. Fase de enraizamiento	85
IV.2.1.4.1. Material	85
IV.2.1.4.2. Metodología	85
IV.2.1.5. Fase de paso a tierra y aclimatación	86
IV.2.1.5.1. Material	86
IV.2.1.5.2. Metodología	87
IV.2.1.5.2.1. Metodología de la fase de paso a tierra	87
IV.2.1.5.2. 2. Metodología de la fase de aclimatación	88
IV.2.2. Micropropagación de callos de <i>Nepeta teydea</i>	90
IV.2.2.1. Inducción de callos de <i>Nepeta teydea</i>	90
IV.2.2.1.1. Material	91
IV.2.2.1.2. Metodología	91
IV.2.2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de callos de <i>Nepeta teydea</i>	95
IV.2.2.2.1. Material	96
IV.2.2.2.2. Metodología	96
IV.2.3. Análisis estadístico	99
IV.3. Resultados	100
IV.3.1. Resultados de la micropropagación de plantas de <i>Nepeta teydea</i>	100
IV.3.1.1. Fase de germinación de las semillas	100
IV.3.1.1.1. Esterilización del material vegetal	100
IV.3.1.1.2. Germinación de las semillas	104
IV.3.1.1.2.1. Efecto del agente desinfectante utilizado en el protocolo de esterilización sobre la germinación de las semillas	104
IV.3.1.1.2.2. Efecto de la escarificación química (aplicación de ácido sulfúrico) aplicada durante el protocolo de esterilización sobre la germinación de las semillas	105

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

IV.3.1.1.2.3. Efecto del pre-tratamiento con ácido giberélico sobre la germinación de las semillas	106
IV.3.1.2. Fase de establecimiento	109
IV.3.1.2.1. Efecto de la concentración salina sobre el desarrollo <i>in vitro</i> de <i>Nepeta teydea</i>	109
IV.3.1.3. Fase de multiplicación	112
IV.3.1.3.1. Efecto de los reguladores crecimientos sobre la tasa de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Nepeta teydea</i> en un medio ½ MS	112
IV.3.1.3.1.1. Efecto de la benciladenina sobre la tasa de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Nepeta teydea</i> en un medio ½ MS	112
IV.3.1.3.1.2. Efecto de la benciladenina y el ácido naftalenacético sobre la tasa de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Nepeta teydea</i> en un medio ½ MS	114
IV.3.1.4. Fase de enraizamiento	116
IV.3.1.4.1. Efecto del tipo de explanto (apical o basal) en el enraizamiento de <i>Nepeta teydea</i>	116
IV.3.1.5. Fase de paso a tierra y aclimatación	119
IV.3.1.5.1. Efecto del tipo de explanto (apical o basal) en el paso a tierra y aclimatación de <i>Nepeta teydea</i>	119
IV.3.2. Resultado de la micropropagación de callos de <i>Nepeta teydea</i>	124
IV.3.2.1. Fase de inducción de callos de <i>Nepeta teydea</i>	124
IV.3.2.2. Fase de cultivo <i>in vitro</i> de callos de <i>Nepeta teydea</i>	134
IV. 4. Discusión	136
IV. 4.1. Discusión de la micropropagación de plantas de <i>Nepeta teydea</i>	136
IV. 4.1.1. Protocolo de esterilización	136
IV. 4.1.2. Fase de germinación	136
IV. 4.1.3. Fase de establecimiento	137
IV. 4.1.4. Fase de multiplicación	138
IV. 4.1.4.1. Efecto de la benciladenina sobre la tasa de multiplicación <i>in</i>	139

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

<i>in vitro</i> de <i>Nepeta teydea</i> en medio ½ MS	
IV. 4.1.4.2. Efecto de la benciladenina y el ácido naftalenacético sobre la tasa de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Nepeta teydea</i> en medio ½ MS	140
IV. 4.1.5. Fase de enraizamiento	140
IV. 4.1.6. Fase de paso a tierra y aclimatación	141
IV. 4.2. Discusión de la micropropagación de callos de <i>Nepeta teydea</i>	142
IV. 4.2.1. Fase de inducción de callos de <i>Nepeta teydea</i>	142
IV. 4.2.2. Fase de cultivo <i>in vitro</i> de callos de <i>Nepeta teydea</i>	144
IV.5. Bibliografía	145
V. ESTUDIO HISTOLÓGICO	151
V.1. Introducción	151
V.1.1. Histología. Generalidades	151
V.1.2. Técnicas histológicas y microscopía	151
V.1.3. Tejidos fundamentales de las plantas y adaptaciones al ambiente	153
V.1.3.1. Tejidos meristemáticos	153
V.1.3.2. Tejidos protectores	154
V.1.3.3. Tejidos parenquimáticos	155
V.1.3.4. Tejidos mecánicos o de sostén: colénquima y esclerénquima	156
V.1.3.5. Tejidos vasculares: xilema y floema	157
V.1.3.6. Xeromorfismo vs Escleromorfismo	157
V.1.4. Histología de la familia Lamiaceae	158
V.1.4.1. Histología de la hoja en la familia Lamiaceae	158
V.1.4.2. Histología del tallo en la familia Lamiaceae	160
V.2. Materiales y métodos	162
V.2.1. Microscopía óptica	162
V.2.1.1. Materiales	162

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

V.2.1.2. Metodología	163
V.2.1.2.1. Obtención del material vegetal	163
V.2.1.2.2. Técnicas de fijación, inclusión y microscopía de las muestras para microscopía óptica	164
V.2.1.2.3. Técnicas de tinción de las secciones para microscopía óptica	168
V.2.1.2.4. Obtención y observación de las fotomicrografías	170
V.2.1.2.5. Análisis fitodermológico	171
V.3. Resultados	173
V.3.1. Características estructurales de la hoja de <i>Nepeta teydea</i>	173
V.3.1.1. Plantas de campo (pC)	173
V.3.1.2. Plantas <i>in vitro</i> (pIV)	181
V.3.1.3. Plantas aclimatadas (pA)	188
V.3.1.3.1 Plantas aclimatadas <i>ex vitro</i> control (pA)	188
V.3.1.3.2 Plantas aclimatadas a condiciones <i>ex vitro</i> tratadas con luz ultravioleta (pA-UV)	195
V.3.2. Características estructurales del tallo de <i>Nepeta teydea</i>	202
V.3.2.1. Plantas de campo (pC)	202
V.3.2.2. Plantas <i>in vitro</i> (pIV)	207
V.3.2.3. Plantas aclimatadas (pA)	210
V.3.2.3.1 Plantas aclimatadas a condiciones <i>ex vitro</i> control (pA)	210
V.3.2.3.2 Plantas aclimatadas a condiciones <i>ex vitro</i> tratadas con luz ultravioleta (pA-UV)	213
V.3.3. Características estructurales de la raíz de <i>Nepeta teydea</i>	216
V.3.3.1. Plantas de campo (pC)	216
V.3.3.2. Plantas aclimatadas a condiciones <i>ex vitro</i> control (pA)	218
V.4. Discusión estudio histológico	221

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

V.4.1. Discusión estudio histológico de plantas de campo, plantas crecidas en condiciones <i>in vitro</i> y plantas aclimatadas a condiciones <i>ex vitro</i>	221
V.4.1.1. Anatomía de la hoja	221
V.4.1.1.1. Epidermis	221
V.4.1.1.2. Tejido fundamental	223
V.4.1.1.3. Tejido de sostén	225
V.4.1.1.4. Tejido vascular	225
V.4.1.2. Anatomía del tallo	226
V.4.1.2.1. Epidermis	226
V.4.1.2.2. Córtex	227
V.4.1.2.3. Esclerenquima y tejido vascular	228
V.4.1.3. Anatomía de la raíz	230
V.4.1.3.1. Epidermis	230
V.4.1.3.2. Córtex	230
V.4.1.3.3. Cilindro vascular	230
V.4.2. Discusión estudio histológico de plantas aclimatadas a condiciones <i>ex vitro</i> sin tratamiento con luz ultravioleta-b y plantas aclimatadas a condiciones <i>ex vitro</i> con tratamiento con luz ultravioleta-b	230
V.4.2.1. Anatomía de la hoja	231
V.4.2.1.1. Epidermis	231
V.4.2.1.2. Tejido fundamental	232
V.4.2.1.3. Tejido de sostén	233
V.4.2.1.4. Tejido vascular	233
V.4.2.2. Anatomía del tallo	234
V.5. Bibliografía	235
VI. ACTIVIDAD PEROXIDASA	241

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

VI.1. Introducción	241
VI.1.1. Peroxidasas. Generalidades	241
VI.1.2. Clasificación de las peroxidasas	242
VI.1.3. Naturaleza y estructura de las peroxidasas de la clase III	244
VI.1.4. Ciclo catalítico	246
VI.1.5. Funciones	247
VI.1.6. Localización subcelular de las peroxidasas e isoenzimas	248
VI.1.7. Aplicaciones biotecnológicas de las peroxidasas	250
VI.2. Material y métodos	254
VI.2.1. Inducción de estrés lumínico en plantas de <i>Nepeta teydea</i> . Tratamientos con radiación ultravioleta	254
VI.2.1.1. Material	254
VI.2.1.2. Metodología	255
VI.2.2. Ensayos Bioquímicos	259
VI. 2.2.1. Preparación de los extractos crudos de <i>Nepeta teydea</i>	259
VI.2.2.1.1. Material	259
VI.2.2.1.2. Metodología	260
VI.2.2.2. Determinación de la concentración de proteínas en las muestras vegetales	264
VI.2.2.2.1. Material	264
VI.2.2.2.2. Metodología	265
VI.2.2.3. Determinación de la actividad peroxidasa	268
VI.2.2.3.1. Material	269
VI.2.2.3.2. Metodología	270
VI.2.2.4. Estudio cinético de la especificidad por sustratos	273
VI.2.2.4.1. Material	274

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

VI.2.2.4.2. Metodología	275
VI.2.2.5. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad del enzima	275
VI.2.2.5.1. Material	275
VI.2.2.5.2. Metodología	276
VI.2.2.6. Determinación de sus parámetros cinéticos (K_M y V_{max})	277
VI.2.2.6.1. Material	279
VI.2.2.6.2. Metodología	279
VI.2.2.7. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	281
VI.2.2.7.1. Material	282
VI.2.2.7.2. Metodología	283
VI.2.2.8. Análisis estadístico	292
VI.2.3. Ensayos histoquímicos	292
VI.2.3.1. Detección de la actividad peroxidasa en cortes de hoja y tallo de <i>Nepeta teydea</i>	293
VI.2.3.1.1. Materiales	293
VI.2.3.1.2. Metodología	293
VI.2.3.1.2.1. Obtención de las muestras	293
VI.2.3.1.2.2. Procesamiento de las muestras para la histo-localización de la actividad peroxidasa	294
VI.2.3.1.2.3. Obtención y observación de las fotomicrografías	294
VI.3. Resultados	295
VI.3.1. Caracterización de la actividad peroxidasa en extractos de hojas y callos de <i>Nepeta teydea</i>	295
VI.3.2. Determinación de la temperatura y el pH óptimo para la peroxidasa de <i>Nepeta teydea</i>	300
VI.3.2.1. Determinación de la temperatura óptima	300
VI.3.2.2. Determinación del pH óptimo	301

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

VI.3.3. Determinación de la actividad peroxidasa en <i>Nepeta teydea</i> expuestas a luz UV	303
VI.3.3.1. Ensayos siguiendo el protocolo 1 para hojas	303
VI.3.3.2. Ensayos siguiendo el protocolo 1 para callos	304
VI.3.3.3. Ensayos siguiendo el protocolo 2 para hojas	308
VI.3.3.4. Ensayos siguiendo el protocolo 2 para callos	310
VI.3.4. Determinación de los parámetros cinéticos K_M y V_{max} de la peroxidasa de callos de <i>Nepeta teydea</i> expuestas a luz UV-B	313
VI.3.5. Identificación de las formas isoenzimas de peroxidasa de <i>Nepeta teydea</i> mediante electroforesis nativas	320
VI.3.6. Detección de la actividad peroxidasa en cortes de hojas y tallos de <i>Nepeta teydea</i>	327
VI.3.6.1. Sustrato DAB	327
VI.3.6.1.1. Hoja de plantas aclimatadas a condiciones <i>ex vitro</i> (pA)	327
VI.3.6.1.1.1. Luz blanca	327
VI.3.6.1.1.2. Luz UV-B	330
VI.3.6.1.2. Tallo de plantas aclimatadas a condiciones <i>ex vitro</i> (pA)	332
VI.3.6.1.2.1. Luz blanca	332
VI.3.6.1.2.2. Luz UV-B	332
VI.3.6.2. Sustrato guaiacol	335
VI.3.6.2.1. Hoja y tallo de plantas aclimatadas a condiciones <i>ex vitro</i> (pA)	335
VI.3.6.2.1.1. Luz blanca	335
VI.3.6.2.1.2. Luz UV-B	338
VI.4. Discusión	341
VI.4.1. Actividad peroxidasa en plantas de <i>Nepeta teydea</i>	341
VI.4.2. Respuesta a la luz ultravioleta de diferentes tejidos de <i>Nepeta teydea</i>	342

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

VI.4.3. Variación en los parámetros cinéticos de las peroxidasas de <i>Nepeta teydea</i> : K_M y V_{max}	345
VI.4.4. Detección de peroxidasas de <i>Nepeta teydea</i> en PAGE	345
VI.4.5. Detección de la actividad peroxidasa en cortes de hoja y tallo de <i>Nepeta teydea</i>	346
VI.4.6. Discusión estudio histoquímico de las peroxidasas de plantas aclimatadas a condiciones <i>ex vitro</i> expuestas a luz UV	374
VI.4.6.1. Histo-localización de las peroxidasas de las peroxidasas en secciones de hojas expuestas a luz UV	374
VI.4.6.2. Histo-localización de las peroxidasas en secciones de tallos expuestas a luz UV	378
VI.5. Bibliografía	360
VII. CONCLUSIONES	362

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

ABREVIATURAS

½ MS: medio Murashige & Skoog (1962) con los macronutrientes, micronutrientes y vitaminas a la mitad de su concentración

½ MS0: medio Murashige & Skoog (1962) con los macronutrientes, micronutrientes y vitaminas a la mitad de su concentración, y sin la adición de reguladores de crecimiento.

Ab: abaxial

ABA: ácido abscísico

Abs: absorbancia

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiozol 6-sulfónico)

Ad: adaxial

ADN o DNA: ácido desoxirribonucleico

AG₃: ácido giberélico

AIA: ácido indolacético

AIB: ácido indobutírico

ANA: ácido naftalenacético

AOPTP: peroxidasa de palma africana (*Elaeis guineensis*)

AOX: sustancias antioxidantes

APX: ascorbato peroxidasa

AsA: ácido ascórbico

Asp: asparagina

atm: atmósfera

ATP: adenosín trifosfato

BA: benciladenina

BAP: benciladenopurina

I

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- BCPx:** peroxidasas catalasas de bacterias
- BSA:** del inglés “bovine serum albumine” o albúmina bovina sérica
- BRs:** brasinosteroides
- c:** córtex
- CAT:** catalasa
- CcP:** citocromo c peroxidasa
- CEP:** peroxidasa de palmera *Chamaerops excelsa*
- CFCs:** clorofluocarbonos
- CPDs:** dímeros pirimidina ciclobutano
- CP47:** proteína PsbC del fotosistema II
- CP43:** proteína PsbC del fotosistema II
- cm:** centímetro
- CO₂:** dióxido de carbono
- CoI:** compuesto I, primera forma enzimática intermedia de las peroxidasas
- CoII:** compuesto II, segunda forma enzimática intermedia de las peroxidasas
- Cp:** cloroplastos
- Cq:** colénquima
- Cs:** cámara subestomática
- CV:** cambium vascular
- E:** epidermis
- EC:** del inglés “enzyme commission numbers”
- EDTA:** etilén- diamino-tetra-acético.
- ELISA:** del inglés “enzyme-linked immunosorbent assay”

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- DHAR:** reductasa deshidroascorbato
- D1:** proteína PsbA del centro de reacción del fotosistema II
- D2:** proteína PsbD del centro de reacción del fotosistema II
- F:** floema
- FAA:** formaldehído acético
- Fig:** figura
- g:** gramo
- GA₃:** ácido giberélico
- GA₇:** giberelina
- Gly:** glicina
- GlyBet:** betaina glicina
- GSH:** glutatión
- GST:** glutatión S-transferasa
- GPRs:** reguladores del crecimiento vegetal
- GPX:** peroxidasa guaiacol
- GR:** reductasa glutatióm
- g/ml:** gramo por milímetro
- h:** horas
- His:** histidina
- HR:** humedad relativa
- HRP-C o cHRP:** Isoenzima c de la peroxidasa de rábano picante
- HV:** haz vascular
- H_z:** hercios

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

IAA: ácido indolacético

J/m²: Julios por metro cuadrado

kDa: kiloDalton

KIN: quinetina

Kj/m²: kilojulios por metro cuadrado

Km: Kilometro

K_M: constante de Michaelis-Menten

K_M ap: constante de Michaelis-Menten aparente

Kpb: Kilopares de bases

L: Litro

m: metros

Me: médula

MEB: microscopio electrónico de barrido

m²: metros cuadrados

m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar

mg: miligramo

mg/ml: miligramos por mililitros

mg/l: miligramos por litros

mili-Q: ultrapura

min: minutos

ml: mililitro

ml/l: mililitros por litros

mM: milimolar

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

mM⁻¹cm⁻¹: milimolar por centímetro

mm: milímetro

MnP: manganeso peroxidasa

MO: microscopio óptico

M&S= MS: medio Murashige & Skoog

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

Nº: número

nm: nanómetro

p: parénquima

PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida, del inglés “polyacrilamide gel electrophoresis”

PAR: radiación fotosintética activa

pI: punto isoelectrico

Pro: prolina

p/v: relación peso-volumen

pb: pares de bases

PB: tampón fosfato

PBe: tampón fosfato de extracción

PBS: tampón fosfato salino

pe: parénquima esponjoso

pf: peso fresco

pi: parénquima interfascicular

pm: parénquima en empalizada

V

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

POD: peroxidasa

PPO: oxidasa polifenol

ppm: partes por millón

ps: peso seco

PSI: fotosistema I

PSII: fotosistema II

ROS: del inglés “reactive oxygen species”, especies reactivas de oxígeno

px: parénquima xilemático

R: raíz

RER: retículo endoplasmático rugoso

R_F: Ratio of Front. Constante utilizada en las cromatografía de capa fina para medir la retención de un componente

rpm: revoluciones por minuto

RPTPT: peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*)

s: segundos

Sc: esclerénquima

SDS: dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en dodecil sulfato sódico (condiciones desnaturalizantes) buscar lo que significa en inglés (“SDS-polyacrilamide gel electrophoresis”).

SOD: superóxido dismutasa

Sorb: sorbitol

St: estoma

t: tiempo

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

TEMED: N, N, N', N'- tetrametiletilendiamina

THI o TDZ: tidiazuron

TM: tasa de multiplicación

TRIS-base: tris (hidroximetil) aminometano

Tween 80: nombre comercial del polisorbato 80

U: unidades enzimáticas

UAb: unidades de absorbancia

UV: radiación ultravioleta

UV-a: radiación ultravioleta A

UV-b: radiación ultravioleta B

UV-c: radiación ultravioleta C

v: cilindro vascular

V: voltios

V₀: velocidad inicial de reacción

V_{max ap}: velocidad máxima aparente

var: variedad

Vis: región del visible

V_{max}: velocidad máxima

Volt: voltaje

v/v: relación volumen/volumen

w: vatios

W/m²: vatio por metro cuadrado

w/v: relación peso/volumen

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

X: xilema

μg: microgramos

μ Em⁻²s⁻¹: microeinstein por metro cuadrado por segundo

μmol/m²s: micromoles por metro cuadrado por segundo

μl: microlitros

μm: micras

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

SÍMBOLOS Y FÓRMULAS

2 iP: isopenteniladenina

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2,4,5-T: ácido 2,4,5- triclorofenoxiacético

6-4 PPs: dímeros de pirimidina pirimidona

A_{XXX}: absorbancia de luz a XXX nm

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiozol 6-sulfónico)

AH₂: donador de hidrógeno en forma reducida. (Cualquier sustrato reductor de ciclo catalítico)

AH[•]: donador de hidrógeno en forma oxidada. (Radical libre de cualquier sustrato reductor del ciclo catalítico)

C: carbono

Ca(ClO)₂: hipoclorito cálcico

Ca⁺²: ión calcio

Cl₂Ca: cloruro de calcio

CoCl₂: cloruro de cobalto

CuSO₄: sulfato de cobre (II) o sulfato cúprico

Cu⁺²: cobre

°C: grados centígrados

CO₂: dióxido de carbono

ε: Absortividad molar

Fe: hierro

Fe⁺²: ión ferroso

Fe⁺³: ión férrico

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- H₃BO₃**: ácido bórico
- HCl**: ácido clorhídrico
- H₂O₂**: peróxido de hidrógeno
- HO·**: Radical hidroxilo
- H₂SO₄**: ácido sulfúrico
- IK**: ioduro de potasio
- K**: potasio
- KH₂PO₄**: sulfato de potasio
- KNO₃**: nitrato de potasio
- Mg**: magnesio
- MgSO₄**: sulfato de magnesio
- Mn₂SO₄**: sulfato de magnesio
- N**: nitrógeno
- NaClO**: hipoclorito sódico
- NaMoO₄**: molibdato de sodio
- NaOH**: hidróxido de sodio
- NH₄NO₃**: nitrato de amonio
- NO_x**: óxidos de nitrógeno
- OH·**: Radical hidroxilo
- O₂⁻**: radical superóxido
- O₂⁻**: Anión superóxido
- ¹O₂**: Oxígeno singlete
- O₂**: oxígeno

X

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

O₃: ozono

P: fósforo

PO₄HK₂: difosfato de potasio

PO₄H₂K: monofosfato de potasio

[S]: concentración de sustrato

S: azufre

S₂O₈⁻: ión persulfato

SO₂: dióxido de azufre

ZnSO₄: sulfato de cinc

ΔAb: incremento de absorbancia

Δt: incremento de tiempo

% p/v: porcentaje peso/volumen

λ: longitud de onda

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

INTRODUCCIÓN

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. LA LUZ

I.1.1. RADIACIÓN SOLAR

La radiación solar se define como el flujo de energía que recibimos del Sol en forma de ondas electromagnéticas de diferentes frecuencias, y es uno de los principales factores ambientales que afectan a la vida del planeta Tierra, puesto que controla el funcionamiento de todos los ecosistemas (terrestres y acuáticos), por su acción sobre los procesos fotobiológicos (fotosíntesis, fotoperíodo, fototropismos, etc.) y los factores ambientales (temperatura, humedad, etc.) (Carrasco-Ríos, 2009).

La luz es un factor que tiene altísima relevancia para el desarrollo de los vegetales, por tratarse de organismos fotoautótrofos (usan la luz solar como fuente de energía). Sólo las radiaciones fotosintéticamente activas (PAR), que se corresponden con el rango de la luz visible (400-700nm), son las usadas por las plantas como fuente de energía para la reducción del CO₂ y la generación de hidratos de carbono durante el proceso de la fotosíntesis.

Además de ser la principal fuente de energía de las plantas, la luz también es una señal ambiental crucial para lograr la supervivencia de los vegetales, ya que es utilizada por las plantas para adquirir información precisa sobre el ambiente lumínico en el que está creciendo (fotoperíodo, irradiancia, dirección de la luz y composición espectral o calidad de la luz), y así ajustar su crecimiento y desarrollo, lo cual le permite adaptarse y responder de manera adecuada a los distintos cambios en las condiciones medioambientales (Linden H, 2002).

Esta radiación solar que ha permitido la vida en nuestro planeta, puede ser perjudicial en altas intensidades, afectando en particular, a las plantas que son incapaces de moverse, y a las que sólo les queda adaptarse a dichos cambios. (Carrasco-Ríos, 2009).

I.1.2. ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO

El espectro electromagnético (Fig. 1.1) está formado por todas las ondas de diferente longitud y frecuencia (radiaciones electromagnéticas), y se encuentra ordenado siguiendo determinados criterios como son la fuente que las origina y los efectos que son capaces de provocar.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Las radiaciones del espectro se dividen en las radiaciones ionizantes y las no ionizantes. Las primeras son radiaciones de alta frecuencia que son muy energética, y son capaces de ionizar átomos (arrancar electrones a los átomos, quedando cargados eléctricamente, es decir, iones). Aquí se encuentran, los rayos X, los rayos gamma y la radiación ultravioleta. Estas radiaciones pueden producir alteraciones genéticas y ciertas enfermedades, por ejemplo, el cáncer.

Las radiaciones no ionizantes, son aquellas que presentan suficiente energía como para generar calor, pero en ningún caso se produce la ionización de átomos. Aquí se encuentran, las ondas de radio, microondas, infrarrojos y la luz visible.

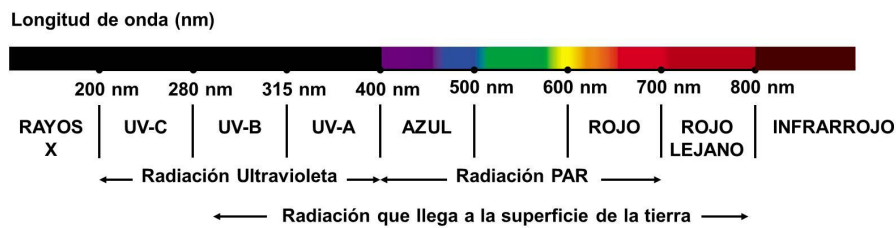


Figura 1.1.- Espectro electromagnético solar, adaptado de Taiz y Zeiger, 2002.

1.2. RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

La radiación ultravioleta (UV), que se encuentran localizados entre los rayos X y la región visible, representa solamente una pequeña porción de la radiación solar que llega a la superficie terrestre (constituye el 7% de la radiación emitida por el sol) (Frohnmeier & Staiger, 2003). Sin embargo, su impacto en los procesos biológicos es considerado de gran importancia (Björn et al., 2002; Jordan, 2002).

En el espectro electromagnético, la región ultravioleta está comprendida entre longitudes de onda que van desde los 400 a los 100nm. A lo largo de esta región, podemos diferenciar tres tipos de radiación UV en función de las longitudes de ondas y de los efectos que son capaces de producir en los seres vivos:

- La radiación UV-c (100-280nm): se trata de una radiación muy energética y dañina para los seres vivos y bajo su exposición no sería posible la vida en la Tierra, pero al ser completamente absorbida por el ozono de la atmósfera, estos rayos no llegan alcanzar nunca la superficie terrestre.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- La radiación UV-b (280-315nm): una parte de esta radiación es absorbida por el ozono, pero un porcentaje de aproximadamente un 10% de ella alcanza la superficie terrestre afectando a los seres vivos.
- La radiación UV-a (315-400nm): esta radiación es poco absorbida por el ozono, de manera que, llega en mayor cantidad a la superficie de la Tierra. No obstante, se trata de una radiación poca dañina para los organismos (Carrasco-Ríos, 2009).

1.2.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA QUE ALCANZA LA SUPERFICIE TERRESTRE

Uno de los principales factores que afectan a la radiación UV que llega a la Tierra es su interacción con la atmósfera, de manera que cuando la radiación ultravioleta atraviesa la atmósfera es absorbida principalmente por el ozono, impidiendo que estos rayos lleguen a la superficie terrestre (Fig. 1.2). Sin embargo, los estudios que se han venido realizando en los últimos años, confirman que la reducción del contenido del ozono atmosférico, debido principalmente a la liberación antrópica de compuestos contaminantes como los clorofluorocarbonos (CFCs), óxidos de nitrógeno y bromuro de metilo, está provocando aumentos en la radiación UV que llega a la superficie de la Tierra (Carrasco-Ríos, 2009).

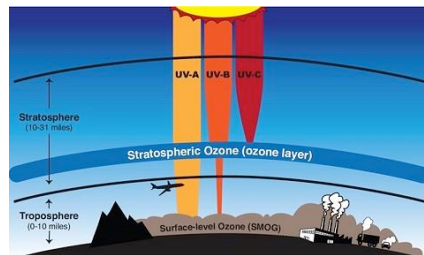


Figura 1.2.- Radiación ultravioleta que alcanza la superficie terrestre. A medida que la luz pasa a través de la atmósfera parte de la radiación incidente es absorbida por la capa de ozono (Denmark, 2015).

Aparte de la absorción por el ozono estratosférico, la radiación UV que alcanza la superficie terrestre viene condicionada por una gran variedad de factores (Mckenzie et al., 2003; Paul & Gwynn-Jones, 2003). Uno de los principales factores que afectan a los niveles de UV-b a la que están expuestas las plantas es el ángulo cenital solar (que determina la trayectoria de la luz a través de la atmósfera, y está condicionado por la hora

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

del día, posición geográfica y época del año). Debido a éste ángulo, la radiación UV-b es mayor en los trópicos y menor en latitudes más altas, y las intensidades de UV-b son mayores en verano que en invierno. Otro factor significativo es la altitud sobre el nivel del mar, que incrementa los niveles de UV-b debido a que hay una disminución de la masa de aire o espesor atmosférico que tiene que atravesar la radiación UV en un lugar elevado (Madronich et al., 1995; McKenzie et al., 2003). Los niveles de UV-b también varían con las condiciones meteorológicas. La nubosidad, afecta tanto a la intensidad como a la composición espectral de la radiación ultravioleta, y efecto de atenuación se debe a la reflexión de la radiación UV por las gotas de agua o los cristales de hielo que forman la nube y la presencia de partículas o absorbentes en su interior (Madronich et al., 1998; Mayer et al., 1998). Otro factor es la polución atmosférica (los aerosoles y la presencia de gases contaminantes), que puede tener un efecto importante sobre la transmisión de la radiación UV-b hacia la superficie de la Tierra y su repercusión depende del número de partículas y de su composición físico-química (hollín, polvo, neblina, humo, ceniza, aerosoles marinos, etc.). Por último, hay que tener en cuenta el albedo superficial (parte de la radiación UV que alcanza la superficie terrestre y que vuelve reflejada al espacio (no es absorbida), que depende de las propiedades de la superficie, y generalmente es menor del 10% (hierba, tierra y agua), aunque existen excepciones (Diffey, 2002).

1.2.2 EFECTOS DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE LAS PLANTAS

Estos rayos UV-b cargados altamente de energía, resultan nocivos para la vida, al producir efectos negativos en la mayoría de los seres vivos (Day & Neale, 2002; Pahkala et al., 2002; Ries et al., 2000; Roleda et al., 2004), pero en especial, sobre organismos sésiles que no pueden escapar de su acción, como es el caso de las plantas.

La acción de la radiación UV-b sobre las plantas ha sido motivo de estudio en las últimas décadas, y para ello se han usado una amplia gama de especies vegetales, en diferentes estadios del desarrollo vegetal, bajo distintas condiciones de crecimiento, y ensayando con varias calidades espectrales, cantidades y duración de los tratamientos de UV-b. Aunque estos estudios son difíciles de comparar, se pueden establecer algunas conclusiones generales. En primer lugar, la UV-b genera un fuerte impacto sobre las plantas, provocando cambios en la expresión de genes, que pueden mediar cambios en la fisiología, el crecimiento, el desarrollo y la morfología (Tevini & Teramura, 1989;

4

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Frohnmeier & Staiger, 2003; Stratmann, 2003). En segundo lugar, los tratamientos llevados a cabo con diferentes tasas de flujo, irradiancia, duración y longitud de onda de UV-b, producen respuestas totalmente diferentes (Brosché & Strid, 2003; Frohnmeier & Staiger, 2003). Además, hay que tener en cuenta que estas respuestas provocadas por las plantas sometidas a tratamientos de UV-b, se pueden ver alteradas por otras variables como son la temperatura, el agua, el estado nutricional, etc (Caldwell et al., 2003; Frohnmeier & Staiger, 2003; Kakani et al., 2003). En general, se observa que en condiciones de campo los efectos de la UV-b sobre las plantas son más moderados que bajo condiciones de ambientes controlados (Caldwell et al., 2003).

A continuación, se describirán todas las alteraciones inducidas por la radiación UV-b en las plantas, y que incluyen efectos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Fig. 1.3).

Los efectos morfológicos y anatómicos inducidos en las plantas por la radiación UV-b, incluyen muchos cambios como es la reducción de la altura de la planta (Reddy et al., 2013) causada por la formación de internudos más cortos, el incremento de ramificaciones auxiliares (Meijkamp et al., 2001; Li et al., 2010), lo que conduce a plantas más cortas y más compactas (Kakani et al., 2003; Caldwell et al., 2007), y es habitual, encontrar hojas con síntomas de clorosis y necrosis. Uno de los parámetros de crecimiento que se ven notablemente alterado por esta radiación es el área foliar de diferentes especies (Carrasco-Ríos, 2009; Kakani et al., 2003; Caldwell et al., 2007). Otras modificaciones que las plantas han adquirido para evitar o disminuir la penetración de la radiación UV-b en sus tejidos, es el aumento del número de tricomas en la superficie adaxial de la hoja (Carrasco-Ríos, 2009, el aumento del grosor de la hoja, el aumento de ceras y el cambio de su composición de éstas en la superficie de las hojas (Tevini & Teramura, 1989; Ballaré et al., 1996; Björn, 1996; Rozema et al., 1997; Jansen et al., 1998; Pinto et al., 1999; Frohnmeier & Staiger, 2003; Semerdjieva et al., 2003).

Otros cambios morfogénéticos causados por la radiación UV-b implican el retraso en la emergencia de la plántula, de la floración y en la madurez de los frutos (Zinser et al., 2007; Wang et al., 2012), y también, puede afectar a los patrones de desarrollo de las raíces y rizomas (con una disminución de la longitud de la raíz) (Kumari et al., 2009). Otros cambios observados es la reducción de la biomasa (Kakani et al., 2003; Ruhland et al., 2005) que se traduce finalmente en una reducción del rendimiento del cultivo (Searles et al., 2001; Golaszewsha et al., 2003).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

La radiación UV-b que consigue penetrar a través de las hojas, tienen un impacto directo sobre el mantenimiento y funcionamiento del aparato fotosintético. De manera que, en los estudios realizados con diferentes especies vegetales, se han observado que la radiación UV-b provoca la destrucción de las membranas de los cloroplastos, desorganización de granas, disminución del número de cloroplastos, reducción del número y diámetro de los tubos xilemáticos, una disminución de la frecuencia estomática (Carrasco- Ríos, 2009; (Hollósy, 2002), dilatación de la membrana nuclear, retículo endoplasmático con cisternas hinchadas, vesiculación en el estroma de los cloroplastos, retículo endoplasmático y tonoplasto, ruptura de plasmalema y del tonoplasto, y en las células del mesófilo, se puede apreciar daños en las mitocondrias, alteraciones en los dictiosomas y en el retículo endoplasmático (Hollósy, 2002). En cuanto a las investigaciones llevadas a cabo en células vegetales *in vitro* expuestas a radiación UV-b, se observa cambios que incluye alteraciones en el retículo endoplasmático que presenta cisternas características (con abundante desarrollo del retículo endoplasmático rugoso), la matriz de las mitocondrias presenta mayor número de cristales, los dictiosomas tienen asociados muchas vesículas, aparecen con frecuencia pequeñas vesículas y ribosomas libres en el citoplasma, la pared celular es fina, y algunas plasmalema se invaginan hacia el centro de la célula. También se aprecia que hay algunos plástidos que contienen grandes depósitos de almidón, mientras que otros no contienen almidón (Hollósy, 2002).

Los efectos fisiológicos causados por la radiación UV-b incluyen la reducción en la actividad fotosintética, debido principalmente a la degradación de las proteínas del PSII (Sullivan et al., 2003), destrucción de las clorofilas y carotenoides (Surabhi et al., 2009), reducción de la actividad Rubisco (Yu et al., 2013) y efectos en las funciones estomáticas (Cooley et al., 2000).

Los sitios del aparato fotosintético que se ven afectados principalmente por la luz UV-b es el fotosistema II (PSII) y el fotosistema I (PSI), siendo el PSII muchísimo más sensible a la radiación UV-b que el PSI. La función del PSII depende de las proteínas que lo conforman, y cualquier alteración producida en ellas por la luz UV-b afectará a los pigmentos asociados y a otros cofactores que hacen en conjunto posible el proceso fotosintético. De manera general, la luz UV-b induce la pérdida de la función de las proteínas del PSII como son D1, D2, CP47, CP43 y también afecta a las enzimas del ciclo de Calvin (Carrasco- Ríos, 2009).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

La fotoinhibición del PSII en condiciones de alta radiación UV-b, produce la interrupción del transporte de electrones, y que termina por afectar finalmente la producción de ATP y NADPH, elementos esenciales en la fijación de CO₂ en el ciclo de Calvin (Carrasco-Ríos, 2009)

Distintas investigaciones han mostrado, que la radiación UV-b produce la disminución de la ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa (Rubisco) que cataliza la incorporación de CO₂ en el ciclo de Calvin. La disminución de la actividad del enzima Rubisco es atribuida en la mayoría de los casos a una baja disponibilidad de sustrato ribulosa-1,5-bisfosfato, que ocurre a causa de la disminución de la velocidad máxima del transporte de electrones (Carrasco-Ríos, 2009).

Varios estudios han demostrado que en condiciones de alta irradiancia de UV-b, la fotosíntesis se ve disminuida, porque se ve afectado la densidad como la apertura estomática (se produce una reducción en la conductancia estomática). De hecho, la luz UV-b actúa directamente en los mecanismos de control de apertura de las células guardas (Hollós, 2002).

La radiación UV-b puede afectar a las proteínas, causando la modificación o destrucción de algunos aminoácidos (fotólisis de aminoácidos aromáticos, o de grupos disulfuros que se encuentran en el sitio activo), y que pueden conducir a la inactivación de proteínas o enzimas (como ya se ha mencionado anteriormente, como ocurre en el caso del enzima Rubisco y de las subunidades proteicas de los fotosistemas II y I). Pero, existen otras proteínas que se pueden ver afectadas por la acción de la radiación UV-b, como son el caso de los componentes proteicos del citoesqueleto vegetal, los microtúbulos (Staxén et al., 1993), la tubulina (Zaremba et al., 1984), etc, que finalmente pueden afectar a las distintas fases del ciclo celular (Staxén et al., 1993).

Los lípidos también pueden ser fotoquímicamente modificados por la absorción de la radiación UV-b. Tanto los fosfolípidos como los glicolípidos (principales componentes de las membranas celulares vegetales) contienen ácidos grasos insaturados, que son destruidos por la radiación UV-b en presencia de oxígeno (Kramer et al., 1991; Panagopoulos et al., 1990). El daño oxidativo puede ser detectado por la peroxidación lipídica. Este proceso, puede producir la pérdida de estructura y función de las membranas (Mishra & Singhal, 1992; Murphy & Vu, 1996), o conduce a cambios en la composición de los lípidos de membrana de los cloroplastos (Hugly et al., 1989).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Otro tipo de macromoléculas que se pueden ver afectadas por la acción de la radiación UV-b son las fitohormonas. Las alteraciones en sus concentraciones, son probablemente la razón de los cambios en el crecimiento, desarrollo y floración de la planta (Yang et al., 1993), especialmente en el caso de las auxinas y brasinoesteroides, que fomentan la elongación celular y el crecimiento. De hecho, se ha informado que la radiación UV-B produce la fotooxidación del ácido indolacético 3 (IAA) en plántulas de girasol (Ros & Tevini, 1995), y la reducción de la concentración del IAA puede ser responsable de la inhibición del crecimiento del hipocotilo (Carrasco-Ríos, 2009).

Otros ensayos llevados a cabo con una auxina sintética, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), han demostrado que la radiación UV-b produce su destrucción, y es convertida en 2,4-diclorofenol, que es considerado un veneno para las células (Bell, 1956). Otra fitohormona que absorbe fuertemente este tipo de radiación y que es inactivada por fotólisis es el ácido abscísico (ABA) (Lindo et al., 1979). Sin embargo, otras fitohormonas como es el caso de las giberelinas, estimulan el crecimiento de plántulas bajo condiciones de UV-b (Ballaré et al., 1991), y el etileno es producido en mayor medida en plantas irradiadas con radiación UV-B (Ros & Tevini, 1995).

Otras moléculas que se ven afectadas, son los pigmentos del aparato fotosintético de las plantas, que pueden ser destruidos por la radiación UV-b, y que conlleva a una pérdida de la capacidad fotosintética (Strid et al., 1990; Jordan et al., 1994). Las clorofilas y los carotenoides (en menor medida) se ven negativamente afectados por la radiación UV-b. En las clorofilas, se aprecia una mayor reducción en la cantidad de clorofila b que de clorofila a (Hollósy, 2002).

En cuanto a los efectos bioquímicos inducidos por la radiación UV-b, se ha reportado la estimulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios, principalmente compuestos fenólicos que absorben la UV, que se acumulan en las vacuolas de las células epidérmicas (Hahlbrock & Scheel, 1989; Kakani et al., 2003). También se produce la acumulación en la epidermis de flavonoides, sustancias que proporcionan protección a la frente a la radiación UV-b, ya que absorben fuertemente la UV-b, limitando su penetración en los tejidos de las hojas (Caldwell et al., 1983; Frohnmeyer & Staiger, 2003; Hollósy, 2002). Se ha encontrado una correlación entre el contenido de flavonoides y la sensibilidad a la radiación UV-b en distintas especies (Tevini & Teramura, 1989), de hecho, genotipos mutantes incapaces de producir flavonoides son muchísimo más

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

susceptible al daño por la radiación UV-b que las plantas silvestres (Li et al., 1993; Stapleton & Walbot, 1994; Landry et al., 1995).

En cuanto a los terpenoides, los estudios llevados a cabo, indican que la radiación UV-b induce el aumento del contenido de terpenos (Maffei & Scannerini, 2000) en hojas de varias especies. Dentro de este grupo de metabolitos, se encuentran también los carotenoides, que son pigmentos accesorios con un rol fotoprotector, y que aparentemente no son afectados en ciertas especies, pero en otras especies, se ha observado una marcada reducción en condiciones de elevada radiación UV-b (Carrasco- Ríos, 2009).

Se ha demostrado que las antocianinas tienen un papel protector frente a la radiación UV-b, mostrando propiedades fuertemente antioxidantes al atrapar especies reactivas de oxígeno en células vivas *in vitro*, y protegiendo a plantas de maíz del daño generado en el DNA por la UV-b (Carrasco-Ríos, 2009).

En cuanto a los efectos moleculares, diferentes autores han descrito los posibles efectos en las plantas expuestas a niveles altos de la UV-b, y han llegado a ciertas conclusiones, que incluyen los daños celulares directos en el ADN (además de daños en macromoléculas sensibles como las proteínas y lípidos) (Mazza et al., 1999). El ADN es especialmente sensible a la radiación UV-b, y la fototransformación que tiene lugar sobre ella, afecta a las bases de timina adyacentes, formando estructuras cíclicas que se denominan dímeros pirimidina ciclobutano (CPDs). Además, se inducen la formación de otro fotoproducto entre bases adyacentes de timina y citosina denominado dímeros de pirimidina pirimidona (6-4 PPs). Estas lesiones en el ADN alteran los procesos de transcripción de genes y la duplicación del ADN. (Carrasco-Ríos, 2009).

Hay que tener en cuenta, que en función de la intensidad de la radiación UV-b, las alteraciones que se producen en la planta son diferentes. De modo que a baja incidencia de UV-b, se estimulan algunos genes que están involucrados en procesos de protección frente a la radiación UV-b (Brown et al., 2005), como son los genes responsables de la producción de flavonoides y compuestos fenólicos. Sin embargo, a alta incidencia de UV-b, esta radiación actúa como una agente perjudicial causando daño en las biomoléculas por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hollósy, 2002; Jain et al., 2003; Kliebenstein et al., 2002). Bajo estas condiciones y para defenderse de las ROS, la planta produce sustancias antioxidantes como son el ácido ascórbico y el alfa-tocoferol (Kliebenstein et al., 2002; Jain et al., 2003), y aumenta la actividad de las enzimas

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

antioxidantes como la dismutasa superóxido, la peroxidasa ácido ascórbico, la reductasa glutatión y la peroxidasa guaiacol (Jain et al., 2003; Kataria et al., 2007).

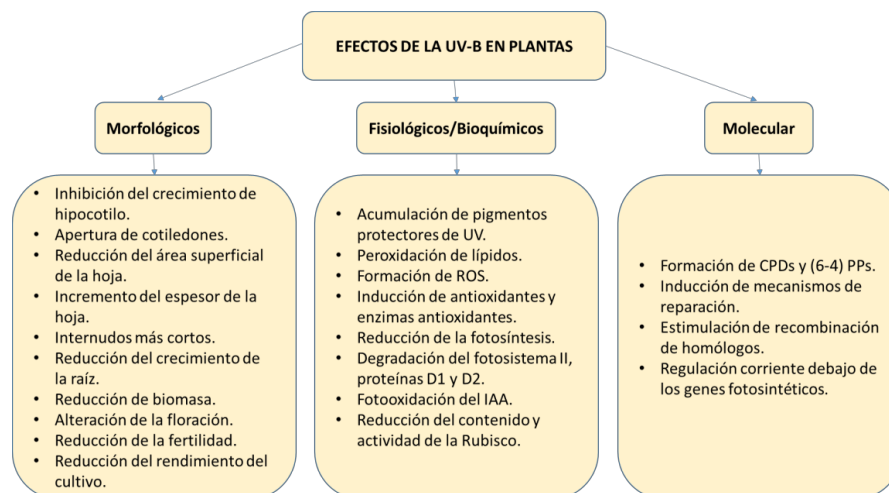


Figura 1.3.- Alteraciones moleculares, bioquímicas, fisiológicas y morfológicas inducidas por la radiación UV-b en las plantas (Kataria, et al., 2014).

1.2.3. PLANTAS ACLIMATADAS A CONDICIONES DE ALTA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA. PLANTAS DE ALTA MONTAÑA.

La radiación UV-b que alcanza la superficie terrestre no lo hace de manera homogénea (Fig. 1.4), ya que como se ha comentado anteriormente hay un gran número de factores que influyen en dicha radiación. La destrucción de la capa de ozono ha sido más intensa en las latitudes altas, en especial en la Antártida, donde las concentraciones de ozono han disminuido entre un 40-50% respecto a los valores obtenidos en 1980, mientras que los cambios son mínimos en el Ecuador, entre un 3-6%, donde la radiación UV es intensa por naturaleza. (Carrasco-Ríos, 2009).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

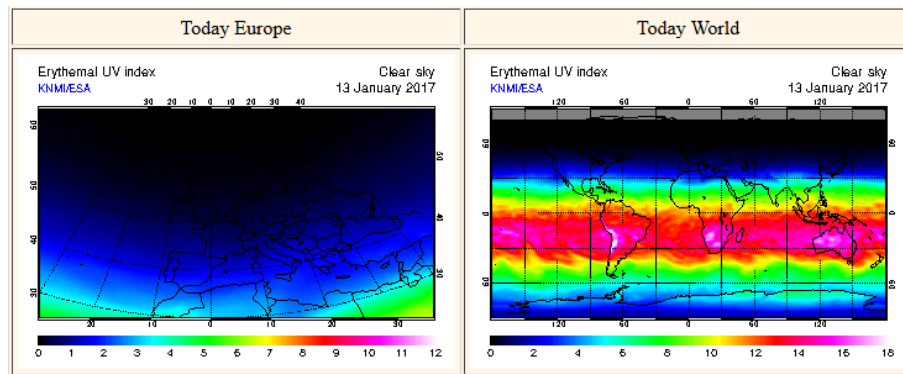


Figura 1.4.- Mapas que muestran la concentración de rayos UV en la región de Europa y a nivel mundial (TEMIS, 2017).

Las principales características que presentan las plantas aclimatadas a condiciones de alta radiación UV-b, es que sus tallos y ramas son cortas, por lo que las plantas presentan pequeña altura y un porte almohadillado, (creando así, un microclima en su interior, donde las condiciones de temperatura, radiación y humedad quedan amortiguadas). Esta disminución de la altura de las plantas se ha relacionado directamente con la inducción de internudos más cortos en distintas especies. Se ha sugerido que el mecanismo por el cual la radiación UV-b reduce la longitud del tallo sería la fotooxidación del ácido indolacético (IAA, fitohormona inductora del tamaño de las células) (Carrasco-Ríos, 2009).

Bajo estas condiciones ambientales, las plantas han evolucionado adquiriendo rasgos xeromorfos como es la reducción de la superficie transpirante (tallos-hojas), en especial, del área foliar, causada por la inhibición de la expansión de las células epiteliales de las hojas y de la división celular. Otro cambio que se ha producido en las plantas para modificar la intercepción y la penetración de esta radiación en sus células, es el engrosamiento de la cutícula, y el aumento de ceras en la superficie foliar. Con ello, se consigue favorecer la reflexión de la luz UV-b desde la hoja y evitar así la penetración de esta luz en el interior de sus tejidos (Carrasco-Ríos, 2009).

Se ha observado que la radiación UV-b conduce a un aumento del grosor de la hoja (debido a que se produce un aumento del grosor de la pared celular como consecuencia de la inducción de la síntesis de lignina y otros polifenoles), a una disminución del número de cloroplastos en diversas especies vegetales (las plantas adquieren tonos blanquecinos o grisáceos, que reflejan las radiaciones solares), un mayor

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

número de tricomas en la superficie de la cara adaxial, así como una disminución de la frecuencia estomática (Carrasco-Ríos, 2009).

Además de todas estas modificaciones morfológicas y anatómicas, la radiación UV-b produce cambios a nivel metabólicos. Una de las adaptaciones más documentadas, es el aumento de la producción de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides, que se acumulan especialmente en las células epidérmicas. Se trata de compuestos que absorben fuertemente la radiación UV-b, disminuyendo los efectos negativos que puede producir en la planta. (Carrasco- Ríos, 2009).

I.3. ESTRÉS EN PLANTAS

Las plantas son organismos sésiles, que en la naturaleza se deben de enfrentar diariamente al ataque de diversos agentes patógenos y a las condiciones adversas del propio medio en el que viven (Glazebrook, 2005). Por ello, en los últimos años ha aumentado notablemente el número de publicaciones científicas relacionadas con el estrés vegetal y su detección.

I.3.1. CONCEPTO DE ESTRÉS EN FISIOLÓGIA VEGETAL

El estrés vegetal se define, como un factor externo a la planta que ejerce una influencia negativa sobre su desarrollo, alterando su estado fisiológico provocando una desviación significativa de las condiciones óptimas para su crecimiento y desarrollo (Azcón-Bieto & Talón, 2008). Se trata de un conjunto de respuestas bioquímicas o fisiológicas que generan un estado particular del organismo, diferente al observado bajo un rango de condiciones óptimas y que incluye lo que se conoce como adaptación y acomodación (Basurto et al., 2008). Estos dos últimos conceptos hacen referencia a aquellas modificaciones heredables, que aumentan la probabilidad de que la planta sobreviva y se reproduzca en un ambiente dado (Azcón-Bieto & Talón, 2008).

Hay que señalar que, un entorno desfavorable para una especie puede no serlo para otra (Taiz & Zeiger, 2006), y por ello, el concepto de estrés tiene que ser en cierta forma redefinido y acotado en función de la especie que sea objeto de estudio. Con el fin de definir qué condiciones son de estrés de las que no, muchos trabajos usan variables y parámetros que ayudan a discernir entre estas dos situaciones. En muchos casos, el estrés se mide con relación a la supervivencia de la planta, el rendimiento del cultivo, el crecimiento (acumulación de biomasa) o los procesos de asimilación primaria

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

(incorporación de CO₂ y minerales), que están directamente relacionados con el crecimiento y desarrollo vegetal (Taiz & Zeiger, 2006).

I.3.2. TIPOS DE ESTRÉS

Como ya se ha mencionado, el mundo vegetal a lo largo de su ciclo vital está expuesto a un gran número de condiciones o factores que limitan su crecimiento y desarrollo. Estos tradicionalmente se han agrupado en dos categorías, factores o estrés bióticos y abióticos (Fig. 1.5). El estrés biótico, es el ocasionado por la acción de organismos vivos, como los pequeños o grandes animales, otras plantas, y los denominados agentes patógenos (virus, bacterias y hongos) (Azcón-Bieto & Talón, 2008).

El estrés abiótico por su parte, se define en función de la naturaleza del agente causal, y puede dividirse en físico y químico. Entre los físicos, se encuentra el déficit hídrico, la salinidad (en su componente osmótico), las temperaturas extremas (calor, frío, congelación), la excesiva o insuficiente irradiación, la anaerobiosis producida por encharcamiento o inundación, el estrés mecánico producido por el viento o la excesiva compactación del suelo, y el inducido por heridas o lesiones. El estrés químico está causado por la salinidad (en su componente iónico o tóxico), por la carencia de elementos minerales y por los contaminantes ambientales, como el dióxido de azufre (SO₂), los óxidos de nitrógeno (NO_x), los componentes clorofluorcarbonados (CFC), el ozono (O₃) y los metales (Azcón- Bieto & Talón, 2008).

Los factores de estrés raramente actúan de forma individual sobre la planta. En general, varios factores de estrés actúan simultáneamente, por ejemplo, la combinación frecuente de estrés por calor, agua y una alta irradiancia que se produce en períodos secos, soleados y calurosos durante el verano (Lichtenthaler, 1996).

BIÓTICO	ABIÓTICOS								
Competición Alelopatía Herbívoros Enfermedades Patógenos Virus	Físicos	Temperatura		Agua		Radiación		Viento	
		Calor	Frío	Sequía	Inundación	Infrarrojo	Ultravioleta	Campo electromagnético	Tormenta de viento
	Químicos	Contaminación del aire Pesticidas Toxinas pH del suelo y del agua Salinidad							

Figura 1.5.- Clasificación de los diferentes tipos de factores de estrés que pueden afectar a la homeostasis de las plantas (Nilsen & Orcutt, 1996).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

I.3.3. ESTRÉS POR LUZ ULTRAVIOLETA. ESTRÉS OXIDATIVO

Se define al estrés oxidativo como una alteración del equilibrio entre las especies antioxidantes y las prooxidantes, en donde predominan estas últimas (Fig. 1.6) (Sies, 1986). Se trata de un estrés de naturaleza bioquímico, ocasionado por la acción del propio metabolismo (Mano, 2002), de manera que, cualquier alteración de las condiciones óptimas de la planta afecta negativamente a su fisiología, modifica la cadena de transporte electrónico, y produce un estrés oxidativo (Halliwell, 1987).

Este estrés consiste en un aumento en la tasa de producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que puede destruir los sistemas celulares. Así, un aumento en la capacidad de eliminación de estas ROS por las plantas, se considera un síntoma de tolerancia al estrés, mientras que, una disminución o ausencia de esta capacidad por parte de la planta se considera un síntoma de sensibilidad al estrés (Hernández et al., 1995; 2000), en donde las células direccionan su actividad a la detención de su crecimiento, la necrosis o la apoptosis.

Existe una estrecha relación entre el estrés oxidativo y el estrés inducido por la luz ultravioleta. El estrés causado por la luz ultravioleta, conduce a la formación y acumulación de las ROS que, si supera la capacidad antioxidante de la planta, produce daño oxidativo. No obstante, la producción de las ROS y la respuesta antioxidante es diferente en función de la especie y de la severidad del estrés (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

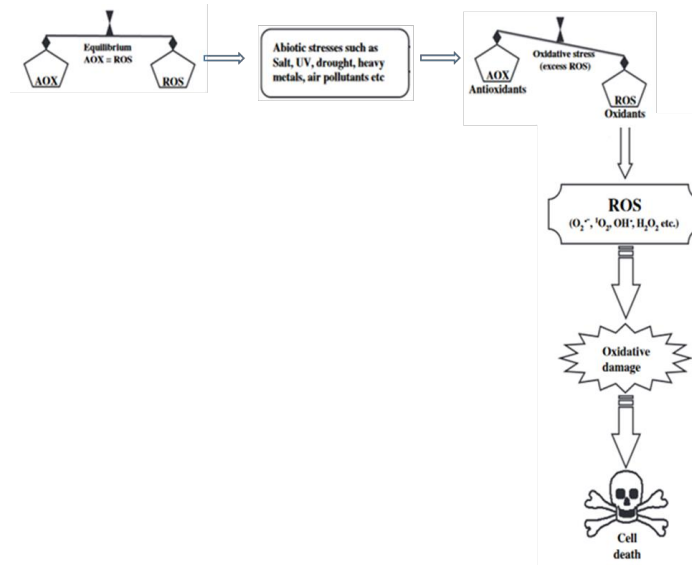


Figura 1.6.- El equilibrio entre las sustancias antioxidantes (AOX) y sustancias oxidantes (ROS) se ve perturbado por la existencia de estrés abiótico, induce la producción de ROS, generando daño oxidativo, que puede conducir a la muerte celular (modificado de Gill & Tuteja, 2010)

1.3.3.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS). CONCEPTO, PAPEL FISIOLÓGICO Y TIPOS DE ROS

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son formas parcialmente reducidas del oxígeno (Sies, 1991), que se generan de forma natural y constante (Fig. 1.7), en aquellos organismos que tienen un metabolismo basado en reacciones de oxidación- reducción (Mano, 2002). Por lo tanto, son bioproducto de múltiples rutas metabólicas (imprescindibles para la vida) localizadas en diferentes compartimentos celulares, especialmente donde se produce la transferencia de electrones, como las mitocondrias y los cloroplastos. En los peroxisomas, glioxisomas (un tipo de peroxisoma), retículo endoplasmático, apoplasto, pared celular, membrana plasmática y citoplasma, también hay producción de ROS (Amirsadeghi et al., 2007; Van Breusegem & Dat, 2006).

En cuanto al papel fisiológico de las ROS, estas especies son reconocidas como agentes regulatorios y de señalización (Apel & Hirt, 2004; Mittler et al., 2004), envueltas en la regulación de respuestas de defensa y muerte celular (Zhang et al., 2003), gravitropismo (Joo et al., 2001), apertura de estomas (Kwak et al., 2003; McAinsh et al.,

1996; Murata et al., 2001; Pei et al., 2000; Foreman et al., 2003; Gapper & Dolan, 2006) crecimiento y desarrollo floral, y crecimiento de los pelos radiculares (Foreman et al., 2003).

Las ROS producidas ante un estrés abiótico actúan como señales de cambio, regulan la expresión de genes (Pei et al., 2000; Pastori & Foyer, 2002; Mittler et al., 2004; Shin & Schachtman, 2004) y regulan la actividad de canales iónicos (Foreman et al., 2003). En el caso de un estrés biótico, la acumulación de las ROS, pueden ayudar a matar al patógeno (Sagi & Fluhr, 2006; Torres et al., 2006).

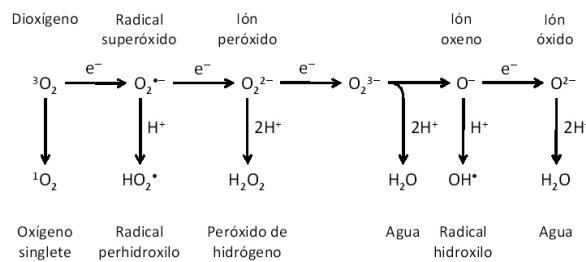
Existen numerosas ROS, que podemos clasificarlas en dos grandes grupos. Por un lado, tenemos las ROS que son radicales libres, como es el caso del anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) (Edreva, 2005). Por otro lado, nos encontramos con las formas no radicales, como son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singlete (1O_2) (Briviba et al., 1997).

El radical superóxido es el producto del oxígeno molecular O_2 . Se produce en la cadena de transporte mitocondrial o el transporte electrónico en el aparato fotosintético.

El peróxido de hidrógeno se produce a partir de la reducción del anión radical, por una reacción de dismutación. También, se puede producir a partir de la fotorespiración en el estroma del cloroplasto, y posterior generación de H_2O_2 en los peroxisomas.

El radical hidroxilo se genera en una reacción catalizada por metales pesados de transición (normalmente Fe^{+2} y Cu^{+2}) en los compartimentos celulares en donde coexisten el O_2^- y el H_2O_2 .

El oxígeno singlete se produce por la desexcitación de las clorofilas en los centros de reacción, cuando se cede un electrón en estado de singlete al oxígeno molecular. Se trata de una molécula nucleofílica que reacciona con moléculas orgánicas.



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 1.7.- Cadena de formación de las especies reactivas de oxígeno. Generación de ROS, a partir de oxígeno en estado triplete, mediante redistribución electrónica o por reducción secuencial con un electrón (Modificado de Apel & Hirt. 2004).

1.3.3.2. EFECTO NOCIVO DE LAS ROS

Las ROS también son especies químicas elevadamente reactivas, con un alto poder oxidante, capaces de dañar diferentes componentes celulares o macromoléculas biológicas como los lípidos (Moran et al., 1994; Munné-Bosch & Alegre, 2002), las proteínas (Berlett & Stadtman, 1997) y los ácidos nucleicos (Halliwell & Gutteridge, 2007) (Fig. 1.8).

Las ROS son especies químicas elevadamente reactivas, con un alto poder oxidante, capaces de dañar diferentes componentes celulares o macromoléculas biológicas (Moran et al., 1994; Munné-Bosch & Alegre, 2002; Berlett & Stadtman, 1997; Halliwell & Gutteridge, 2007), que conllevan a efectos muy diversos en las plantas. Así, el radical HO \cdot (es el más reactivo de las ROS), que es un potente oxidante, puede dañar a la mayoría de los compuestos orgánicos (Czapski, 1984), de hecho, puede reaccionar con las bases nitrogenadas del DNA, produciendo su fragmentación (Mano, 2002). El efecto más perjudicial del O $_2^{\cdot-}$, es su capacidad de inactivar determinadas enzimas con centros de hierro-sulfuro (Flint et al., 1993). En el caso del H $_2$ O $_2$, aunque se trata de una especie menos reactiva que las anteriores ROS, dada su alta capacidad de difusión, puede reaccionar con multitud de biomoléculas, oxidando las cadenas laterales de los aminoácidos e introducir grupos carbonilos en ellas (Stadtman & Levine, 2003), y también, puede oxidar enzimas con grupos hierro-sulfuro (Flint et al., 1993). Normalmente, estas modificaciones oxidativas conducen a una alteración en la estructura de la proteína, que terminan con la pérdida de su función; sin embargo, se han descrito también modificaciones reversibles que no generan la pérdida de actividad de la proteína, como es la oxidación de la metionina a metionina sulfóxido y determinados estados de oxidación de residuos de cisteína (Garner et al., 1998; Sigalov & Stern, 1998). También se puede dar la oxidación de residuos de tirosina, metionina, triptófano e histidina sin la formación de grupos carbonilo (Dröge, 2002; Stadtman, 1992).

Otro efecto nocivo producido por estas especies, es la peroxidación de ácidos grasos insaturados, que afecta a la estructura y función de las membranas celulares, y como consecuencia de ello, se produce la descompartimentación de iones, la pérdida del

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

potencial de membrana, la inhibición del transporte de metabolitos, la alteración de los receptores de hormonas y, por último, la muerte celular. Algunos ácidos grasos poliinsaturados pueden sufrir peroxidación, y estos casos, se generan mensajeros químicos como es el caso del ácido jasmónico, el ácido metil-jasmónico y otras oxilipinas, que están implicadas en la respuesta de defensa frente a las ROS (Moller et al., 2007; Wastemack, 2007).

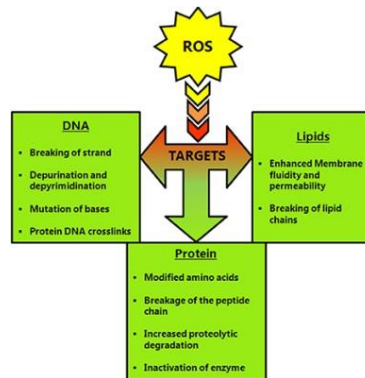


Figura 1.8.- Representación esquemática de las posibles dianas de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Das & Roychoudhury, 2014).

1.3.3.3. DEFENSA DE LAS PLANTAS FRENTE A LA LUZ ULTRAVIOLETA. SISTEMAS ANTIOXIDANTES EN LAS CÉLULAS

Conseguir que las ROS se mantengan a unos niveles compatibles con el normal funcionamiento celular es posible gracias, a diferentes sustancias o moléculas con capacidad antioxidante. Se define a un antioxidante, como una sustancia que a bajas concentraciones en comparación con la del sustrato oxidable, disminuye notablemente o inhibe la oxidación de ese sustrato (Halliwell et al., 1995).

Los organismos se han visto obligado a desarrollar defensas antioxidantes como consecuencia de las indeseadas reacciones de oxidación llevadas a cabo por las ROS (Halliwell, 1999; Slater, 1984), de forma que, las ROS generadas son eliminadas por los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Foyer et al., 1994) (Fig. 1.9).

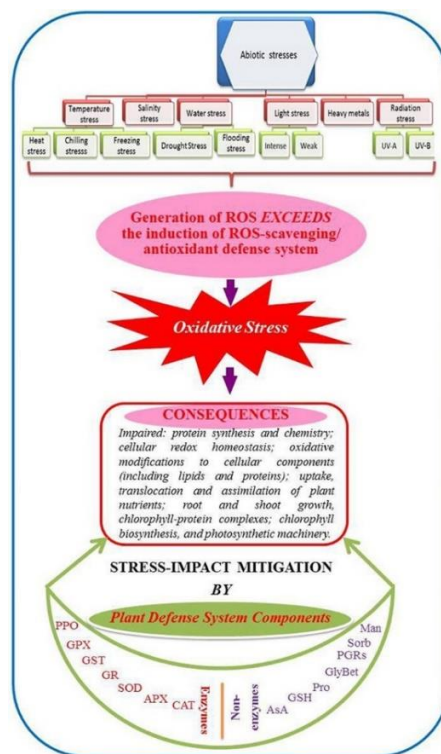
- Sistemas antioxidantes no enzimáticos. Aquí se incluyen osmolitos como la prolina (Pro), betaina glicina (GlyBet), sorbitol (Sorb), manitol (Man), ect., y el glutatión reducido (GSH) y el ácido ascórbico (AsA) que son necesarios para el ajustamiento

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

osmótico, estabilización de membranas y eliminación de ROS (Vardhini & Anjum., 2015).

Dentro de este grupo también se encuentran los compuestos fenólicos, los carotenoides (carotenos y xantofilas) (Young, 1991) y el α -tocoferol (Munné-Bosch & Alegre, 2002), el glutatión (GSH), y los reguladores del crecimiento vegetal (GPRs), como son los brasinosteroides (BRs) (se trata de un nuevo grupo de fitohormona con efectos pleiotrópicos, entre los que se incluye la capacidad de conferir a las plantas resistencia frente al estrés abiótico) (Vardhini & Anjum., 2015).

- Sistemas antioxidantes enzimáticos. Dentro de este grupo, se localizan diferentes enzimas como la dismutasa superóxido (SOD: E.C. 1.15.1.1); catalasa (CAT: E.C. 1.11.1.6); reductasa glutatión (GR: E.C. 1.6.4.2); peroxidasa (POD: E.C. 1.11.1.11); ascorbato peroxidasa (APX: E.C. 1.11.1.11); glutatión S- transferasa (GST: E.C. 2.5.1.18); oxidasa polifenol (PPO: E.C. 1.14.18.1); peroxidasa guaiacol (GPX: E.C. 1.11.1.7); reductasa deshidroascorbato (DHAR: E.C. 1.8.5.1), ect. (Vardhini & Anjum., 2015).



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 1.9.- Representación esquemática del sistema antioxidante enzimático y no enzimático que se desencadena en las plantas ante un estrés oxidativo (Vardhini & Anjum., 2015).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

I.4. BIBLIOGRAFÍA

- Amirsadeghi S, Robson C, Vanlerberghe G. 2007.** The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress. *Physiol Plantarum* 129: 253-266.
- Apel K, Hirt H. 2004.** Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.
- Azcón-Bieto J, Talón M. 2008.** Fundamentos de Fisiología Vegetal. 2ª Ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España. 651p.
- Ballaré CL, Barnes WP, Kendrick RE. 1991.** Photomorphogenetic effects of UV-B radiation on hypocotyls elongation in wild type and stable-phytochrome-deficient mutant seedling of cucumber. *Physiol Plant* 83: 651-658.
- Ballaré CL, Scopel AL, Stapleton AE, Yanovsky MJ. 1996.** Solar ultraviolet-B radiation affects seedling emergence, DNA Integrity, plant morphology, growth rate, and attractiveness to herbivore Insects in *Datura ferox*. *Plant Physiol* 112: 161-170.
- Basurto M, Núñez A, Pérez R, Hernández, OA 2008.** Fisiología del Estrés Ambiental en Plantas. *Síntesis* 48: 1-5.
- Bell GR. 1956.** On the photochemical degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and structurally related compounds in the presence and absence of riboflavin. *Bot Gaz* 183: 133-136.
- Berlett BS, Stadtman ER. 1997.** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272: 20313-20316.
- Björn LO. 1996.** Effects of ozone depletion and increased UV-B on terrestrial ecosystems. *Int J Environ Studies* 51(3): 217-243.
- Björn LO, Widell S, Wang T. 2002.** Evolution of UV-B regulation and protection in plants. *Advances in Space Research* 30: 1557-1562.
- Briviba K, Klotz LO, Sies H. 1997.** Toxic and signalling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *J Biol Chem* 378: 1259-1265.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Brosché M, Strid A. 2003.** Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants: UV-B induced signal transduction pathways and changes in gene expression. *Physiol Plant* 117: 1–10
- Brown BA, Cloix C, Jiang GH, Kaiserli E, Herzyk P, Kliebenstein DJ, Jenkins GI. 2005.** A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 18225–18230
- Caldwell MM, Robberecht R, Flint SD. 1983.** Internal filters: prospects for UV-acclimation in higher plants. *Physiol Plant* 58: 445-450.
- Caldwell MM, Ballaré CL, Bornman JF, Flint SD, Bjorn LO, Teramura AH, Kulandaivelu G, Tevini M. 2003.** Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochem Photobiol Sci* 2: 29–38
- Carrasco-Ríos L. 2009.** Effect of ultraviolet-b radiation in plants. *IDESIA (Chile)*. 27 (3): 59-76.
- Cooley NM, Holmes MG, Attridge TH. 2000.** Growth and stomatal responses of temperature meadow species to enhanced levels of UV-A and UV-B+A radiation in the natural environment. *J Photochem Photobiol B* 57: 179-185.
- Czapski G. 1984.** Reaction of OH. *Methods in Enzymology* 105: 209-215.
- Day TA, Neale PJ. 2002.** Effects of UV-B radiation on terrestrial and aquatic primary producers. *Annu Rev Ecol Syst* 33: 371-396.
- Diffey BL. 2002.** Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods* 28: 4 –13.
- Denmark B, MA/MS. 2015.** “Recipiente del Premio Nobel Mario Molina” Visioleraning Vol. SCIRE-1 (9). <<http://www.visionlearning.com/es/library/Adentro-de-la-Ciencia/58/Recipiente-del-Premio-Nobel-Mario-Molina/211>> (Consultado:13/02/2017).
- Dröge W. 2002.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
- Edreva A. 2005.** Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106: 119-133.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Flint DH, Tuminello JF, Emptage MH. 1993.** The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* 268: 22369-22376.
- Foreman J, Demicjick V, Bothwell J 2003.** Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 422-446.
- Foyer CH, Lelandais M, Kunnert KJ. 1994.** Photooxidative stress in plants. *Physiol Plantarum* 92: 696-717.
- Frohnmeier H, Staiger D. 2003.** Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol* 133 (4): 1420-1428.
- Gapper C, Dolan L. 2006.** Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol* 141: 341-345.
- Garner B, Witting PK, Waldeck AR, Christison JK, Raftery M, Stocker R. 1998.** Oxidation of high density lipoproteins. I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by alpha-tocopherol. *J Biol Chem* 273: 6080-6087.
- Gill SS, Tuteja N. 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48: 909-930.
- Glazebrook J. 2005.** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43:205-227.
- Golaszewsha ZK, Upadhyaya MK, Golaszewski J. 2003.** The effect of UV-B radiation on plant growth and development. *Plant Soil Environ* 49: 135-140.
- Halliwell B. 1987.** Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chem Phys Lipids* 44: 327-340.
- Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI. 1995.** The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 7: 601-617.
- Halliwell B. 1999.** Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Rad Res* 31: 261-272.
- Halliwell B, Gutteridge J. 2007.** *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4^o Ed. Oxford University Press. Oxford, UK.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Hernández JA, Jiménez A, Mullineaux P, Sevilla F. 2000.** Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ* 23: 853-862.
- Hernández JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F, del Rio LA. 1995.** Salt-induced oxidative stress in chloroplast of pea plants. *Plant Science* 105:151-167.
- Hollósy F. 2002.** Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33: 179-197.
- Hugly S, Kunst L, Browse J, Somerville C. 1989.** Enhanced thermal tolerance of photosynthesis and altered chloroplast ultrastructure in a mutant of *Arabidopsis* deficient in lipid desaturation. *Plant Physiol* 90: 1134-1142.
- Iturbe-Ormaetxe I, Escuredo PR, Arrese-Igor C, Becana M. 1998.** Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *J Plant Physiol* 116: 173-181.
- Jain K, Kakaria S, Guruprasad KN. 2003.** Changes in antioxidant defenses of cucumber cotyledons in response to UV-B and to the free radical generating compound AAPH. *Plant Sci* 165: 551-557.
- Jansen, MAK, Gaba V, Greenberg BM. 1998.** Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci* 3: 131-135.
- Joo J, Bae Y, Lee J. 2001.** Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol* 126: 1055-1060.
- Jordan BR. 2002.** Molecular response of plant cells to UV-B stress. *Funct Plant Biol* 29: 909-916
- Jordan BR, James PE, Strid A, Anthony RG. 1994.** The effect of UV-B radiation on gene expression and pigment composition in etiolated and green pea leaf tissue: UV-B induced changes in gene expression are gene specific and dependent upon tissue development. *Plant Cell Environ* 17: 45-54.
- Kakani VG, Reddy KR, Zhao D, Sailaja K. 2003.** Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agric Forest Meteorol* 120 (1-4): 191-218.
- Kakari S, Jain K, Guruprasad KN. 2007.** UV-B induced changes in antioxidant enzymes and their isoforms in cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledons. *Indian J Biochem Biophys* 44: 31-37.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Kataria S, Jajoo A, Guruprasad KN. 2014.** Impact of increasing Ultraviolet-B (UV-B) radiation on photosynthetic processes. *J Photochem Photobiol B: Biology* 137: 55-66
- Kliebenstein DJ, Lim JE, Landry LG, Last RL. 2002.** Arabidopsis UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human regulator of chromatin condensation 1. *Plant Physiol.*130: 234-243.
- Kramer GF, Norman HL, Krizek DT, Mirecki RM. 1991.** Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochem* 30: 2101-2108.
- Kumari R, Singh S, Agrawal SB. 2009.** Effects of supplemental UV-B radiation on growth and physiology of *Acorus calamus* L. (Sweet flag). *Acta Biol. Cracoviensia Series Bot* 51: 19-27
- Kwak J, Mori I, Pei Z, Leonhardt N, Torres M, Dangl J, Bloom R, Bodde S, Jones J, Schroeder J. 2003.** NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *EMBO* 22: 2623-2633.
- Landry LG, Chapple CCS, Last RL. 1995.** Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol* 109 (4): 1159-1166.
- Li J, Ou-Lee TM, Raba R, Amundson RG. 1993.** Last RL. Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* 5 (2): 171-179.
- Li YA, Yangun Z. 2010.** Intraspecific variation in sensitivity to ultraviolet-B radiation in endogenous hormones and photosynthetic characteristic of 10 wheat cultivars grown under field conditions. *South Afr J Bot* 76: 493-498.
- Lichtenthaler H K. 1996.** Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J Plant Physiol* 148: 4-14.
- Linden H. 2002.** A White Collar Protein Senses Blue Light. *Science* 297: 777-778.
- Lindo SJ, Sedey SD, Cadwell MM. 1979.** Effects of ultraviolet-B radiation on the abscisic acid status of *Rumex patientia* leaves. *Physiol Plant* 45: 67-72.
- Madronich S, McKenzie RL, Björn LO, Caldwell MM. 1998.** Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *J Photochem Photobiol B* 46: 5 – 19.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Madronich S, McKenzie RL, Caldwell, MM, Bjor LO. 1995.** Changes in ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *Ambio* 24: 143-152.
- Mano J. 2000.** Early events in environmental stresses in plants-induction mechanisms of oxidative stress. In: *Oxidative stress in plants*. (Eds: Inz'e D, Van Montagu M). M. Taylor & Francis. New York. pp. 217-246.
- Mazza CA, Battista D, Zima AM, Szwarcberg-Bracchitta M, Giordano CV, Acevedo A, Scopel AL, Ballaré CL. 1999.** The effects of solar UV-B radiation on the growth and yield of barley are accompanied by increased DNA damage and antioxidant responses. *Plant Cell Environ* 22: 61-70.
- Mayer B, Kylling A, Madronich S, Seckmeyer G. 1998.** Enhanced absorption of UV radiation due to multiple scattering in clouds: Experimental evidence and theoretical explanation. *J. Geophys. Res-Atmos* 103 (D23): 31241-31254.
- McAinsh M, Clayton H, Mansfield T, Hetherington, A. 1996.** Changes in stomatal behavior and cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiol* 111: 1031-1042.
- McKenzie RL, Björn LO, Bais A, Ilyasd M. 2003.** Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem Photobiol Sci* 2: 5-15.
- Meijkamp BB, Doodeman G, Rozema J. 2001.** The response of *Vicia faba* to enhanced UV-B radiation under low and near ambient PAR levels. *Plant Ecol* 154: 135-146
- Mishra RK, Singhal GS. 1992.** Function of photosynthetic apparatus of intact wheat leaves under high light and heat stress and its relationship with peroxidation of thylakoid lipids. *Plant Physiol* 98: 1-6.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. 2004.** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Sci* 9 (10): 490-498.
- Moller IM, Jensen PE, Hansson A. 2007.** Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58: 459-481.
- Moran JF, Becana M, Iturbe-Ormaetxe I, Frechilla S, Klucas RV, Aparicio-Trejo P. 1994.** Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* 194: 346-352.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Munné-Bosch S, Alegre L. 2002.** The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Cri Rev Plant Sci* 21 (1): 31-57.
- Murata Y, Pei Z, Mori I, Schroeder J. 2001.** Abscisic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C Mutants. *Plant Cell* 13(11): 2513-2523.
- Murphy TM, Vu H. 1996.** Photoinactivation of superoxide synthases of the plasma membrane from rose (*Rosa damascena* Mill.) cells. *Photochem Photobiol* 64: 106-109.
- Nilsen ET, Orcutt DM. 1996.** Physiology of plants under stress. In: Abiotic factors. (John Wiley & Sons (eds) INC). New York. pp. 704.
- Pahkala M, Laurila A, Merila J. 2002** Effects of ultraviolet-B radiation on common frog *Rana temporaria* embryos from along a latitudinal gradient. *Oecologia* 133 (4): 458-465.
- Panagopoulos I, Borman JF, Björn LO. 1990.** Effects of ultraviolet radiation and visible light on growth, fluorescence induction, ultraweak luminescence and peroxidase activity in sugar beet plants. *J Photochem Photobiol* 8: 73-87.
- Pastori G, Foyer C. 2002.** Common components networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “Redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol* 129: 460-468.
- Paul N, Gwynn-Jones D. 2003.** Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. *Trends Ecol Evol* 18: 48–55
- Pei Z, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klüsener B, Allen G, Grill E, Schroeder J. 2000.** Calcium channels activated by hydrogen peroxidase mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature* 406: 731-734.
- Pinto ME, Casati P, HSU TP, KU MSB, Edwards GE. 1999.** Effects of UV-B radiation on growth, photosynthesis, UV-B absorbing compounds and NADP-malic enzyme in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under different nitrogen conditions. *Photochem Photobiol* 48: 200-209
- Reddy KR, Singh SK, Koti S, Kakani VG, Zhao D, Gao W, Reddy VR. 2013.** Quantifying of effects of corn growth and physiological responses to ultraviolet-B radiation for modeling. *Agro J* 105: 1367-1377.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Ries G, Heller W, Puchta H, Sandermann H, Seidlitz HK, Hohn B. 2000.** Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature* 406 (6791): 98-101.
- Roleda MY, van de Poll WH, Hanelt D, Wieneke C. 2004.** PAR and UVBR effects on photosynthesis, viability, growth and DNA in different life stages of two coexisting Gigartinales: implications for recruitment and zonation pattern. *Mar. Ecol Prog Ser* 281: 37-50.
- Ros J, Tevini M. 1995.** Interaction of UV radiation and IAA during growth of seedling and hypocotyl segments of sunflower. *J Plant Physiol* 146: 295-302.
- Rozema J, Van De Staaij J, Björn LO, Caldwell M. 1997.** UV-B as an environmental factor in plant-life: Stress and regulation. *Trends Ecol Evol* 12: 295-302.
- Ruhland CT, Xiong FS, Clark WD, Day TA. 2005.** The influence of ultraviolet-B radiation on hydroxycinnamic acids, flavonoids and growth of *Deschampsia Antarctica* during the springtime ozone depletion season in Antarctica. *Photochem Photobiol* 81: 1086-1093.
- Sagi M, Fluhr R. 2006.** Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol* 141: 336-340.
- Searles PS, Flint SD, Caldwell MM. 2001.** A meta analysis of plant field studies simulating stratospheric ozone depletion. *Oecologia* 127: 1-10.
- Semerdjieva SI, Phoenix GK, Hares D, Gwynn-Jones D, Callaghan TV, Sheffield E. 2003.** Surface morphology, leaf and cuticle thickness of four dwarf shrubs from a sub-Arctic heath following long-term exposure to enhanced levels of UV-B. *Physiol Plantarum* 117: 289-294.
- Shin R, Schachtman D. 2004.** Hydrogen peroxide mediates plant root response to nutrient deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8827-8832.
- Sies H. 1986.** Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie* 25: 1058-1071.
- Sies H. 1991.** Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 69: 965-968
- Sigalov AB, Stern LJ. 1998.** Enzymatic repair of oxidative damage to human apolipoprotein *A-I*. *FEBS Lett* 433: 196-200.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Slater TF. 1984.** Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 222: 1-15.
- Stadtman E. 1992.** Protein oxidation and aging. *Science* 257 (5074): 1220-4.
- Stadtman ER, Levine RL. 2003.** Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25: 207-218
- Stapleton AE, Walbot V. 1994.** Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiol* 105: 881-889.
- Staxén I, Bergounioux C, Bornman JF. 1993.** Effects of ultraviolet radiation on cell division and microtubule organization in *Petunia* hybrid protoplast. *Protoplasma* 173: 70-76.
- Stratmann J. 2003.** Ultraviolet-B radiation co-opts defense signaling pathways. *Trends Plant Sci* 8: 526–533
- Strid A, Chow WS, Anderson JM. 1990.** Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochim Biophys Acta* 1020: 260-268.
- Sullivan JH, Gitz DC, Peek MS, McElrone JA. 2003.** Response of three eastern species to supplemental UV-B radiation: leaf chemistry and gas exchange. *Agric Forest Meteorol* 120: 219-228.
- Surabhi GK, Reddy KR, Singh SK. 2009.** Photosynthesis, fluorescence, shoot biomass and seed weight responses of three cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivars with contrasting sensitivity to UV-B radiation. *Environ Exp Bot* 66: 160-171.
- Taiz L, Zeiger E. 2002.** *Plant Physiology*. Abscisic acid: a seed maturation and antistress signal. 3rd Ed. Sinaguer Associates Inc. Sunderland, MA.
- Taiz L, Zeiger E. 2006.** *Fisiología Vegetal*. Vol I. 3rd Ed. Publicacions de la Universitat Jaume I. Castelló de la Plana.
- TEMIS (Tropospheric Emission Monitoring Internet Service). 2017.**
<<http://www.temis.nl/uvradiation/UVindex.html>>. (Consultado: 13/02/2017).
- Tevini M, Teramura AH. 1989.** UV-B effects on terrestrial plants. *Photochem Photobiol* 50 (4): 479-487.
- Torres M, Jones, J, Dangl J. 2006.** Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* 141: 373-378.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Van Breusegem F, Dat J. 2006.** Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol* 141: 384-390.
- Wang Y, Wang XA, Wang RJ, Qiu NW, Ma ZQ, Du GZ. 2012.** Effects of UV-B radiation on the growth and reproduction of *Vicia angustifolia*. *Ying Yong Shen Tai Xue Bao* 23: 1333-1338.
- Wasternack C. 2007.** Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* 100: 681-697.
- Yang T, Law DM, Davies PJ. 1993.** Magnitude and kinetics of stem elongation induced by exogenous indole-3-acetic acid in intact light-grown pea seedlings. *Plant Physiol* 102: 717-724.
- Young AJ. 1991.** The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiol Plantarum* 83: 702-708.
- Yu GH, Li W, Yuan ZY, Cui Lv CG, Gao ZP, Han B, Gong YZ, Chen GX. 2013.** The effects of enhanced UV-B radiation on photosynthetic and biochemical activities in super-high-yield hybrid rice Liangyoupeijiu at the reproductive stage. *Photosynthetica* 51: 33-44.
- Zaremba TG, LeBon TR, Millar DB, Smejkal RM, Hawley RJ. 1984.** Effects of ultraviolet light on the in vitro assembly of microtubules. *Biochem* 23: 1073-1080.
- Zhang B, Hirahashi J, Cullere X, Mayadas TN. 2003.** Elucidation of Molecular Events Leading to Neutrophil Apoptosis following Phagocytosis. *J Biol Chem* 278 (31): 28443-28454.
- Zinser C, Seidlitz HK, Welzl G, Sandermann H, Heller W, Ernst D, Rau W. 2007.** Transcriptional profiling of summer wheat grown under different realistic UV-B irradiation regimes. *J Plant Physiol* 164: 913-922.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383		Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14	
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58	
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47	
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34	

OBJETIVOS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

II. OBJETIVOS

La hipótesis planteada en este trabajo es que la especie *Nepeta teydea*, es un modelo válido como marcador de estrés relacionado con la exposición a radiación ultravioleta B (UV-b) y con ello, esta planta podría ser un indicador del cambio climático. Para ello es preciso establecer plantas tanto *in vitro* como *in vivo* creciendo en condiciones controladas a las que se les pueda aplicar técnicas de caracterización estructural mediante histoquímica y, por otro lado, identificar las principales enzimas marcadoras “señalizadoras” del objeto de estudio, mediante enzimología de los extractos obtenidos de estos modelos. Por este motivo los objetivos específicos del presente trabajo son:

1. Desarrollar modelos de cultivo de callos y células *in vitro* de *Nepeta. teydea*.
2. Identificar la estructura histológica de la especie e identificando las diferentes peroxidases presentes.
3. Caracterizar enzimáticamente las peroxidases y cuantificar su respuesta a diferentes condiciones de irradiación.
4. Plantear la capacidad de esta especie como indicadora en campo del cambio climático.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

FAMILIA LAMIACEAE. TAXONOMÍA, ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

III. FAMILIA LAMIACEAE. TAXONOMÍA, ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN

III.1. INTRODUCCIÓN

La familia Lamiaceae es también conocida botánicamente con los nombres de Labiatae (por la presencia de labios en sus flores), Labiadas, Lamiacea (Fernández & Rivera, 2006; Strasburger, 2004).

La familia Lamiaceae es la sexta familia más grande de las plantas que florecen y una de las más importantes desde el punto de vista económico (Drew & Sytsma, 2012). Está constituida por unos 236 géneros y 7173 especies, y pertenece al orden Lamiales (Martínez et al., 2013). Se considera una familia monofilética, al incluirse en ella muchos géneros de Verbenáceae (p. ej., *Vitex* y *Tectona*) (Izco et al., 1997; Drew & Sytsma, 2012).

En la familia se reconocen diversas subfamilias, de las cuales en la Península Ibérica sólo se encuentran Lamioideae (incluida Nepetoideae), Scutellarioideae, Prasioideae, Agujoidae, Rosmarinoideae y Chloanthoideae (esta última con representantes dotados de pelos ramificados característicos (p. ej., *Tectona*)) (Izco et al., 1997.)

Las Lamioideae constituyen el grupo más importante e incluyen representantes con corola bilabiada, androceo con 2-4 estambres de anteras mopnotécicas o ditécicas, gineceo con estilo ginobásico, fruto seco y semillas con embrión erecto. El grupo, no obstante, se escinde hoy en día en dos subfamilias, Lamioideae y Nepetoideae, la primera de las cuales incluye los taxones con pólenes tricolporados y la segunda los hexacolpados. Comprenden numerosos géneros, como *Thymus*, *Lavandula*, *Stachys*, *Sideritis*, *Salvia*, *Lamium*, *Phlomis*, *Ballota*, *Nepeta*, *Prunella*, *Cleonia*, *Marrubium*, *Melissa*, *Acinos*, *Satureja*, *Calamintha*, *Clinopodium*, *Micromeria*, *Origanum*, *Mentha*, *Preslia*, etc. (Izco et al., 1997; Drew & Sytsma, 2012).

Menor representación tiene las Escutellarioideas, con sólo 4 especies del género *Scutellaria* (unas 300 conocidas), todas ellas con cáliz bilabiado provisto de una escama o proyección dorsal. Las Prasioideas, que se caracterizan por poseer un fruto de tipo drupa, están representadas por *Prasium majus*, un pequeño arbusto frecuente en los paredones calcáreos de las zonas litorales mediterráneas más cálidas. Las Ajugoideas, cuyas especies presentan a menudo corola unilabiada, comprenden los géneros *Ajuga* y

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Teucrium, este último uno de los que incluye mayor número de especies en el territorio (unas 32, de las cerca de 200 conocidas en la actualidad), entre las que se cuenta la olivilla (*T. fruticans*), un arbusto muy común en el matorral mediterráneo y que se utiliza a veces como ornamental (Izco et al., 1997).

Finalmente, en relación con las Rosmarinoideas, hay que destacar que sus representantes poseen un androceo con 2 estambres de anteras monotécicas y un gineceo con estilo no ginobásico. Se incluye aquí el género *Rosmarinus*, con sólo 3 especies en el territorio y varios taxones infraespecíficos, entre ellas el romero (*R. officinalis*), un arbusto de hojas lineares y ericoides muy frecuente en el matorral mediterráneo. Sus hojas secas se utilizan como condimento y aromatizante, y sus sumidades floridas en infusión poseen propiedades diuréticas; poseen pigmentos flavónicos, ácido rosmarínico (un tanino), carnosol (una lactona diterpénica de sabor amargo), pequeñas cantidades del alcaide rosmaricina y gran cantidad de aceites esenciales (Izco et al., 1997).

III. 1.1. DESCRIPCIÓN DE LA FAMILIA LAMIACEAE

LABIATAE Juss., Gen. Pl. 220. 1789. Tipo: *Lamium L.*, Sp. Pl. 2: 579. 1753.
Lamiaceae Martinov

Hierbas anuales o perennes, sufrútices o arbustos, rara vez árboles o bejucos; con frecuencia con aceites aromáticos; tallos generalmente tetragonos, erectos o prostrados, ocasionalmente con estolones o rizomas; indumento de tricomas glandulares o no. Hojas opuestas, por lo general decusadas, en ocasiones verticiladas, simples o con menos frecuencia compuestas (*Vitex*), dentadas o crenadas; peciolo presente o ausente; estípulas ausentes. Inflorescencias terminales o axilares, tirsoideas, usualmente con cimmas o verticilastros dispuestos en espigas, racimos, panículas o capítulos; brácteas y bractéolas por lo general presentes, persistentes o decíduas. Flores por lo general bisexuales, hipóginas, zigomorfas, rara vez actinomorfas; cáliz persistente, sinsépalo, tubular a ampliamente campanulado; actinomorfo o zigomorfo, a veces bilabiado, lóbulos 4-5 (-9), imbricados; corola simpétala, generalmente con 5 lóbulos, iguales o subiguales, zigomorfa, en ocasiones actinomorfa, con frecuencia bilabiada, entonces el labio superior bilobado, el inferior trilobado, lóbulos imbricados, tubo corto o largo; estambres 4, didínamos, rara vez iguales, a veces reducidos a 2 y en ocasiones con estaminodios presentes, epipétalos; filamentos por lo general libres; anteras ditecas, rara vez monotecas, dehiscentes longitudinalmente, rara vez poricidas; disco hipógino,

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

generalmente carnoso, a veces dividido en 4 glándulas; gineceo bicarpelar, generalmente tetralocular por un septo falso, ovario superior, estilo 1, ginobásico, con menos frecuencia terminal, filiforme, por lo general con 2 lóbulos estigmáticos, iguales o desiguales; óvulos 4, 1 por lóculo, erectos. Fruto drupáceo, tetralobulado, indehiscente. Núcúlas por lo general 4, secas, lisas o levemente tuberculadas o reticulado-rugosas. Semillas solitarias, erectas (Martínez et al., 2013).

III. 1.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA FAMILIA LAMIACEAE

Se trata de una familia cosmopolita y es muy diversa en zonas templadas, particularmente en el Mediterráneo y la región central de Asia (Martínez et al., 2013).

Las labiadas son extraordinariamente frecuentes en la región mediterránea (donde muchas de sus especies participan de manera muy importante en algunos tipos de matorral (tomillares, cantuesales, etc.) (Izco, et al., 1997), con unas 1.000 especies de labiadas silvestres correspondientes a 48 géneros (la cuarta parte de especies y géneros del total mundial), de los cuales, 10 solo se encuentran en la parte asiática, 2 son endemismos de Marruecos y Argelia, 2 de Macaronesia y otros 2 europeos. Los géneros más importantes en cuanto a número de especies son *Teucrium* (141), *Stachys* (133), *Salvia* (131), *Thymus* (114) y *Sideritis* (87), que suman más de la mitad del número total de especies (Morales, 2000).

Tabla 3.1.- Número de géneros y especies en algunas regiones y países mediterráneos (Morales, 2000).

REGIÓN O PAÍS	Nº DE GÉNEROS	Nº DE ESPECIES
Península Ibérica y Baleares	36	290
Península Ibérica	36	279
Portugal	31	102
España peninsular	36	269
Baleares	24	53
Francia	35	161
Italia (incl. Sic., Cerd., Corc.)	36	194
Córcega	29	75
Creta	22	79
Chipre	26	66
Turquía	45	532
Israel	32	105
Egipto	21	55
Libia	22	65
Túnez	24	88
Macaronesia	31	115

En la Península Ibérica (una de las áreas más ricas y con mayor grado de endemismo de labiadas (Izco et al., 1997) e Islas Baleares viven 290 especies de labiadas, que corresponde a 36 géneros diferentes (Tabla 3.1). Teniendo en cuenta el número de especies de cada género, se consideran tres géneros grandes y son *Teucrium*, *Sideritis* y *Thymus* (Tabla 3.2) (Morales, 2000). Además, aquí se encuentran muchos endemismos de los géneros *Salvia*, *Stachys* y *Nepeta*, que son, junto con los ya citado, los que mayor número de especies comprenden en el territorio (Izco et al., 1997).

En la región macaronésica viven 31 géneros y 115 especies. Esta región es especialmente rica en endemismo, como se puede observar en los géneros *Bystropogon* (7) y *Cedronella* (1) que son endemismos, lo mismo que todas las especies de *Micromeria* (17) y *Sideritis* (26), debido a un proceso de radiación adaptativa en las islas macaronésicas. En total 62 endemismos macaronésicos y de ellos 52 especies de las Islas Canarias (Morales, 2000).

Tabla 3.2.- Géneros más importantes en cuanto a número de especies en la región Mediterránea y en la Península Ibérica (Morales, 2000).

Nº de especies GÉNEROS	Región Mediterránea	Península Ibérica
<i>Teucrium</i>	141	66
<i>Stachys</i>	133	14
<i>Salvia</i>	131	16
<i>Thymus</i>	114	37
<i>Sideritis</i>	87	49
<i>Nepeta</i>	66	13

III. 1.3. USOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA FAMILIA LAMIACEAE

En el aspecto económico la familia es ampliamente explotada dado que sus especies son productoras de aceites esenciales (Valades, 2001). Así, el contenido en esencias de esta familia, determina el empleo de distintas especies como té herbales (Valades, 2001; Akcin et al., 2011) y condimento, como es el ejemplo de la mejorana (*Majorana hortensis*), la albahaca (*Ocimum basilicum*), la ajedrea (*Satureja hortensis*) (Strasburger, 2004).

Otras Labiadas tienen usos medicinales, como ocurre con varias especies mediterráneas como el hisopo (*Hyssopus officinalis*), el espliego (*Lavandula angustifolia*), el romero (*Rosmarinus officinalis*), la salvia (*Salvia officinalis*), el tomillo (*Thymus vulgaris*), la melisa (*Melissa officinalis*), la menta (*Mentha* sp.), el serpol

(*Thymus serpyllum* agg.) (Strasburger, 2004), el poleo (*Mentha pulegioides*), la hierbabuena (*Mentha piperita*), el marrubio (*Marrubium vulgare*), el orégano (*Origanum virens*, *O. vulgare*), etc. Otras veces las Labiadas son ricas también en sales minerales, en principios amargos de diversa índole e incluso en taninos, propiedad ésta a la que algunas deben sus propiedades antidiarreicas y vulnerarias (p. ej., *Ajuga reptans*) (Izco et al., 1997).

Otras especies de esta familia poseen interés en jardinería y ornamentación, muy apreciadas por su aroma o por sus flores (Fernández & Rivera, 2006), como ocurre con los coleos (*Coleus* spp.), el agnocasto (*Vitex agnus-castus*), el romero (*Rosmarinus officinalis*), las salvias (*Salvia splendens*, *S. grahamii*, etc.), los matagallos (*Phlomis* app.) y los espliegos (*Lavandula angustifolia*) (Izco et al., 1997), y algunas especies de *Ajugas* L. (Akcin et al., 2011).

Muchas de las especies de labiadas han sido usadas como materia prima en la industria cosmética (Akcin et al., 2011) o en perfumería (Valades, 2001), como le ocurre al patchulí (*Pogostemum cablin* y *P. patchouli*, de Filipinas y Birmania, respectivamente) y a diversas especies del género *Lavandula* (*L. angustifolia*, *L. latifolia*, etc.), de las que se extrae por destilación la esencia de espliego, muy apreciada en perfumería y con propiedades antisépticas y cicatrizantes (Izco et al., 1997).

Algunas especies de la familia Labiatae presentan compuestos con actividad tanto antibacteriana como bioinsecticida de diferentes organismos (Valades, 2001). Además, en Colombia, se han efectuado la extracción y caracterización de lectinas y mucílagos en más de 50 taxones, con muy buenos resultados. Estas lectinas tienen importancia clínica, ya que interactúan de modo específico con determinados antígenos Tn. Más recientemente, el grupo de investigación de proteínas de la Universidad Nacional de Colombia, viene trabajando de forma específica en la actividad biológica de algunas de estas lectinas (de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*), en relación con la detección temprana de algunos tipos de células cancerígenas (Fernández & Rivera, 2006).

III. 2. GÉNERO NEPETA

Nepeta L. con aproximadamente 300 especies, es uno de los géneros más grandes de la familia Lamiaceae (Celenk & Malyer, 2008). Este género pertenece a la subfamilia Nepetoideae, tribu Menthea (Hassan & Khuroo, 2011; Celenk & Malyer, 2008).

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

La frecuente hibridación e introgresión, junto con la variación tanto de hábitat como de época, hace a *Nepeta* un género particularmente complejo, de hecho, este género ha tenido una atención considerable por parte de los taxonomistas desde hace mucho tiempo.

Existen diferentes clasificaciones infragenéricas de *Nepeta* de Bentham (1848), Boissier (1879), Briquet (1896), Shishkin (1976), Rechinger (1982), Hedge and Lamond (1982), Budantsev (1993), etc. Todos estos trabajos están basados principalmente en el hábitat, morfología de la hoja, estructura de las inflorescencias, cáliz y corola, y características de las pequeñas nueces (Celenk & Malyer, 2008; Jamzad et al., 2003).

Las investigaciones realizadas sobre la morfología del polen in Lamiaceae ha sido esencial para la clasificación dentro de esta familia, como se puede observar en el trabajo de Erdtman (1945) que sugirió una división de la familia en dos subfamilias basándose en las características de los granos de polen (Lamioidea: polen tricolpado; Nepetoideae: polen hexacolpado) (Celenk & Malyer, 2008).

Sin embargo, debido a la dificultad que supone el uso de caracteres morfológicos y anatómicos para establecer relaciones entre las especies de *Nepeta*, se ha estado investigando caracteres moleculares y químicos para evaluar su valor potencial en la reconstrucción de la filogenia (Jamzad et al., 2003). Algunas de estas investigaciones, incluyen los últimos trabajos taxonómicos realizados con las especies el género *Nepeta* se incluye el estudio filogenético presentado por Jamzad (2005), o el realizado por Dirmenci (2003, 2005) (Celenk & Malyer, 2008).

III. 2.1. DESCRIPCION DEL GÉNERO NEPETA

NEPETA L., Sp. Pl. 570. 1753; Gen. Pl. ed. 5: 249. 1754; Benth. in DC., Prodr. 12: 370. 1848; Boiss., Fl. Or. 4: 637. 1879; Hook. f., Fl. Brit. Ind. 4: 656. 1885; Briquet in Engler & Prantl, Nat. Pflanzenfam. ed. 1, 4, 3A: 235. 1896; Mukerjee in Rec. Bot. Surv. Ind. 14, 1: 118. 1940; Pojarkova in Komarov, Fl. USSR 20: 286. 1954; Hedge & Lamond in Notes Roy. Bot. Gard. Edinb. 28: 97. 1968; Rech., f., Fl. Iran. 150: 108. 1982; Hedge, Fl. Pak. 192: 59. 1990; Jing Jie Shu, Fl. China 17: 131. 1994.

Plantas herbáceas, generalmente perennes, hermafroditas o, raramente, dioicas. Hojas lanceoladas, ovadas o triangulares, obtusas o agudas, crenadas o dentadas, de cordiformes a atenuadas en la base, pelosas, pecioladas o sésiles. Inflorescencia formada por verticilastros ± densos. Brácteas de lanceoladas a ovales, las inferiores semejantes a

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

las hojas. Flores sésiles o subsésiles. Cáliz ovoide, zigomorfo o actinomorfo, sésil o subsésil, con 15(20) nervios, con dientes de lineares a triangulares, generalmente más cortos que el tubo. Corola cilíndrica en la parte inferior e infundibuliforme en la superior, bilabiada, con un labio superior bilobulado y otro inferior trilobulado con dos lóbulos laterales pequeños, patentes o reflejos y otro central mucho mayor, cóncavo, de margen crenulado. Estambres con filamentos paralelos, dos superiores y dos inferiores, que se insertan en la parte media del tubo de la corola; anteras ditecas con tecas divaricadas. Nectario situado entre las dos núculas inferiores, cuyo néctar se acumula en la base de la corola. Núcula con una cara dorsal redondeada y otra ventral formada por dos planos unidos en una quilla ± patente, lisa o tuberculada, glabra o con pelos; hilo cárpico ± reniforme, con acúmulos esféricos de ceras (Aedo, 2010).

III. 2.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL GÉNERO NEPETA

El género *Nepeta* está distribuido a lo largo del suroeste y centro de Asia, Europa, norte de África, norte y centro América, Japón, Corea, China, y las Islas Canarias (Fig. 3.1). La mayoría de las especies se encuentran en el suroeste de Asia, especialmente en Irán (Hassan & Khuroo, 2011) y la región del Himalaya (con un 40% de las especies), donde se encuentra su centro de evolución. Desde esta zona, su número disminuye gradualmente hacia el oeste, hasta la Península Ibérica y el noroeste de África, con un 7% de sus especies, y en la región Macaronésica, sólo está presente en uno de los cinco archipiélagos, Canarias, con una sola especie endémica que habita únicamente en las islas de Tenerife y La Palma (*N. teydea*) (Fig. 3.4) (Ubera & Valdés, 1983), así como una variedad de la misma (var. *albiflora* Svent.), localizada únicamente hasta el momento en la isla de Tenerife.

También este género está presente en algunas zonas de Australia, donde las especies crecen más o menos asilvestradas, debido a su cultivo y posterior naturalización (Negrín & La Serna, 1985).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

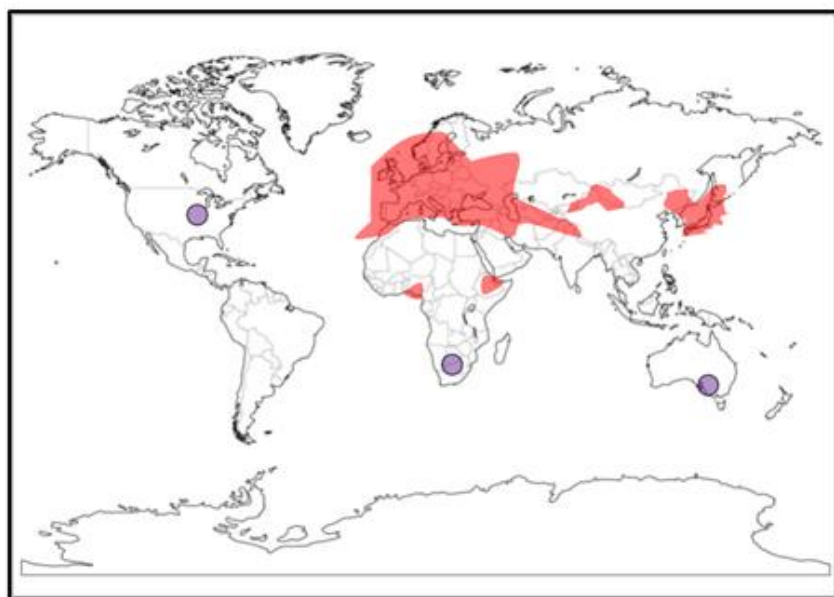


Figura 3.1.- Distribución mundial del género *Nepeta* L. (●) Áreas de localidades no concretas (modificado de Negrín & La Serna, 1985).

III. 2.3. USOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL GÉNERO NEPETA

Los metabolitos secundarios obtenidos de plantas del género *Nepeta*, han sido usados en medicina tradicional desde tiempos prehistóricos, para el tratamiento de disentería, de cólicos, diarreas, cáncer, resfriado común, ansiedad y tensión, problemas en los dientes, dolor de oído, riñón, enfermedades del hígado y en muchos problemas del corazón (trombosis cardiacas, taquicardias, angina de pecho y debilidad del corazón). También, han sido usados como sedante, antiséptico, antitusivo, diafóretico, antiasmático, antioxidante, anti-inflamatorio, expectorante, antispasmódico, tónico estomacal, antipiréticos, antídoto contra la mordedura de serpientes y escorpiones, etc. Todas estas propiedades mostradas por las diferentes especies del género *Nepeta* han sido atribuidas a la composición de sus flavonoides y aceite esencial (Sharma & Singh, 2013).

III. 3. ESPECIE NEPETA TEYDEA

III. 3.1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE NEPETA TEYDEA

La clasificación taxonómica de la especie vegetal *Nepeta teydea* var. *teydea*, se resumen en la tabla 3.3.

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Tabla 3.3.- Clasificación científica de *Nepeta teydea* var. *teydea*. (NOTA: Hasta el nivel de familia hemos seguido a Izco et al., 1997. Para el nivel de subfamilia a Hassan & Khuroo, 2011; Celenk & Malyer, 2008. Y desde el nivel del género hasta la variedad hemos seguido a Negrín & La Serna, 1985).

Clasificación científica	
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Lamiaceae</i>
Subfamilia	<i>Nepetoideae</i>
Género	<i>Nepeta</i>
Especie	<i>Nepeta teydea</i>
Variedad	<i>teydea</i>

III. 3.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE NEPETA TEYDEA

Se trata de caméfitos de 40cm a 1m de altura en la época de floración, ramificados desde la base, y pelosos. Presentan pelos tectores (pelos no glandulares) blancos, simples, largos y pluricelulares. Además, muestran dos tipos de pelos glandulares: unos de color blancos de cabeza unicelular globosa y con un pie bastante largo constituido por varias células, y los otros pelos glandulares son “sésiles” hialinos o amarillentos de cabeza pluricelular y con un pie muy corto, hundido en la epidermis (Negrín & La Serna, 1985).

Nepeta teydea muestra raíces que presentan fracciones más o menos tuberizadas. Además, presenta tallos erectos, tetragonales, pelosos, más o menos leñosos, de color marrón en la base y herbáceos de color verde hacia el ápice, en donde se tiñen más o menos de violáceo a la altura de las inflorescencias (Fig. 3.2). Los entrenudos presentan longitudes variables (1.0 – 5.5cm), de forma que, los entrenudos de las zonas basales son más cortos y se van alargando a medida que nos acercamos al ápice de la planta, cuyas raíces presentan fracciones más o menos tuberizadas (Negrín & La Serna, 1985).

En cuanto a las hojas, presentan un suave olor a limón. Las hojas basales son crenado-dentada, pelosas y de color verde en ambas caras foliares, oblongas, lanceoladas u ovalo-lanceoladas, cordadas en la base, y en el ápice se vuelven agudas y redondeadas. Las hojas superiores o florales, presentan igual morfología que las hojas basales, pero son

más puntiagudas en el ápice. Se caracterizan por ir disminuyendo de tamaño progresivamente hasta adquirir aspecto bracteiforme las hojas más superiores. La nervadura de la hoja es reticulada, con nervios hundidos en el haz y muy prominentes en el envés. Presenta pelos no glandulares y glandulares pedicelados, en ambas caras foliares, pero, los pelos glandulares de cabeza pluricelular están ausentes en el haz. Los estomas se encuentran presentes tanto en el haz como en el envés de la hoja. Los peciolo son pelosos (de una longitud de 0.2 – 1.0cm de largo) y son siempre de menor longitud que el limbo (Negrín & La Serna, 1985).

Las inflorescencias terminales con 1 – 5 espicastro, opuestas y de aspecto candelabriforme cuando hay más de uno. Los espicastro están formados por verticilastro decusados y bibracteados. Los basales están distanciados entre sí, cortamente pedunculados y de aspecto glomeruliforme, mientras que los superiores subsésiles, están muy próximos entre sí y tienen un aspecto espiciforme en su conjunto. Las brácteas de los verticilastro inferiores muestran morfología de hojas florales reducidas, lanceoladas, dentadas y cordadas en la base, y se presentan agudas y acuminadas en el ápice. Son pelosas y verdes en ambas caras, con nervadura reticulada, disminuyendo progresivamente de tamaño hacia el ápice del espicastro, donde se asemejan a las bractéolas variando de lanceoladas a linear-lanceoladas en la sucesión, con márgenes enteros o sinuados, acuminados con nervadura semi-reticulada, más o menos teñidas de violeta o raramente de color azul-añil, pelosas en la cara externa y de glabras a glabriúsculas en la interna (Negrín & La Serna, 1985).

Las flores subsésiles, están dispuestas en cimas bíparas opuestas más o menos pedunculadas, con pedúnculos de mayor tamaño a las cimas de los verticilastro inferiores o glomeruliformes. Las bractéolas, son linear-lanceoladas, acuminadas, nerviadas, teñidas de violeta o raramente de azul-añil, pelosas en los márgenes, glabriúsculas en la cara externa y glabras en la cara interna. El cáliz es tubular o tubular-campanulado, y presenta pelos glandulares en el exterior, 15 nervios todos conspicuos y bilabiados; el tubo es de color verdoso glabro interiormente; los dientes teñidos de violeta o raramente azul-añil con pelos de recubrimiento en los márgenes y cara interna, siendo en longitud, los del labio superior ligeramente mayores a los del labio inferior, y son más anchos en la base. La corola de color azul-violeta, es incurva, bilabiada y pelosa exteriormente; el tubo es exerto, estrecho en la base y dilatado en la garganta; el labio superior es recto, escotado, con márgenes enteros; el labio inferior es trilobulado, con el lóbulo central

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

maculado, cocleariforme, festoneado, peloso interiormente, y mayor que los laterales. Los estambres didínamos, paralelos, ascendentes bajo el labio superior de la corola, y los posteriores son más exertos pero de menor longitud que los anteriores. Los filamentos (posteriores y anteriores) son blancos y glabros, y las anteras son de color purpúreo-violáceas. El estilo es blanco y glabro, y las lacinias del estigma violáceas, subiguales. Los discos nectaríferos son de color blanco (Negrín & La Serna, 1985).

Las núculas son negras, tuberculado-rugosas, oblongas, de 1.4 – 2.0 x 0.75 – 1.0mm, ápice desde más o menos redondeado a convexo, y la quilla bien patente. La superficie está recubierta de micro y macroaccidentes. En la zona apical, existen pelos glandulares pedicelados que sólo son observables al MEB (Negrín & La Serna, 1985).



Figura 3.2.- 1) Pliego de herbario de *Nepeta teydea* (Webb & Berthel, 1836); 2) Planta de *Nepeta teydea* recolectada del Parque Nacional del Teide.



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 3.3.- Fotos de campo de *Nepeta teydea*. 1) Porte arbustivo de *Nepeta teydea*; 2) Porte arbustivo de *Nepeta teydea* en floración; 3) Detalle de la inflorescencia.

III. 3.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE NEPETA TEYDEA

La distribución de la especie *Nepeta teydea* var. *teydea* en la isla de Tenerife se encuentra distribuida en el Parque Nacional del Teide (Fig. 3.3). Concretamente, se distribuye de manera relativamente abundante en los peñascales y malpaíses de La Caldera de Las Cañadas, donde se pueden observar la formación de ciertas poblaciones. Se trata de una especie típica de las formaciones de leguminosas de la alta montaña canaria, y puede alcanzar la cota de 2.700 metros de altura en las laderas del Teide (Lomo Tieso) (Negrín & La Serna, 1985).

Como sucede en muchas especies características de estas formaciones subalpinas, *Nepeta teydea* es capaz de realizar movimientos descendentes sobre todo en las cabeceras de los barrancos dorsales, alcanzando las cotas medias de los pinares. Se ha detectado esta especie hasta los 1.300m de altitud (Barranco de los Albarderos), lo que se traduce en un desplazamiento altitudinal de *N. teydea* de 1.400m, teniendo su altura óptima entre los 1.900 y los 2.500m. Además, esta planta ha sido recolectada en cotas inferiores entre los 700 y los 900m de altura, en el Barranco del Río (Negrín & La Serna, 1985).



Figura 3.4.- Distribución de *Nepeta teydea* en las Islas Canarias (modificado de Negrín & La Serna, 1985).

En la isla de la Palma, *Nepeta teydea* parece ser más escasa. Ha sido herborizada por Sventenius en las cercanías del Roque de los Muchachos y en la Cumbre de Tijarafe, en condiciones ecológicas y fitosociológicas semejantes a las de la isla de Tenerife (Negrín & La Serna, 1985).

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

III. 3.4. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y ECOLÓGICAS DE NEPETA TEYDEA

Las plantas de *Nepeta teydea*, empiezan a florecer en el mes de abril alcanzado su período óptimo en mayo. Fructifican en los meses de junio y julio, época en la que las cuatro núculas que posee esta especie se desarrollan y pueden alcanzar la madurez (Negrín & La Serna, 1985).

Con respecto a la fase de germinación de las semillas, los cultivos llevados a cabo en condiciones ecológicas algo diferentes a las del hábitat natural de la especie, indican que el período de germinación es más bien corto. Sin embargo, este período parece ser más largo que en el caso de la variedad *albiflora*. Análogamente el poder germinativo parece ser mayor en la variedad *nepeta* (Negrín & La Serna, 1985).

Se ha observado que las hojas de las plántulas no muestran desde un principio la misma morfología que la que encontramos en ejemplares adultos o que hayan florecidos, es decir, que las hojas son ovadas inicialmente y a medida que transcurre el tiempo, las hojas se van transformando en ovalo-lanceoladas (Negrín & La Serna, 1985).

III. 3.5. USOS MEDICINALES DE NEPETA TEYDEA

En concreto, los usos medicinales de *Nepeta teydea* Webb et Berth, no son tan conocidos como los de otras especies de Labiadas presentes en el Archipiélago Canario (como el “algaritofé”, la “salvia”, el “poleo”, la “nauta” y la “menta”). Las hojas de esta especie, conocida en Tenerife con el nombre de “tonática”, “hierba del Teide” o “salvia de la cumbre”, son usadas por la gente de la isla en infusiones, como diurético o hipoglucemiante (Negrín & La Serna, 1985; Pérez de Paz & Hernández, 1999).

III. 3.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE NEPETA TEYDEA

Durante los últimos años, se vienen realizando en el Instituto de Productos Naturales Orgánicos del C.S.I.C (La Laguna, Tenerife) estudios fitoquímicos de la especie *Nepeta teydea*. (Negrín & La Serna, 1985). De esta planta se han aislado por primera vez en la naturaleza, diterpenos dehidroabietano como el teideadiol y ácido teídico; se han obtenido los diterpenos teidediol, como el 13 α -isopropil-8 (14)-podocarpin-7 α , 18-diol y 13 α -isopropil-7 (8)-podocarpin-14 α , 18-diol; y los ácidos triterpénicos oleanólico, ursólico, 2 α , 3 β -dihidroxi-ursólico y 2 α , 3 β , 19 α -trihidroxi-ursólico (Fraga et al., 1998). Además, se han aislado dos compuestos espirostánicos como

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

el 2,2,8,8- tetrametil-espiro (5,5)-undecan-4,10-diona y 2,2,8,8-tetrametil-espiro (5,5)-undecan-4,10 diol. (Negrín & La Serna, 1985). También de esta especie se han obtenido ácidos triterpénicos como los ácidos 2 α , 3 β -dihidroxi-ursólico, 2 α , 3 β , 19 α -trihidroxi-ursólico, ursólico y oleanólico (estos dos últimos son compuestos químicos presentes en las Labiadas) (Fraga et al., 1998). Del mismo modo, se han obtenido el ácido esteárico, el β -sitosterol y su β -D-glucósido (Negrín & La Serna, 1985).

Además en trabajos realizados posteriormente, se describió el aislamiento de doce nuevos diterpenos en *Nepeta teydea*, y a los que denominaron como acetato de dehidroabietanol, 18- monoacetato de teideadiol, 18-malonato de teideadiol, netiol, 7 α -monoacetato de netidiol A, 14-monoacetato de netidiol B, 18-monoacetato de netidiol B, 7-monoacetato-18-malonato de netidiol A, 14-monoacetato-18- manolato de netidiol B, 7 α -propil éter de netidiol A y 18-monoacetato netidiol A. Asimismo, se obtuvo de esta planta el nuevo monoterpeno nepeteidol, el epóxido del fitol y la flavona 5,6,7,4'-tetrahidroxiflavona (Mestres et al., 1993; Fraga et al., 1998). Los aceites esenciales también han sido estudiados en esta especie (Fraga et al., 1998). Por último, se ha aislado otro compuesto, el Teidealdehído, un terenoide C23 con un nuevo esqueleto carbonado (Fraga et al., 2013).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

III. 4. BIBLIOGRAFÍA

- Akcin ÖE, Özyurt MS, Senel G. 2011.** Petiole anatomy of some Lamiaceae taxa. *Pak J Bot* 43 (3): 1437-1443.
- Aedo C. 2010.** Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. XII. Verbenaceae- Labiatae- Callitrichaceae. Morales, R., Quibtanar, A., Pujadar, A.J. & Cirujano. S. (eds). Real Jardín Botánico CSIC. Madrid.
- Celenk S, Malyer H. 2008.** A palynological study of the genus *Nepeta* L. (Lamiaceae). *Plant Syst Evol* 276: 105-123.
- Drew TB, Sytsma JK. 2012.** Phylogenetic, biogeography, and staminal evolution in the Tribe Mentheae (Lamiaceae). *Amer J Bot* 99 (5): 933-953.
- Fernández- Alonso JI, Rivera- Díaz O. 2006.** Las labiadas. En: Libro Rojo de Plantas de Colombia. Vol.III. Las bromelias, las labiadas y las pasifloras. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. (Eds: García N & Galcano). Instituto Alexander von Humboldt. Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Bogotá, Colombia. pp.385-582.
- Fraga BM, Díaz CE, Amador LJ. 2013.** Teydealdehido, a C23-terpenoid from transformed root cultures of *Nepeta teydea*. *Tetrahedron Letters* 54(32): 4337-4338.
- Fraga BM, Hernández GM, Mestrés T, Arteaga JM. 1998.** Abietane diterpenes from *Nepeta teydea*. *Phytochem* 47 (2): 251-254.
- Gordillo MM, Fragoso MI, García PM, Montiel O. 2013.** Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 30-86.
- Hassan T, Dar GH, Khuroo AA. 2011.** Taxonomic status of genus *Nepeta* L. (Lamiaceae) in Kashmir Himalaya, India. *Iran J Bot* 17 (2): 181-188.
- Izco J, Barreno E, Brugués M, Costa M, Devesa JA, Fernández F, Gallardo T, Llimona X, Prada C, Talavera S, Valdés B. 1997.** Botánica. 2ª Ed. Madrid: McGraw-Hill. Interamericana de España, S.A.U. 906p.
- Jamzad Z, Grayer JR, Kite CG, Simmonds SJM, Ingrouille M, Jalili A. 2003.** Leaf surface flavonoids in Iranian species of *Nepeta* (Lamiaceae) and some related genera. *Biochem System Ecol* 31: 587-600.
- Martínez GM, Fragoso MI, García PMR, Montiel O. 2013.** Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 30-86.
- Mestres, I.T. 1993.** Aportaciones a la fitoquímica de Labiadas medicinales del archipiélago canario. Tesis doctoral. Director/es: Fraga, G. B. & Arteaga, D. J. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna.

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Morales R. 2000.** Diversidad en labiadas mediterráneas y macaronésica. *Portugaliae Acta Biol* 19: 31-48.7
- Negrin M^aL, La Serna I. 1985.** Revisión taxonómica del género *Nepeta* L. (Lamiaceae) en la región macaronésica. *Vieraea* 15: 47-94.
- Pérez de Paz P, Hernández PC. 1999.** Plantas medicinales o útiles en la flora canaria: Aplicaciones populares. Francisco Lemus (ed.). Tenerife
- Sharma A, Singh CD. 2013.** Phytochemical composition of essential oils isolated from different species of genus *Nepeta* of Labiatae family: a review. *Pharmacophore* 4 (6): 181-211.
- Strasburger E, Noll F, Schenck H, Schimper AFW. 2004.** Tratado de Botánica. 35º Ed. Actualizada por: Sitte, P; Weiler, E.W; Kadereit, J.W; Bresinsky, A. & Körner, C. Barcelona: Eds Omega S.A.1134p.
- Ubera JL, Valdés B. 1983.** Revisión del género *Nepeta* (Labiatae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Lagascalia* 12(1):3-80.
- Valades C M^oC. 2001.** Estudio anatómico de siete especies de la familia Labiatae del municipio de Santiado Nuevo León, Mexico. Tesis doctoral. Director/es: Torres Cepeda Teresa Elizabeth. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Webb B, Berthelot PS. 1936.** Historie naturelle des iles Canaries III. 2. *Phytographia Canariensis*. Section 3. Planches. 1836-1850 (Im.). Tab. 165.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS SUPERIORES

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

IV. CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS SUPERIORES

IV.1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos constituye una técnica de gran importancia para solucionar problemas en el campo de la biología vegetal, ya que nos permite obtener unos sistemas modelos ideales para la investigación (fisiológica, bioquímica, genética y estructural). Además, es una herramienta de gran valor, para llevar a cabo la clonación, conservación y manipulación *in vitro* de material vegetal. (George et al., 2008).

El cultivo *in vitro* de plantas se define como el cultivo de plantas enteras, semillas, embriones, órganos, explantos, tejidos, células y protoplastos de plantas, en condiciones asépticas, dentro de un recipiente que contiene un medio nutritivo artificial y bajo condiciones ambientales controladas de luz, temperatura y humedad (Pierik, 1990; Pérez-Francés, 2006).

IV.1.1. FUNDAMENTOS DEL CULTIVO *IN VITRO*

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se basa en el principio de la totipotencia, el cual establece que la célula tiene la capacidad para regenerar a partir de ella, los diferentes tipos de células que componen un organismo multicelular. De manera que una célula contiene toda la información genética para regenerar un organismo completo (Pérez-Francés, 2006).

Las técnicas del cultivo *in vitro* se caracterizan porque se lleva a cabo a microescala, se optimizan tanto las condiciones ambientales como nutricionales y hormonales. Además, permite obtener plantas que están libres de microorganismos patógenos (hongos, bacterias y virus) y de plagas vegetales (insectos y nematodos). Por otro lado, generalmente no se reproducen el patrón normal de desarrollo de una planta, de forma que a partir de un tejido aislado puede surgir la formación de un callo, o puede desarrollarse de otras formas poco usuales (por ejemplo, formación de órganos). Por último, permite cultivar protoplastos o células individuales y realizar manipulaciones que antes eran imposibles. (Pierik, 1990).

IV.1.2. APLICACIONES DEL CULTIVO DE TEJIDO *IN VITRO* EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Las técnicas de cultivo *in vitro* son muy variadas y pueden ser utilizadas para diversos fines. En resumen, podemos distinguir tres tipos de aplicaciones básicas de las técnicas de cultivo *in vitro*:

- 1) Aplicaciones en la Investigación. Los cultivos *in vitro* han contribuido al conocimiento de la biología de las plantas, ya que ha facilitado el estudio de las células vegetales y su relación con el organismo multicelular al que pertenecen, y estudiar la fisiología de las células, tejidos y órganos en cultivo. Así, los cultivos de células en suspensión son sistemas experimentales muy útiles para estudios bioquímicos, de citodiferenciación, embriogénesis, etc. Por otro lado, los cultivos de callos y de tejidos diferenciados, permiten el estudio de los factores que controlan la organogénesis. Por último, los cultivos de órganos aislados y embriones facilitan información sobre el crecimiento y desarrollo vegetal (Pérez-Francés, 2006).
- 2) Aplicaciones agronómicas. Se ha conseguido el saneamiento de una gran variedad de especies que estaban infectadas por diferentes virus a través del cultivo *in vitro*. El sistema más eficaz en la eliminación de patógenos (virus, hongos y bacterias) es el cultivo de meristemos, acompañado en muchos casos, por tratamientos de termoterapia o quimioterapia (Fraccioli & Marani, 1998). En otras especies vegetales leñosas (cítricos, la vid, el manzano) el cultivo de meristemos *in vitro* no ha resultado viable, y en estos casos, se ha utilizado la técnica de microinjertos *in vitro* (George et al., 2008).

Los diferentes tipos de micropropagación de plantas constituyen una importante alternativa a la propagación vegetativa convencional, de manera que estas técnicas son utilizadas a escala comercial para la multiplicación de gran cantidad de plantas herbáceas y también leñosas de interés (Pérez-Francés, 2006).

Los cultivos *in vitro* constituyen una excelente fuente de material para la crioconservación en bancos de germoplasma, pudiendo ser utilizadas junto con la micropropagación, en los programas de conservación de plantas en peligro de extinción (Pérez-Francés, 2006). Pero cuando la conservación de semillas no permite la posibilidad de un banco de germoplasma (muchos cítricos, plátanos, etc.) las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* ofrecen alternativas a las formas tradicionales de conservación basadas en colecciones de plantas cultivadas en campo (Pérez, 2000).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Otra aplicación, es que se pueden cultivar *in vitro* embriones zigóticos con el propósito de recuperar híbridos que, en condiciones naturales abortan. Además, si las condiciones de la semilla impiden o limitan el desarrollo de los embriones, la extracción del embrión y su cultivo en un medio nutritivo adecuado permite el desarrollo óptimo de la plántula (Tanji, 2002).

La variación somaclonal puede ser inducida en los cultivos *in vitro* con el fin de generar variabilidad genética que puede ser explotada en programas de mejora (George et al., 2008). En estos programas se puede incluir las técnicas de obtención de *haploides in vitro*, la fusión de protoplastos, etc. Además, los cultivos de callos y células en suspensión pueden ayudar a la creación de variantes genéticas (Pérez-Francés, 2006).

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una herramienta para la transformación genética de especies de interés agronómico y ornamental. Con esta transformación se generan plantas completas fértiles sin alterar el resto de las características propias de dicha variedad. Las técnicas más utilizadas han sido la transformación mediada por *Agrobacterium* sp., la transferencia directa a protoplastos mediante tratamientos químicos o eléctricos y la transferencia directa a células y tejidos mediante bombardeo de microproyectiles. (Pérez-Clemente et al., 2004).

- 3) Aplicaciones en medicina o en la industria agroalimentaria. Las plantas son importantes fuentes de sustancias de interés para el hombre (Pérez-Francés, 2006). Se trata de productos metabólicos de importancia comercial y son usados en las industrias farmacéutica, alimenticia, de cosméticos y de numerosas sustancias de interés agroquímico (Karuppusamy, 2009). Se estima que más de 100.000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas (Bhalla et al., 2005). Aproximadamente 1.600 estructuras químicas nuevas obtenidas a partir de plantas superiores se describen cada año (Sajc et al., 2000; Fiehn, 2002). Para la obtención de todos estos metabolitos secundarios, se han desarrollado sistemas de cultivo vegetal a gran escala en biorreactores (Pérez-Francés, 2006).

IV. 1.3. TIPOS DE CULTIVOS

Los métodos de propagación vegetativa que se seleccionen en la multiplicación *in vitro* depende de la especie vegetal con la que se va a trabajar y de la finalidad del esquema de micropropagación (Pierik, 1990)

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Los métodos de propagación vegetativa en función del material vegetal de partida que se coloque en cultivo (Pierik, 1990) se pueden clasificar en:

1. Cultivo de plantas intactas. Se trata de la siembra de una semilla *in vitro*, obteniéndose primero una plántula y finalmente una planta.
2. Cultivo de embriones. Se trata del cultivo de embriones que han sido aislados después de retirar el resto de los tejidos de la semilla.
3. Cultivo de meristemos y yemas terminales o laterales.
4. Cultivo de órganos aislados. Se trata de la siembra de raíces, anteras o bien porciones de tejidos u órganos aislados de la planta (explantes).
5. Cultivo de callo. Se trata de la siembra de tejidos desdiferenciado *in vitro* formándose órganos adventicios o embriones somáticos.
6. Cultivo de células aisladas de un tejido, un callo o un tejido en suspensión. Estas células aisladas son obtenidas con la ayuda de enzimas o mecánicamente.
7. Cultivo de protoplastos. Se obtienen a partir de células, por digestión enzimática de la pared celular.

En nuestro trabajo hemos utilizado el cultivo *in vitro* de plantas intactas, de órganos vegetales aislados (explantes) y el cultivo de callo.

IV.1.4. FACTORES QUE AFECTAN AL DESARROLLO *IN VITRO*

Los tejidos vegetales *in vitro* tienen las mismas necesidades a los de la planta intacta. Sin embargo, las células, tejidos y órganos aislados generalmente no presentan la capacidad para sintetizar carbohidratos, la mayoría de las vitaminas y los reguladores de crecimiento. El éxito de un cultivo *in vitro* depende fundamentalmente de la naturaleza del explante, la composición del medio nutritivo y las condiciones en las que se incuba el cultivo (Pérez-Francés, 2006).

IV.1.4.1. MEDIO DE CULTIVO *IN VITRO*

El medio nutritivo es un factor importante en el cultivo *in vitro* de material vegetal, ya que además de aportar los componentes nutricionales necesarios para el desarrollo y crecimiento de la planta, algunos componentes del medio actúan simplemente como factores físicos (Pierik, 1990). A continuación, se describen los componentes de un medio nutritivo.

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

1. Agua. Es de vital importancia controlar la calidad del agua, ya que constituye el 95% del medio nutritivo (Pierik, 1990). Para los trabajos de investigación se recomienda que el agua haya sido destilada, y nunca se debe de utilizar agua del grifo. En nuestro laboratorio, contamos con un sistema de destilación de agua por ósmosis inversa que garantiza una buena calidad del agua destilada (Pérez-Francés, 2006).
2. Sales minerales. Los elementos minerales que son necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas, son los mismo que para el cultivo de los tejidos y órganos vegetales cultivados *in vitro*, y se pueden dividir en macronutrientes y microelementos. Los primeros, son elementos minerales que los organismos vegetales necesitan en cantidades relativamente grandes. Aquí nos encontramos con el N (responsable de los efectos más marcados en el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales *in vitro*), P, K, Ca, Mg y S. Por otro lado, están los microelementos, que son nutrientes minerales que necesitan las plantas en cantidades muy pequeñas, siendo el Fe, el micronutriente que puede afectar más al crecimiento cuando existen deficiencias en el medio (Pérez-Francés, 2006). En muchas ocasiones, cantidades supraóptimas de estas sustancias pueden ocasionar problemas de toxicidad en los tejidos (Teasdale, 1987).

Existe una gran cantidad de posibilidades para las mezclas de macro- y micronutrientes (Pierik, 1990). De hecho, existen muchas formulaciones salinas para la preparación del medio de cultivo *in vitro*, siendo la más utilizada la formulación descrita por Murashige & Skoog (1962), porque la mayoría de las plantas reaccionan en él positivamente (Pierik, 1990).

3. Fuente de carbono. Los cultivos *in vitro* de tejidos vegetales normalmente necesitan un aporte exógeno de carbohidratos ya que, el crecimiento tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis (los tejidos verdes no son suficientemente autotróficos *in vitro*). Generalmente se usa la sacarosa (un disacárido), ya que este azúcar se sintetiza y se transporta de forma natural por las plantas, y aunque su concentración depende mucho del tipo y edad del material vegetal, normalmente se utiliza en un rango del 2-3% (Pierik, 1990).

La sacarosa al esterilizarse en autoclave, una parte se hidroliza dando glucosa y fructosa. La sacarosa en los cultivos *in vitro* actúa como fuente de energía y poder reductor para los diferentes procesos de crecimiento y desarrollo. Además, aporta los esqueletos carbonados para la biosíntesis de las diferentes moléculas

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

que forman las células vegetales, y contribuye de forma importante al potencial osmótico de los medios de cultivo (Pérez-Francés, 2006).

4. Reguladores de crecimiento. Las hormonas vegetales o fitohormonas son mensajeros químicos que permiten la coordinación celular durante los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas (Segura, 2000). Los efectos de las fitohormonas sobre los procesos vegetales, son el resultado de la interacción entre diferentes tipos de hormonas. Actualmente, los expertos reconocen al menos, nueve grupos de hormonas vegetales, que incluyen a las auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, poliaminas, brasinosteroides, jasmonatos y salicilatos. De todas ellas, hablaremos de las auxinas, citoquininas y giberelinas.

Las auxinas, fueron las primeras hormonas vegetales descubiertas, siendo la más ampliamente distribuida en el reino vegetal el ácido indolacético (AIA). Otras auxinas naturales son el ácido fenilacético, el ácido indolbutírico (AIB) y el ácido 4-cloro-indolacético. Además, existen compuestos con actividad auxínica y que se denominan auxinas sintéticas, y dentro de las cuales, destacan el ácido naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) o el ácido 2,4,5 triclorofenoxiacético (2,4,5-T) (Pérez-Francés, 2006).

Las auxinas en el cultivo *in vitro*, generalmente producen la elongación celular y expansión de los tejidos, la división celular (formación de callos,) y la formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión (Pierik, 1990). Además, las auxinas, normalmente en combinación con citoquininas, son muy útiles en los protocolos de micropropagación de plantas, tanto para la iniciación y multiplicación de las yemas como para el enraizamiento de microesquejes (Pérez-Francés, 2006).

Las citoquininas, son un grupo de hormonas vegetales que estimulan la división celular en presencia de auxinas. Además, estas sustancias producen muchos efectos diferentes sobre el desarrollo vegetal (organogénesis, disminuye la dominancia apical, retraso de la senescencia foliar, etc.) (Barcelo et al., 2001; Pierik, 1990; Davies, 1995; Segura, 2000a). Su papel en el desarrollo del tallo les hace muy útiles en micropropagación (Howell, 1998; Howell et al., 2003). Es necesario tener en cuenta que en concentraciones elevadas puede inducir la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

formación de vástagos adventicios, pero, generalmente inhibe la formación de raíces (Pierik, 1990).

Todas las citoquininas naturales son derivados de la base púrica adenina (6-aminopurina), y pueden encontrarse en los tejidos vegetales tanto en forma libre como conjugadas con otros compuestos. Las más utilizados en cultivo *in vitro* son la Benciladenina (Bencilaminopurina) (BA o BAP), Quinetina (KIN), Tidiazuron (THI o TDZ), un compuesto particularmente útil en el cultivo *in vitro* de plantas leñosas (Huetteman & Preece, 1993), Isopenteniladenina (2iP), Zeatina y su conjugado el ribósido de zeatina (Pérez-Francés, 2006).

Giberelinas son hormonas vegetales que generalmente no se consideran esenciales en el cultivo *in vitro* de las plantas superiores (Pierik, 1990).

Sin embargo, estos compuestos pueden regular una gran diversidad de procesos en los organismos vegetales (Barcelo et al., 2001; Davies, 1995; Talon, 2000).

Las giberelinas controlan el crecimiento y elongación del tallo (estimulan la elongación de los entrenudos), estimulan la germinación de las semillas y controlan el proceso de la inducción floral en muchas plantas, así como el crecimiento y desarrollo del fruto. También puede romper el reposo de yemas y embriones aislados (Pérez-Francés, 2006).

Se trata de diterpenos tetracíclicos ácidos que tienen un núcleo constituido por un anillo denominado giberelano. Las giberelinas más utilizadas en cultivo *in vitro* son el ácido giberélico (GA₃) y la giberelina GA₇, pero hay que tener en cuenta que se trata de sustancias termolábiles y que se pierde el 90% de su actividad biológica después del autoclave (Van Bragt et al., 1971).

5. Algunas vitaminas y aminoácidos. El ácido nicotínico, piridoxina, y tiamina son las vitaminas más utilizadas en los medios nutritivos estándares. La tiamina es esencial para el crecimiento de los cultivos vegetales (Collins & Edwards, 1998). El meso-inositol es también un componente habitual de los principales medios de cultivo (Pierik, 1990).

La glicina es el aminoácido más utilizado. Además, los embriones inmaduros necesitan la presencia de glutamina en el medio de cultivo. (La L-glutamina es el aminoácido usado más comúnmente como fuente de nitrógeno; también se pueden utilizar la adenina y la asparagina) (Pierik, 1990).

6. Agente solidificante. Los medios de cultivos *in vitro* pueden ser líquidos o pueden ser gelificados para darles una consistencia semisólida, con lo que se

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

consigue mantener a los explantes en una posición fija. El agente gelificante más utilizado es el agar, un polisacárido de elevado peso molecular que se obtiene de ciertas algas marinas. Existen diferentes tipos de agar en función del grado de pureza que presenten. La agarosa es un agar de gran pureza que se usa especialmente para el cultivo de células aisladas y protoplastos. El agar se suele emplear a una concentración del 0.6-0.8%. Por debajo de la concentración indicada, el medio tiene problemas para poder solidificar, y por encima del 1% de agar, el medio se solidifica en exceso y se producen problemas de absorción de agua y nutrientes por parte del explante (Pérez-Francés, 2006). Además, puede producir problemas a la hora de la inoculación del explante en el medio de cultivo (Pierik, 1990).

Existen agentes gelificantes de alta calidad como es el Gelrite y el Phytigel, que son heteropolisacáridos naturales que forman geles similares al agar. Se utilizan a concentraciones menores y al solidificar muestran un aspecto mucho más claro que el agar. Otro agente gelificante es el alginato que es similar a la agarosa, y se utiliza para cultivos de células vegetales inmovilizadas y protoplastos. (Pérez-Francés, 2006).

IV.1.4.2. CONDICIONES FÍSICAS DEL CULTIVO *IN VITRO*

El control de los factores físicos como es la luz, temperatura y humedad es fundamental para el éxito en el cultivo de células, tejidos y órganos vegetales *in vitro*. Sin embargo, el ajuste adecuado de estos factores dependerá del tipo de cultivo y de los objetivos que nos hayamos planteado. Por ello, los cultivos *in vitro* se incuban en cámaras de crecimiento bajo condiciones controladas de luz, temperatura, humedad, etc. (Pérez-Francés, 2006).

Las condiciones ambientales en un cultivo *in vitro* (dentro de un tubo de ensayo o un frasco de cultivo) presentan una serie de características como son: una alta humedad relativa, una constante temperatura, una baja irradiancia, fluctuaciones en la concentración de CO₂, la total ausencia de patógenos, unas concentraciones relativamente altas de azúcares, sales minerales, reguladores de crecimiento y otras sustancias orgánicas. Además, durante el desarrollo del cultivo se produce la acumulación de sustancias tóxicas (Pérez-Francés, 2006).

Bajo estas condiciones se producen bajas tasas de transpiración y de fotosíntesis, bajas tasas de entrada de agua, nutrientes y CO₂ a los tejidos y una alta tasa de

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

respiración, lo cual, puede producir un bajo crecimiento del material vegetal en condiciones *in vitro*. Por ello, un microambiente controlado puede promover un adecuado crecimiento y desarrollo de los cultivos, evitar enfermedades fisiológicas como la hiperhibrididad y mejorar el comportamiento de la vitroplantas durante la fase de aclimatación, lo cual conlleva en conjunto a reducir sustancialmente los costes de producción (Pérez-Francés, 2006).

Resulta necesario, tanto para la investigación como para la aplicación práctica del cultivo *in vitro*, el disponer de una cámara de cultivo, en la que se puedan controlar los siguientes factores (Pierik, 1990):

- 1) La luz. Es un factor importante que afecta al crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que constituye una fuente de energía para la fotosíntesis, una fuente de calor y una fuente de información para el desarrollo de las plantas y que conduce a los procesos de fotomorfogénesis.

El control de la luz en las cámaras de cultivo *in vitro* debe tener en cuenta aspectos como el fotoperiodo, la irradiancia y la composición espectral. Normalmente en las cámaras de crecimiento se utilizan lámparas fluorescentes blancas para suministrar la iluminación necesaria para los cultivos.

- 2) La temperatura. En la mayoría de las cámaras de cultivo la temperatura se mantiene entre 24-25°C que es adecuada para el crecimiento y desarrollo de la mayoría de las plantas. Sin embargo, ciertas especies como las plantas de bulbos, crecen mejor *in vitro* a temperaturas más bajas (aproximadamente unos 18°C) mientras que algunas especies tropicales requieren una temperatura de 28-29°C.

Es necesario tener en cuenta que la temperatura en el interior de un recipiente de cultivo *in vitro* es aproximadamente 1°C mayor que en el exterior bajo condiciones de cultivo convencionales.

- 3) La humedad. Las cámaras de cultivo suelen mantenerse a una humedad relativamente baja (50-60%). Esto se debe a que la humedad en el interior de los recipientes de cultivo es generalmente alta, lo que puede conducir, a un desarrollo anormal de las hojas, la aparición de hiperhibrididad en los tejidos y la supresión de la transpiración (Kozai et al., 1997). La alta humedad en el interior de los recipientes es la causa de la disminución en la transpiración de

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

los cultivos. Además, es importante señalar que una excesiva humedad ambiental puede aumentar de forma peligrosa los niveles de contaminación de la cámara de cultivo.

IV.1.5. MICROPROPAGACIÓN. ASPECTOS GENERALES

Se define a la micropropagación como la propagación vegetativa mediante las técnicas de cultivo *in vitro*. Este término es utilizado porque el tamaño de los propágulos empleados en las técnicas de cultivo *in vitro*, es normalmente mucho menor que el utilizado en la propagación vegetativa convencional. Tiene como finalidad la obtención de una cantidad adecuada de plantas de idénticas características a las plantas madre. De hecho, el desarrollo de los métodos de micropropagación ha permitido una mejora en la producción de determinadas especies (Pérez-Francés, 2006).

La micropropagación, muestra importantes ventajas con respecto a la propagación vegetativa tradicional, pero también puede presentar algunos importantes inconvenientes. Entre las ventajas podemos encontrar que se trata de una propagación más rápida que la propagación vegetativa convencional, es un proceso libre de enfermedades, la cantidad de material vegetal de partida requerido es relativamente pequeño, permite un ahorro en costes de energía y espacio en invernaderos y, por último, permite obtener una gran producción en un pequeño espacio y a lo largo de todo el año. Sin embargo, la micropropagación también presentan importantes inconvenientes, como la aparición de problemas de variabilidad genética, los microesquejes de algunas especies pueden tener problemas de enraizamiento y a la hora de su paso a tierra, el establecimiento *in vitro* de determinadas especies puede ser complicado por la existencia de contaminación endógena o por una excesiva producción de compuestos fenólicos, algunos de los protocolos de micropropagación son muy costosos, y por último, la capacidad de regeneración del cultivo se puede perder con los subcultivos (Colling & Edwards, 1998; Pierik, 1990).

IV.1.6. TIPOS DE MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación de los organismos vegetal puede llevarse a cabo siguiendo tres métodos principalmente, dependiendo de la naturaleza del propágulo (Pérez-Francés, 2006):

- 1) Método de micropropagación mediante yemas axilares. Este método consta de diversas técnicas cuya finalidad es la estimulación de los meristemas

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

preexistentes en los diferentes órganos de la planta (meristemos apicales, meristemos axilares, etc.) para que formen yemas que serán usadas posteriormente como unidades de propagación durante la fase de multiplicación, hasta obtener una cantidad suficiente de material, y finalmente se someterán a un tratamiento de enraizamiento para la obtención de plantas. Las ventajas que presenta éste método, es que no supone cambios dramáticos en la estructura de los tejidos vegetales, y las concentraciones de los reguladores de crecimiento usados en este proceso son relativamente bajas, garantizándose, en la mayoría de los casos, la estabilidad genética del sistema.

El cultivo de meristemos, de segmentos nodales y ápices son ejemplos de técnicas que utilizan este método.

- 2) Método de micropropagación por organogénesis. En este método, se fuerza la formación de nuevos meristemos por la acción de concentraciones relativamente altas de reguladores de crecimiento. El material de partida puede ser cultivo de callos, células en suspensión, segmentos de tallos, hojas, etc. A partir de este tipo de material, se formen yemas adventicias que una vez multiplicadas, se enraízan. También, es posible iniciar el proceso con cultivo de raíces en un medio apropiado, y posteriormente, estas raíces se transfieren a un medio nuevo medio, donde son estimuladas a formar la parte aérea para obtener plantas completas.
- 3) Método de micropropagación por embriogénesis somática. La inducción de embriones somáticos puede realizarse a partir, tanto de células en suspensión como de callos y tejidos diferenciados, siendo necesaria la estimulación con concentraciones relativamente altas de auxinas.

Tanto en este método, como en el método de micropropagación por organogénesis, puede presentar el inconveniente de la aparición de variabilidad genética. Sin embargo, la cantidad de plantas que se puede obtener por ambos métodos puede ser muy alta.

IV. 1.7. ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

Tras seleccionar el material vegetal que se va a utilizar para iniciar el *cultivo in vitro*, se debe diseñar el protocolo de micropropagación, que generalmente se dividen en una serie de etapas que finalmente conducirán a la obtención de las vitroplantas, y que se describen a continuación:

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Fase 0: Fase preparativa. Consiste en una serie de pretratamientos que se les aplican a las plantas (utilizadas como fuente de los explantes para iniciar el cultivo) para conseguir principalmente prevenir los problemas de contaminación reduciendo al máximo, los patógenos que se encuentran de forma natural, en la superficie de la planta (Pérez-Francés, 2006). Con ellos, se consigue mejorar la eficacia de la micropropagación (Debergh & Read, 1991).

Fase 1: Fase de establecimiento o iniciación *in vitro*. En esta etapa se realiza el aislamiento en condiciones estéril de los meristemos, ápices del vástago, explantos, ect, y su cultivo para promover su crecimiento y desarrollo sin contaminación (Pierik, 1990). El éxito de este procedimiento depende de: la elección adecuada del material vegetal, un proceso correcto de esterilización, aislamiento y siembra *in vitro* y, por último, de un medio de cultivo y unas condiciones de cultivo adecuadas (Pérez-Francés, 2006).

Fase 2: Fase de multiplicación. El objetivo en ella es conseguir la propagación sin perder la estabilidad genética (Pierik, 1990). Existen muchos tipos de métodos de multiplicación, pero la que nosotros hemos utilizado es la multiplicación de yemas axilares *in vitro*, cuya finalidad es obtener el mayor número de yemas axilares en el menor tiempo posible. Para ello, es importante el control de la tasa de multiplicación del cultivo (número de yemas viables producidas a partir de cada yema en cada subcultivo) (Pérez-Francés, 2006).

Los dos factores más importantes a tener en cuenta durante esta fase, es por un lado, la composición química del medio de multiplicación (siendo los reguladores de crecimiento presente en él, lo que más afecta a la tasa de multiplicación, especialmente las citoquininas, que estimulan la proliferación de yemas axilares), y por otro lado, las técnicas y condiciones de cultivo *in vitro* número y duración de los subcultivos, tipo de cultivo (en medio líquido o sólidos), y las condiciones de incubación (como el fotoperiodo, intensidad de la luz, temperatura y humedad) (Pérez-Francés, 2006).

Fase 3: Fase de enraizamiento. Esta fase implica la preparación del material vegetal obtenido en la fase 2, para inducir la formación de raíces, ya sea en condiciones *in vitro* o *in vivo* (Pierik, 1990). De manera que, para el enraizamiento *in vitro*, los microesquejes son transferidos a recipientes con un medio de enraizamiento, bajo condiciones de asepsia, y cuando se forman las raíces, la plántula se saca del recipiente

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

y se siembra en un sustrato adecuado. En el caso del enraizamiento *ex vitro* o *in vivo*, el microesqueje se saca del recipiente de cultivo, se somete a un tratamiento de enraizamiento y se planta en un sustrato adecuado (este último tipo de enraizamiento en muchos casos no es posible llevarlo a cabo) (Pérez-Francés, 2006).

La fase de enraizamiento constituye uno de los puntos críticos de los protocolos de micropropagación, estimándose que el coste del enraizamiento supone entre un 35 y un 75% del coste total de la micropropagación (Debergh & Maene, 1981).

Fase 4: Fase de endurecimiento o aclimatación y paso a tierra. Esta fase comprende la transferencia de la vitroplanta desde el tubo de ensayo al suelo en condiciones *in vivo* (Debergh, 1991). Se trata de otro paso crítico del protocolo de micropropagación, ya que las vitroplantas con características especiales (presentan una cutícula poca desarrollada, las hojas muestran tasas bajas de fotosíntesis, los estomas no son totalmente funcionales, deficientes conexiones vasculares entre el tallo y la raíz, y las raíces presentan pocos pelos absorbentes) se deben de adaptar a las condiciones ambientales, que implican una menor humedad relativa, una mayor intensidad de la luz, cambios de temperatura y la presencia de patógenos (Pérez- Francés, 2006).

Bajo estas condiciones, las vitroplantas tienen una habilidad fotosintética muy pobre y muestran una excesiva pérdida de agua (Van Huylenbroeck & Debergh, 1996). Para solucionar estos problemas, es necesaria una fase de aclimatación donde las vitroplantas se someten a las condiciones de invernadero, con una iluminación mayor y una humedad relativa menor a la que tenían en el recipiente de cultivo (Debergh & Zimmerman, 2001).

IV.1.8. CALLOS

Un callo es básicamente un tejido tumoral, no organizado y poco diferenciado, que generalmente surge como respuesta a heridas de órganos y tejidos diferenciados. Cuando se examina un callo, se observa que se trata de un material heterogéneo, ya que normalmente está formado por tejidos diferenciados y tejidos desdiferenciados (Pierik, 1990).

IV.1.8.1. INDUCCIÓN Y CULTIVO *IN VITRO* DE CALLOS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Es posible la formación o inducción de callos en muchas especies diferentes. En condiciones de cultivo *in vitro*, cualquier tipo de órgano (raíz, tallo, hoja, flor) o tejido puede ser utilizado como material inicial para la inducción de callo.

Si el explanto aislado sólo contiene células diferenciadas, es necesario inducir un proceso de dediferenciación, antes de que tenga lugar la división celular (Halperin, 1969). Sin embargo, si el explanto contiene tejidos meristemáticos en el momento de su aislamiento, este se puede dividir inmediatamente, de forma intensiva (Pierik, 1990)

Para iniciar la formación *in vitro* de callos a partir de un explanto, se recomienda el suministro exógeno de reguladores de crecimiento al medio de cultivo. Las exigencias de fitohormonas exógenas (tipos y concentración), dependen en gran manera del genotipo y de su contenido en hormonas endógenas. Así, algunos tejidos vegetales sólo requieren la presencia de una auxina en el medio de cultivo para la formación de un callo. En otros casos, es necesaria la presencia de una citoquinina o una combinación de ambos tipos de reguladores (Pierik, 1990).

Una vez inducido el callo, éste se cultiva en un medio nuevo. Las condiciones de crecimiento (medio nutritivo, factores físicos del crecimiento) son normalmente generalmente similares a las que se utilizan para la inducción del callo, con la excepción de que las concentraciones de auxina y citoquinina son generalmente más bajas. El mantenimiento del cultivo de callo se consigue dividiéndolo en varios trozos y transferirlos periódicamente a nuevo medio fresco.

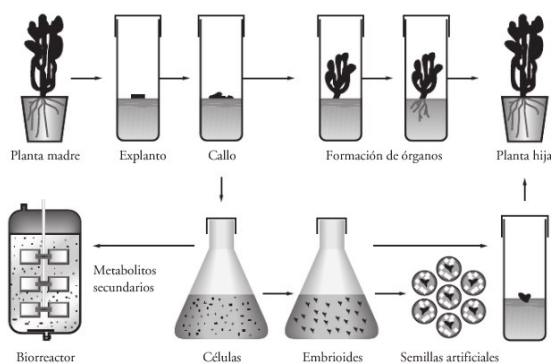


Figura 4.1.- Diferentes posibilidades del cultivo de callos (Muñoz de Malajovich, 2006).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

El cultivo de callos de diferentes plantas, puede presentar diferencias en su estructura y coloración, incluso pueden presentar estas diferencias dentro de una misma especie vegetal, debido a las condiciones del crecimiento o porque se haya producido mutaciones. Así, se pueden encontrar callos que van desde blancos a coloreados, blandos o duros, en forma de agregados en medio líquido, que se separan fácilmente o son difíciles de dividir, etc (Pierik, 1990).

Un problema asociado con el cultivo de callos, es que a menudo presentan una baja estabilidad genética (Fossard, 1977). Debido a estas variaciones genéticas (variación somaclonal), el cultivo de callos es el método menos conveniente para llevar a cabo la micropropagación. Sin embargo, su empleo es inevitable en el caso de algunas especies económicamente importantes (cereales, leguminosas, forrajeras, especies forestales y palmeras tropicales). Por otro lado, la variación somaclonal, permite la selección de variedades de plantas con propiedades nuevas, tales como la resistencia al estrés, al ataque de insectos y patógenos, a herbicidas y compuestos químicos (Al, Mn), y a altas concentraciones salinas (Muñoz de Malajovich, 2006).

Además, el cultivo de callos, permite llevar a cabo el cultivo de células y órganos vegetales. Al disgregarse un callo en medio líquido, se obtiene una suspensión de células que pueden ser cultivada en biorreactores industriales especiales para la producción de semillas artificiales o de metabolitos secundarios. La posibilidad de reemplazar los métodos tradicionales de extracción o síntesis de metabolitos secundarios (de gran interés para la industria farmacéutica, de alimentos y cosmética), por su producción a partir de cultivo de células en biorreactores genera grandes expectativas comerciales (Fig. 4.1) (Muñoz de Malajovich, 2006).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

IV.2. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. 2.1. MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS DE *NEPETA TEYDEA*

IV. 2.1.1. FASE DE GERMINACIÓN

Las semillas son las encargadas de propagar y perpetuar las especies vegetales, y están constituidas por un embrión, un tejido de reserva (albumen o endospermo) y cubiertas protectoras. Su casi detenido metabolismo, les permite permanecer largos periodos de tiempo, hasta que lleguen las condiciones ambientales favorables (humedad, temperatura, oxígeno e iluminación) que permitan la recuperación de su actividad biológica. Aquí tiene lugar, la transformación del embrión en una plántula, que finalmente se convertirá en una planta adulta productora de nuevas semillas.

La germinación se puede definir como el resultado de una serie de procesos metabólicos y morfogénéticos, que comienza con la absorción de agua por los tejidos de la semilla y finaliza con el inicio del crecimiento de la radícula.

Las condiciones necesarias para que se produzca la germinación de una semilla son las siguientes:

- El embrión de la semilla debe estar vivo y tener capacidad de germinar, es decir, la semilla debe ser viable.
- La semilla no debe estar en letargo (debe de estar madura).
- La semilla debe estar sometida a unas condiciones ambientales adecuadas: una temperatura apropiada, provisión de oxígeno, disponibilidad de agua y, la iluminación cuando es necesaria.

IV.2.1.1.1. MATERIALES

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Todos los ensayos se llevaron a cabo a partir de semillas maduras de *Nepeta teydea*, que fueron recolectadas en agosto del 2011, de plantas crecidas en condiciones naturales de las Siete Cañadas, cercanías del Parador del Teide y Llano de Ucanca, dentro del Parque Nacional del Teide (latitud: 28° 09' 0'' - 28° 20' 00'' norte, longitud: 16° 29'00'' - 16° 44'00'' oeste, metros de altura: 2000 – 2100m. (Fig. 4.2.1). Estas semillas fueron almacenadas en un recipiente de cristal cerrado, a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad, durante 6-8 meses, con el fin de mantenerlas en óptimo estado para los ensayos de laboratorio (Fig. 4.2.2).

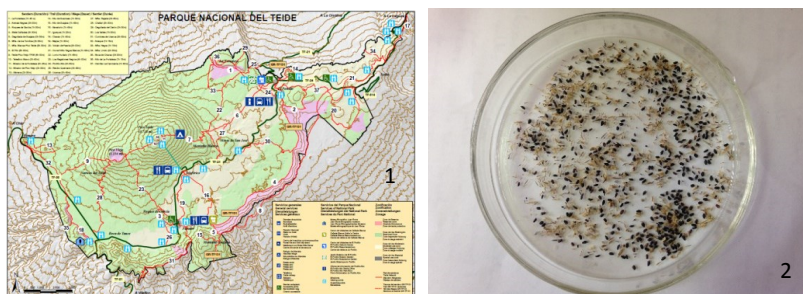


Figura 4.2.- 1) Mapa Oficial del Parque Nacional del Teide; 2) Foto de las semillas de *Nepeta teydea*.

IV.2.1.1.2. METODOLOGÍA

IV.2.1.1.2.1. ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El cultivo *in vitro* de órganos y tejidos vegetales requiere condiciones asépticas, por lo que es necesario una esterilización tanto del material vegetal de partida (el material vegetal desarrolla *in vivo* puede presentar contaminación a nivel superficial causada por distintos tipos de microorganismos) como del instrumental y material de laboratorio que se emplearán a lo largo de este proceso.

Con el objetivo de eliminar la presencia de estos patógenos fue necesario realizar una esterilización superficial de las semillas previa a su introducción *in vitro*. Para ello, las semillas se introdujeron en un eppendorf de 2ml con agua y 10-20 gotas/l del detergente Tween 80 durante 1 hora, en condiciones de agitación continua y al vacío. El Tween 80 es un agente mojante que disminuye la tensión superficial permitiendo el mejor contacto entre la solución acuosa y la superficie del material

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

inmerso en ella (Pierik, 1990). Posteriormente, las semillas se lavaron varias veces con agua destilada para eliminar los posibles restos de Tween 80.

Con el fin de reducir al máximo las posibilidades de contaminación, las semillas se sumergieron en una solución fúngica compuesta por 0.5ml/l de Pelt (metil-tiofanato 45% p/v) y 1.0ml/l de Previcur (propamocab 60,5% p/v), ambos de la marca Bayer, durante 1 hora en continua agitación y al vacío. Para la esterilización química, las semillas se introdujeron en una solución de etanol al 70% durante 5 segundos y a continuación en un eppendorf con agua destilada. El lavado con etanol precede al tratamiento con el agente esterilizante, para mejorar el contacto de este con la superficie de los tejidos, ya que el etanol elimina ceras y resinas hidrofóbicas que protegen a los microorganismos del contacto con los esterilizantes acuosos. El tiempo de exposición del material vegetal al etanol depende del tipo de material, ya que éste puede ser muy tóxico (Bonga & Von Aderkas, 1992). Lo más frecuente es mantener el material vegetal sumergido durante 5-30 segundos en etanol al 70-75%, porque el etanol al 96% que se emplea en la esterilización de la zona e instrumentos de trabajo, puede producir una excesiva deshidratación del material vegetal (Pierik, 1997).



Figura 4.3.- a) Desecador conectado a una bomba de vacío, y agitador (Labnet. SHAKER40) utilizada en nuestro laboratorio durante la fase de esterilización de las semillas de *Nepeta teydea*.

A pesar de la potente acción fitotóxica que tiene el etanol, con este paso no se elimina todos los microorganismos, por ello, para asegurar una completa esterilización del material vegetal, tras este paso por el etanol, las semillas deben ser sometidas a un tratamiento con un agente esterilizante (Bonga & Von Aderka, 1992).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

A una porción de las semillas se les sometió (previa a la acción de los diversos desinfectantes) a un tratamiento con ácido sulfúrico al 5% durante 5 minutos. Se trata de una escarificación ácida, en donde normalmente, se sumergen las semillas en ácidos fuertes durante periodos cortos, y se consigue la eliminación total o parcial de las cubiertas seminales, que pueden estar impidiendo el proceso de germinación. Tras este tratamiento con ácido es necesario lavar las semillas con agua varias veces, para eliminar los restos de ácido.

Los agentes esterilizantes más comunes, son el hipoclorito cálcico y el hipoclorito sódico, aunque existen otros más efectivos, como cloruro de mercurio, sin embargo, su utilización se ve relegada a casos excepcionales debido a su peligrosidad y alto grado de contaminación ambiental. Para este trabajo se empleó hipoclorito sódico (NaClO) al 20%, hipoclorito cálcico (Ca(ClO)₂) al 3% y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 15%. Se colocaron las semillas en un eppendorf estéril, al que se le añadió el agente esterilizante y unas gotas de Tween 80. En todos los tratamientos las semillas permanecieron sumergidas en el agente esterilizante durante 10 minutos en continua agitación y bajo condiciones de vacío. Los microorganismos superficiales del material vegetal pueden alojarse en lugares en los que quedan protegidos por burbujas de aire, de manera que nunca estarán en contacto con el agente esterilizante. La aplicación de vacío (los eppendorf con las semillas se introdujeron en un desecador al que se le conectó una bomba de vacío) unida a una agitación vigorosa puede ayudar a eliminar esas burbujas de aire, permitiendo el acceso del agente esterilizante a todas las zonas de difícil acceso del material vegetal.

Tras la esterilización, se procedió al lavado de las semillas con el fin de eliminar totalmente los restos del agente esterilizante. Para ello se llevaron a cabo cuatro lavados con agua destilada estéril, el primero de ellos rápido (1 minuto) y los otros tres lavados sucesivos más largos (10 minutos cada uno de ellos, con agitación continua). Es importante realizar estos lavados, ya que los restos del agente esterilizante (como es el caso del hipoclorito cálcico) no sólo son tóxicos para los tejidos, sino que puede interferir en el metabolismo de los aminoácidos (Bonga & Durzan, 1982), y también pueden destruir componentes esenciales de los medios de cultivo, por ejemplo, la tiamina (Bonga & Von Aderkas, 1992).

En este momento el material vegetal quedó totalmente esterilizado para su siembra *in vitro*.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS SUPERIORES

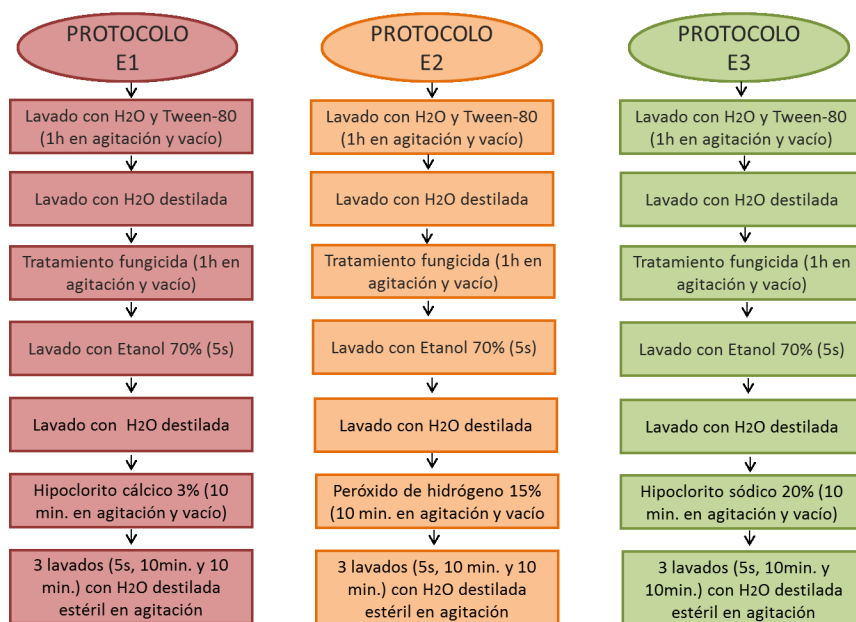


Figura 4.4.- Esquema de los protocolos de esterilización empleados en los ensayos de la fase de germinación *in vitro* de *Nepeta teydea*, sin la aplicación de la escarificación química de las semillas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

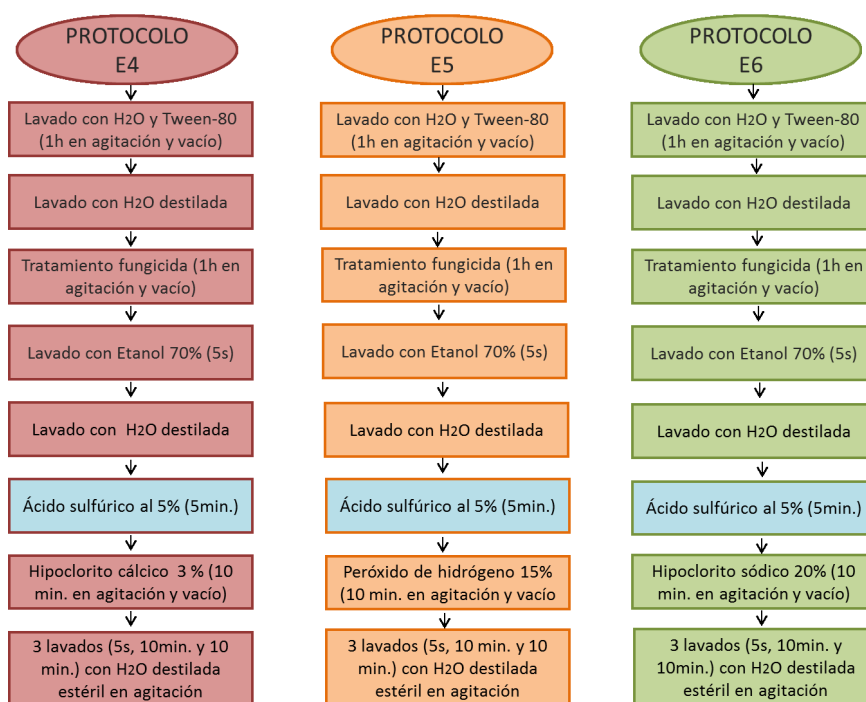


Figura 4.5.- Esquema del protocolo de esterilización empleado en los ensayos de la fase de germinación *in vitro* de *Nepeta teydea*, con la aplicación de la escarificación química de las semillas.

IV.2.1.1.2.2. ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL DE LABORATORIO

Todo el material e instrumental de laboratorio utilizado para las siembras de las semillas fueron esterilizados en una autoclave vertical Selecta Autotester (Mod. 437-G). Este aparato esteriliza por medio de calor húmedo que es proporcionado por vapor de agua a presión (Bonga & Von Aderkas, 1992; Colling & Edwards, 1998), y de eficacia de la esterilización depende del tiempo, la presión, la temperatura y del objeto que se va a esterilizar (Pierik, 1990). Los materiales e instrumental de laboratorio necesario para la siembra de las semillas (pinzas, placas de Petri, papel de filtro, recipientes de vidrio vacíos, agua destilada, eppendorf, puntas de micropipetas, etc.) fueron esterilizados a 121°C de temperatura y 1 atm de presión durante al menos 20 minutos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 965383		Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14	
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58	
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47	
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34	



Figura 4.6.- Autoclave vertical Selecta Autotester (Mod. 437-G) utilizado en nuestro laboratorio para la esterilización del instrumental de laboratorio, agua destilada, y medios de cultivo.

Algunas sustancias utilizadas en esta fase de germinación son termolábiles, por lo tanto, no pueden ser autoclavados. En estos casos se realizó una esterilización por filtración, donde las soluciones, pasan a través de un filtro de membrana, en el que queda retenida todas las partículas, microorganismos y virus que son mayores que el correspondiente poro del filtro. La mayor ventaja de este procedimiento es que las soluciones, atraviesan el filtro sin sufrir ninguna modificación. Sin embargo, este proceso de esterilización puede tener algunas desventajas como puede ser la adsorción de sustancias en el filtro, algunos virus pueden atravesar el filtro y además este procedimiento consume más tiempo y no están sencillo como el autoclave (Pierik, 1997). A pesar de todo esto, es el mejor sistema para esterilizar sustancias termolábiles como por ejemplo el ácido giberélico. Este regular de crecimiento es inestable al calor, perdiendo el 90% de su actividad durante su esterilización en una autoclave (Van Bragt et al., 1971, citado por Pierik, 1997). La esterilización del GA₃ por filtración se llevó a cabo introduciendo la solución de GA₃ en una jeringuilla hipodérmica previamente esterilizada con etanol 96% a la que se le incorporó un filtro de membrana Milipore con un diámetro de poro de 0,45 µm.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

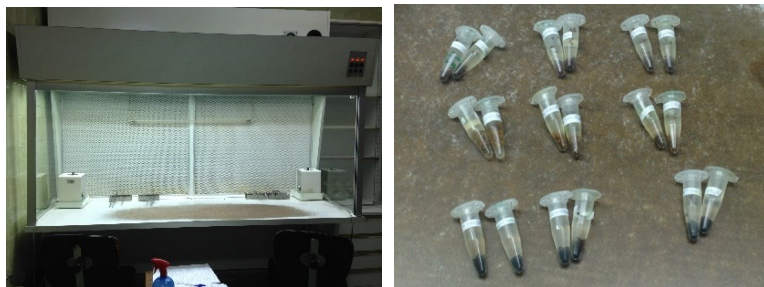


Figura 4.7.- a) Cámara de flujo laminar en el que se realizó todas la esterilización y siembra de semillas de *Nepeta teydea*; b) Foto de las semillas de *Nepeta teydea* durante los tres protocolos de esterilización ensayados en el laboratorio.

IV.2.1.1.2.3. ENSAYOS DE GERMINACIÓN

Los experimentos de germinación fueron llevados a cabo inmediatamente terminado el proceso de esterilización de las semillas, excepto aquellos ensayos en los que las semillas se sometieron a un tratamiento ácido, que realizó durante el protocolo de esterilización (previo a la imbibición).

Se llevó a cabo 3 réplicas de 90 semillas, y la duración de estos ensayos fue de 30 días. Se consideraron germinadas aquellas semillas que habían originado una radícula de al menos 0.75mm de longitud, efectuándose semanalmente el recuento y la retirada de las semillas germinadas.

Para evaluar la dormición, se llevaron a cabo experimentos de germinación bajo condiciones controladas de temperatura, humedad relativa e iluminación. Así, las muestras del ensayo A y B fueron imbibidas en agua destilada durante 24 horas en condiciones de oscuridad. Las muestras del ensayo C y D fueron imbibidas en una solución de GA₃ 3mg/l durante 24 horas en condiciones de oscuridad, y las muestras del ensayo E y F fueron imbibidas en una solución de GA₃ 5 mg/l durante 24 horas en condiciones de oscuridad. Pasados este periodo de tiempo, las semillas que fueron imbibidas con GA₃ fueron lavadas con agua destilada estéril.

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Figura 4.8.- a) La fitohormona, ácido giberélico, de la casa comercial Sigma, utilizada durante la fase de germinación de las semillas de *Nepeta teydea*; b) Esterilización de las dos soluciones de ácido giberelico con una jeringuilla esterilizada con el filtro de membrana Milipore acoplado, para la esterilización del ácido giberélico.

Los experimentos de escarificado químico, se realizaron durante el protocolo de esterilización, sumergiendo las semillas en una solución de ácido sulfúrico al 5% durante 5 minutos, y luego, estas semillas fueron lavadas con agua destilada. Posteriormente, tras el proceso de esterilización, se realizó los ensayos de imbibición, de tal forma que, las muestras del ensayo G y H fueron imbibidas en agua destilada durante 24 horas en condiciones de oscuridad. Las muestras del ensayo I y J fueron imbibidas en una solución de GA₃ 3mg/l durante 24 horas en condiciones de oscuridad, y las muestras del ensayo K y L fueron imbibidas en una solución de GA₃ 5mg/l durante 24 horas en condiciones de oscuridad. Pasados este periodo de tiempo, las semillas que fueron imbibidas con GA₃ fueron lavadas con agua destilada estéril.

Tabla 4.1.- Los diferentes tratamientos de germinación llevados a cabo con las semillas de *Nepeta teydea* sin escarificación química.

Nombre del Ensayo	Condiciones de imbibición	Condiciones de incubación
Ensayo A	H ₂ O, 24h en oscuridad	Luz blanca
Ensayo B	H ₂ O, 24h en oscuridad	Oscuridad
Ensayo C	GA ₃ 3mg/l, 24h en oscuridad	Luz blanca
Ensayo D	GA ₃ 3mg/l, 24h en oscuridad	Oscuridad
Ensayo E	GA ₃ 5mg/l, 24h en oscuridad	Luz blanca

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Ensayo F	GA ₃ 5mg/l, 24h en oscuridad	Oscuridad
-----------------	---	-----------

Tabla 4.2.- Los diferentes tratamientos de germinación llevados a cabo con las semillas de *Nepeta teydea* con escarificación química.

Nombre del Ensayo	Tratamiento de escarificación	Condiciones de imbibición	Condiciones de incubación
Ensayo G	H ₂ SO ₄ al 5%, 5min.	H ₂ O, 24h en oscuridad	Luz blanca
Ensayo H	H ₂ SO ₄ al 5%, 5min.	H ₂ O, 24h en oscuridad	Oscuridad
Ensayo I	H ₂ SO ₄ al 5%, 5min.	GA ₃ 3mg/l, 24h en oscuridad	Luz blanca
Ensayo J	H ₂ SO ₄ al 5%, 5min.	GA ₃ 3mg/l , 24h en oscuridad	Oscuridad
Ensayo K	H ₂ SO ₄ al 5%, 5min.	GA ₃ 5mg/l, 24h en oscuridad	Luz blanca
Ensayo L	H ₂ SO ₄ al 5%, 5min.	GA ₃ 5mg/l , 24h en oscuridad	Oscuridad

IV.2.1.1.2.4. SIEMBRA

La siembra de las semillas se llevó a cabo en la cabina de flujo laminar frontal (Modelo ADS LAMINAIRE). En estas cabinas el aire se toma del exterior y se hace pasar a través de un filtro de poro muy fino, antes de que llegue a la mesa de la cámara de inoculación. Este sistema de filtrado asegura que el flujo de aire sobre la mesa sea completamente estéril. Para la esterilización del instrumental de laboratorio (pinzas) se empleó un esterilizador eléctrico, que contiene perlas a 250°C de temperatura, y en donde se introducen los útiles de trabajo.

Las semillas de *Nepeta teydea* se colocaron en placas de Petri de 88.5 cm de diámetro, sobre doble papel de filtro humedecido a saturación con agua destilada estéril. El número de semillas sembrada por placas fue de 15 semillas, con un total de 30 semillas por tratamiento.

Las placas se etiquetaron debidamente y en el caso de los ensayos que iban a realizarse en condiciones de oscuridad, las placas fueron forradas con papel de aluminio.



Figura 4.9.- a) Cabina de flujo laminar frontal Modelo ADS LAMINAIRE, y los utensilios utilizados durante esta etapa; b) Placas de Petri que contienen las semillas *Nepeta teydea* esterilizadas para incubar en condiciones de fotoperiodo; c) Placas de Petri que contienen las semillas *Nepeta teydea* esterilizadas para incubar en condiciones de oscuridad y en condiciones de fotoperiodo.

IV.2.1.1.2.5. CONDICIONES DE INCUBACIÓN DE LAS SEMILLAS

Resulta necesario, tanto para la investigación como para la aplicación práctica del cultivo *in vitro*, el disponer de una cámara de crecimiento de cultivo, en el que se controla la luz, temperatura y humedad. La cámara debe de estar aislada, de manera que no se vea afectada por los cambios externos a ella. La iluminación es suministrada generalmente por tubos fluorescentes.

- Temperatura. En nuestro caso se ha mantenido una temperatura constante de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ de la cámara de cultivo.
- Humedad. Teniendo en cuenta que la humedad en los tubos de ensayo es relativamente alta (como se desprende de las condensaciones en las paredes), y que una elevada humedad de la cámara puede producir como resultado una mayor cantidad de infecciones, en nuestro caso, una humedad relativa del 50%, permitió mantener las necesidades de humedad del material vegetal, sin incrementar el nivel de contaminación.
- Luz. Se trata de un factor muy importante. Aquí es necesario tener en cuenta tres factores que incluyen la duración del día, la irradiancia y la composición espectral. En nuestro caso, las placas que contenían las semillas permanecieron en la cámara de incubación bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, con una

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

irradiancia relativamente baja, del orden de $110\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Se emplearon tubos fluorescentes blancos (Philips TLD, 58W/84), que producen menos calor.

Tabla 4.3.- Condiciones de cultivo en la cámara de incubación durante la fase de germinación de semillas de *Nepeta teydea*.

TEMPERATURA	→	24°C±2
FOTOPERÍODO	→	16 horas de luz y 8 de oscuridad
IRRADIANCIA	→	110µE-M-2S-1
LÁMPARAS	→	tubos florescentes blancos (Philips TLD, 58/84).
HUMEDAD RELATIVA	→	50%

Para evaluar la influencia de la luz en la fase de germinación, todos los ensayos comentados anteriormente fueron mantenidos en una cámara de incubación, de manera que, una parte de cada ensayo se sometieron a condiciones de oscuridad, y otra parte a las condiciones de iluminación, comentadas en el párrafo anterior.

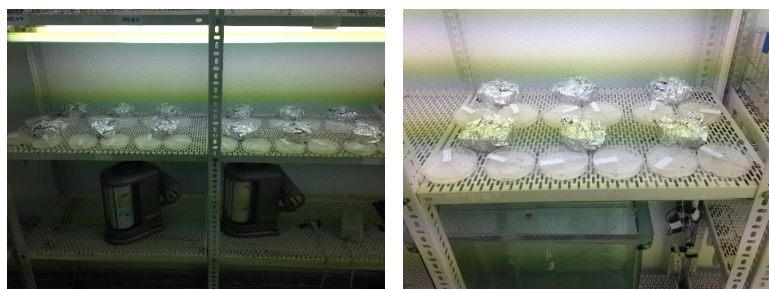


Figura 4.10.- Cámara de incubación con las placas de semillas de *Nepeta teydea* esterilizadas (en condiciones de fotoperiodo u oscuridad total).

IV.2.1.2. FASE DE ESTABLECIMIENTO

IV.2.1.2.1. MATERIALES

Todos los ensayos se llevaron a cabo a partir de plántulas de *Nepeta teydea* de dos semanas de edad, obtenidas de la anterior fase de germinación, y como éste material proviene de unas condiciones de *in vitro*, no es necesario someterlo a un proceso de esterilización.



Figura 4.11.- Plántulas de *Nepeta teydea* de 14 días de edad, obtenidas de la fase de germinación.

IV.2.1.2.2. METODOLOGÍA

IV.2.1.2.2.1. ESTERILIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y MATERIAL DE LABORATORIO

Todo el material e instrumental de laboratorio y los medios de cultivos utilizados durante la fase de establecimiento se esterilizaron en una autoclave Selecta Autotester (Mod. 437-G). Los medios nutritivos fueron autoclavado a 1 atm de presión durante al menos 20 minutos, mientras que los útiles de trabajo y otros materiales necesarios para la siembra, se esterilizaron de forma separada, a 121°C y 1'5 atm de presión durante unos 20 minutos. Hay que tener en cuenta que la penetración del calor es muy importante en un autoclave, y que los volúmenes grandes deben ser esterilizados, en principio, durante períodos de tiempo más largos, ya que el calor tarda más tiempo en llegar que en los volúmenes pequeños (Pierik, 1997).

IV.2.1.2.2.2. MEDIO DE CULTIVO

IV.2.1.2.2.2.1. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

El medio nutritivo es un factor importante en el *cultivo in vitro* de células y tejidos (Bonga & Von Aderkas, 1992). Muchos componentes del medio se encargan de proporcionar energía o sirve de base para la formación de otras moléculas esenciales de las células vegetales, es decir, tienen principalmente función nutricional. Sin embargo, algunos componentes tienen funciones que no son nutricionales y a veces son de naturaleza más física que química. Así un medio de cultivo debe de contar con las sales minerales, estar suplementado por una fuente de carbono, vitaminas, un aporte hormonal y un agente gelificante que le permita dar consistencia al medio (Pierik, 1990).

Existen numerosas formulaciones salinas para el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Entre ellos cabe destacar la formulación MS (Murashige & Skoog, 1962), que es el más empleado en la actualidad, y que se caracteriza por tener un contenido muy alto de nitrógeno y de potasio. Otros medios de cultivo muy utilizados son el medio de Schenk & Hildebrandtv (1972) (medio SH) o también, el medio WPM, desarrollado por Lloyd & McCown (1981) para el cultivo de plantas leñosas (Pérez-Francés, 2006). La elección de una de las distintas soluciones nutritivas depende de la planta con la que se trabaja y de la etapa de micropropagación.

En nuestro caso, se empleó para la fase de establecimiento de *Nepeta teydea*, el medio de cultivo formulado por Murashige & Skoog en 1962 (medio MS), porque la mayor parte de las plantas reaccionan en él de forma positiva (Pierik, 1990). En nuestros ensayos, se utilizó el medio MS con las concentraciones completas de macronutrientes y micronutrientes y, por otro lado, se empleó el medio MS con una reducción a la mitad de sus macronutriente, micronutrientes, vitaminas y aminoácidos, ya que para este tipo de planta que vive en suelos pobres en sal, el alto contenido en sales de este medio puede provocar problemas de toxicidad.

Tabla 4.4.- Composición de los macronutrientes del medio Murashige & Skoog (1962) completo (MS) y a la mitad de su concentración (½ MS) para *Nepeta teydea*. Todas las cantidades están expresadas en mg/l.

MACRONUTRIENTES	Medio MS	Medio ½ MS
NH ₄ NO ₃	1650.0	825.0
KNO ₃	1900.0	950.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	125.0	62.5
KH ₂ PO ₄	170.0	85.0
Cl ₂ Ca.2H ₂ O	440.0	220.0

Tabla 4.5.- Composición de los micronutrientes del medio Murashige & Skoog (1962) completo (MS) y a la mitad de su concentración (½ MS) para *Nepeta teydea*. Todas las cantidades están expresadas en mg/l. Todas las cantidades están expresadas en mg/l.

MICRONUTRIENTES	Medio MS	Medio ½ MS
H ₃ BO ₃	6.20	3.10
Mn ₂ SO ₄ .4H ₂ O	22.30	11.15

CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS SUPERIORES

IK	0.83	0.415
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0.25	0.125
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025	0.0125
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025	0.0125
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.60	4.30

Tabla 4.6.- Composición de vitaminas y aminoácidos del medio Murashige & Skoog (1962) completo (MS) y a la mitad de su concentración (½ MS) para *Nepeta teydea*. Todas las cantidades están expresadas en mg/l.

VITANIMAS Y AMINOÁCIDOS	Medio MS	Medio ½ MS
Glicina	2.0	1.0
Meso-inositol	100.0	50.0
Tiamina-HCl	0.1	0.05
Piridoxina-HCl	0.5	0.25
Ac. Nicotínico	0.5	0.25
Meso-inositol	100.0	50.0

Normalmente, tanto los macronutrientes como los micronutrientes y las vitaminas se preparan en soluciones concentradas o también llamadas “soluciones madres”. Se utilizan cinco soluciones concentradas: la solución de macronutrientes I, la solución de macronutrientes II, la solución de micronutrientes I, la solución de micronutrientes II y la solución de vitaminas y aminoácidos, que se almacenan por separado en la nevera a 4°C. La composición y concentraciones de cada una de estas soluciones se muestran en la tabla 4.7.

Tabla 4.7.- Composición de las soluciones madre de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y aminoácidos del medio Murashige & Skoog (1962).

Solución de Macronutrientes I (100ml/l)	mg/l
NH ₄ NO ₃	16.50
KNO ₃	19.00
MgSO ₄ .7H ₂ O	3.70
KH ₂ PO ₄	1.70
Solución de Macronutrientes II (100/l)	mg/l

77

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 27/06/2017 09:46:14

JUAN IGNACIO FRIAS VIERA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 19:33:58

FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

29/06/2017 09:05:47

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

18/07/2017 14:28:34

CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS SUPERIORES

Cl ₂ Ca.2H ₂ O	4.40
Solución de Micronutrientes I (10ml/l)	mg/l
H ₃ BO ₃	620.0
MnSO ₄ .4H ₂ O	230.0
IK	83.0
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	25.0
CuSO ₄ . 5H ₂ O	2.5
CoCl ₂ . 6H ₂ O	2.5
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	860.0
Solución de Micronutrientes II (10ml/l)	mg/l
FeSO ₄ . 7H ₂ O	1.390.0
Na ₂ EDTA	1.865.0
Solución de vitaminas y aminoácidos (10ml/l)	mg/l
Glicina	100.0
Tiamina-HCl	5.0
Piridoxina-HCl	25.0
Ac. Nicotínico	25.0

Estas soluciones pueden ser sustituidas por diversos preparados que se comercializan y que contienen la mezcla de sales y vitaminas en forma pulverulenta. En nuestro caso se emplearon las sales y vitaminas de la casa comercial Sigma (Murashige and Skoog Basal Medium. M5519-50L), siendo necesario a la hora de preparar los medios 4.4g/l (para el medio MS con las vitaminas, aminoácidos, macro- y micronutrientes a la concentración completa (MS)) y 2.2 g/l (para el medio MS con las vitaminas, aminoácidos, macro- y micronutrientes a la mitad de la concentración (½ MS)) de esta mezcla para conseguir las concentraciones adecuadas de sales en los dos medios de cultivo ensayados.

Se empleó en todos los medios de cultivo como fuente de carbono, la sacarosa al 3%. Esto se debe a que las vitroplantas presentan una insuficiente actividad fotosintética, que las convierte en heterótrofas con respecto al carbono. Por ello, los azúcares son un componente esencial del medio de cultivo.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Figura 4.12.- a) Balanza digital (Satorius AG Göttingen, Germany. CP67); b) Compuestos químicos necesarios para la preparación de los medios de cultivo que utilizamos en nuestros ensayos.

Todos los medios utilizados en esta fase fueron medios sólidos, por lo que se hizo necesario utilizar un agente gelificante, el agar. Se trata de un polisacárido de elevada masa molecular procedente de algas, que normalmente se emplea a concentraciones de 0.6 a 0.8%. Si se utiliza concentraciones más bajas, el medio permanece semilíquido, y si la concentración es muy alta, el medio queda muy sólido, dificultando la inoculación y nutrición del material vegetal (Pierik, 1990). Por ello, en nuestro trabajo la concentración de agar empleada fue de 0.7%.



Figura 4.13.- Rotor magnético (P SELECTA AGIMATIC. Watt:400. Volt: 220) y restos de material de laboratorio, utilizado durante la preparación de los diferentes medios de cultivos empleados en nuestros ensayos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

El valor del pH del medio de cultivo es uno de los factores a tener en cuenta debido a que, valores bajos de pH (inferiores a 4) o muy altos (superiores a 8) impiden la solidificación del medio, y el agar puede hidrolizarse, produciendo un exceso de carbohidratos que puede impedir el crecimiento del tejido. Además, a pH muy bajos, puede precipitar algunas sales minerales, y algunos reguladores de crecimiento (como las auxinas y giberelinas) y vitaminas presentan menor estabilidad (Pérez-Francés, 2006).

En general se trabaja a pH entre 5.2 y 5.8 para el medio MS. En nuestro caso, todos los medios se ajustaron a un pH de 5.8, y para ello, se utilizaron soluciones diluidas de NaOH y HCl.

IV.2.1.2.2.3. SIEMBRA

La siembra del material vegetal *in vitro* se llevó a cabo en la cabina de flujo laminar frontal (Modelo ADS LAMINAIRE), y para la esterilización del instrumental se emplea un esterilizador eléctrico con perlas a 250°C de temperatura.

El material vegetal utilizado para esta fase, fue plántulas obtenidas de la fase de germinación *in vitro* de las semillas de *Nepeta teydea* (con raíz), y que fueron inoculadas en los tubos de ensayos que contenían los dos medios de cultivos de establecimiento: medio MS completo (MS) (Medio 1), y medio MS a la mitad de su concentración (½ MS) (Medio 2).



Figura 4.14.- Tubos con 10 ml del medio de cultivo, en el que se inocula las plántulas de *Nepeta teydea* obtenidas de la fase de germinación.

IV.2.1.2.2.4. CONDICIONES DE INCUBACIÓN DE LOS CULTIVOS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Las condiciones de incubación de los cultivos en la fase de establecimiento, han sido las mismas que las condiciones de temperatura, humedad, y luz que la incubación de las semillas durante la fase de germinación.

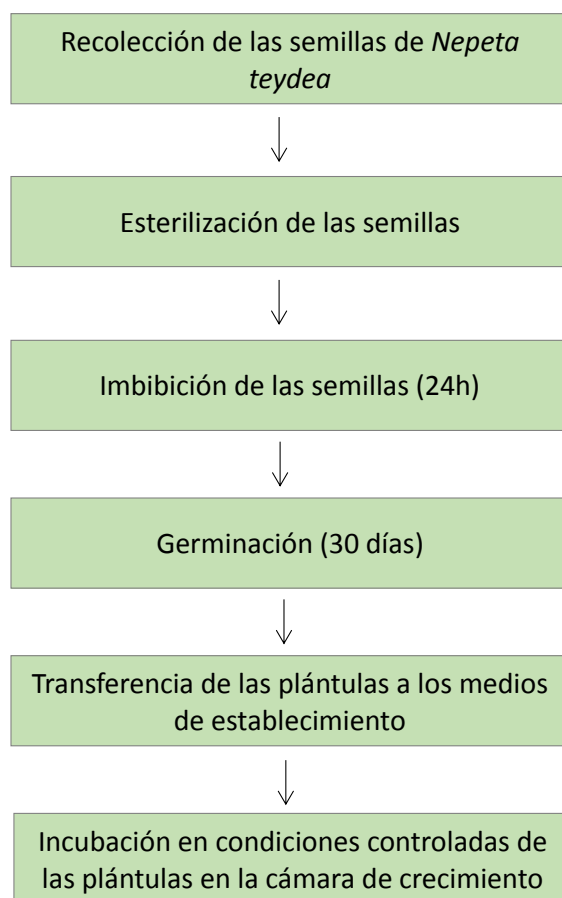


Figura 4.15.- Esquema general de la fase de establecimiento *in vitro* de *Nepeta teydea*.

IV.2.1.3. FASE DE MULTIPLICACIÓN

El objetivo principal de la fase de multiplicación es conseguir la propagación del material vegetal sin perder la estabilidad genética (Pierik, 1990), y obtener el mayor número de nuevas yemas axilares en el menor tiempo posible. Para ello, es esencial el control de la tasa de multiplicación del cultivo (Pérez-Francés, 2006).

Dependiendo del tipo de explante y de la especie en cultivo, podemos llevar a cabo diferentes procedimientos de multiplicación de las yemas axilares durante esta fase (Pérez-Francés, 2006).

IV.2.1.3.1. MATERIAL

Todos los ensayos se realizaron con material vegetal de *Nepeta teydea* obtenido durante la fase de establecimiento en medio de cultivo ½ MS sin reguladores de crecimiento. Después de cuatro semanas de cultivo, se seleccionaron aquellas plantas de mayor tamaño y que presentaban un buen desarrollo.

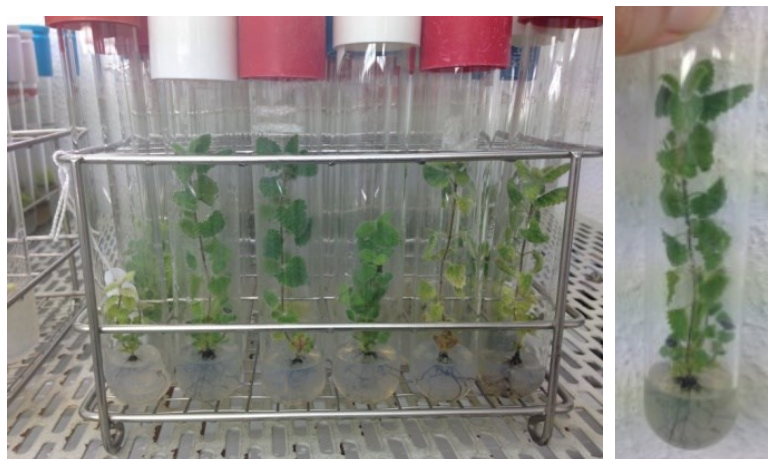


Figura 4.16.- Selección de las plántulas de *Nepeta teydea* obtenidas de la fase de establecimiento a los 30 días de crecimiento, para iniciar la fase de multiplicación.

IV.2.1.3.2. METODOLOGÍA

El método de propagación llevado a cabo en este trabajo, es el cultivo mediante segmentos nodales. Este método consiste en el aislamiento de una yema, junto con una porción de tallo, para obtener un vástago a partir de la yema. Este es el método más natural de propagación vegetativa de las plantas *in vitro*, ya que también puede aplicarse *in vivo*. Cada una de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas, idénticas a la del ápice del tallo, pueden ser aisladas sobre un medio nutritivo, intentándose así su desarrollo *in vitro*, realizándose los repicados cuando sea necesarios. Cuando se obtiene un número suficientemente grande de vástagos, éstos son enraizados y finalmente se realiza la transferencia al suelo. El aislamiento de yemas y ápices del

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

vástago, es una técnica, donde en principio no se añaden citoquininas para evitar la dominancia apical (Pierik, 1990).

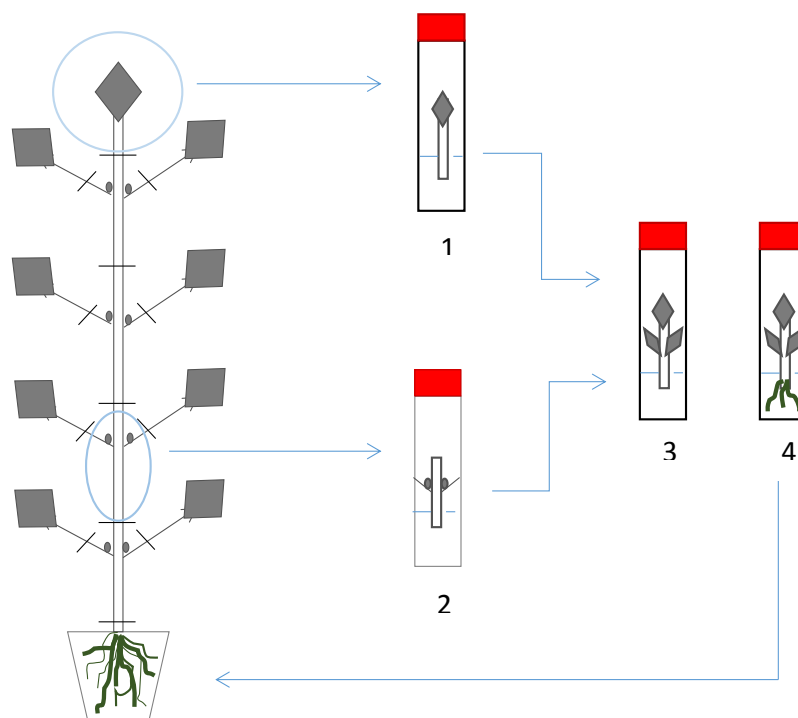


Figura 4.17.- Esquema de la fase de multiplicación de un protocolo de micropropagación por segmentos nodales. Existen nudos vestigiales en las axilas de las hojas, y después de su aislamiento (1,2), se origina un vástago (3), que en la última etapa (4) ha regenerado ya sus raíces (modificado de ir al Pierik,1990.)

Las plántulas obtenidas *in vitro* durante la fase de establecimiento (con un tamaño superior a 2cm) se escindieron en segmentos uninodales (un único nudo por segmento, con 2 yemas) de 1cm de longitud aproximadamente y se sembraron en 6 medios de cultivo MS sólido de composición hormonal diferente, denominados M1 (medio ½ MS sin reguladores de crecimiento), M2, M3, M4 (medios ½ MS al que se añade una hormona: 0.1, 0.2 y 0.5mg/l BA, respectivamente), M5 y M6 (medio ½ MS al que se le añade dos hormonas: 0.1 mg/l BA junto con 0.1mg/l ANA, y 0.2mg/l BA combinado con 0.2mg/l ANA, respectivamente).

Tabla 4.8.- Composición hormonal de los 6 medios de cultivos utilizados durante la fase de multiplicación de *Nepeta teydea*.

MEDIO	BA (mg/l)	ANA (mg/l)
M1	0	0
M2	0.1	0
M3	0.2	0
M4	0.5	0
M5	0.1	0.1
M6	0.2	0.2

Para cada medio inicial de multiplicación, se sembraron 24 tubos, realizándose 3 repeticiones. Dichos cultivos se mantuvieron bajo las condiciones de incubación ya descritas en el apartado anterior, y los subcultivos se realizaron cada 30 días.



Figura 4.18.- a) Cámara de flujo laminar durante la siembra de explantos uninodales de *Nepeta teydea* para iniciar la fase de multiplicación; b) Explantos apicales de *Nepeta teydea* sembrados en medio de multiplicación; c) Explantos basales de *Nepeta teydea* sembrados en medio de multiplicación.

Durante la fase de multiplicación, al final de cada subcultivo (cada 30 días), se tomaron y evaluaron los datos de los siguientes parámetros: la presencia de raíz, la presencia de callo, porcentaje de supervivencia, porcentaje de contaminación, porcentaje de hiperhibrididad, la longitud máxima del vástago desarrollado a partir del explanto uninodal (Long) y el número de nuevas yemas formadas (nº yemas).

El parámetro objeto de estudio fue la tasa de multiplicación (TM). Esta se define como el número de yemas viables producidas a partir de cada yema en cada subcultivo. Por lo tanto, para el cálculo de la tasa de multiplicación en un subcultivo determinado, contabilizaremos el número de explantes sembrados al inicio del subcultivo a evaluar y el número de yemas que estos explantes han producido al final, y

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

que pueden ser capaces de multiplicarse posteriormente. No se contarán las yemas que se producen y sufren necrosis antes del siguiente subcultivo (Pérez-Francés, 2006).

IV.2.1.4. FASE DE ENRAIZAMIENTO

Esta fase tiene como objetivo obtener plantas completas con un buen desarrollo del sistema radicular a partir de las yemas desarrolladas en condiciones *in vitro*, y así, facilitar su posterior proceso de adaptación y aclimatación en condiciones *ex vitro*.

IV.2.1.4.1. MATERIAL

En nuestro caso, esta fase no fue necesaria llevarla a cabo, ya que esta especie vegetal, comienza a desarrollar su sistema radicular de manera espontánea desde las primeras fases del cultivo *in vitro* en medio MS carente de reguladores de crecimiento. Sin embargo, se realizó un ensayo en el que se utilizó explantos apicales y basales, de plantas procedentes de la fase de establecimiento crecidas en medio ½ MS sólido carente de reguladores hormonales, para analizar si existen diferencias en la etapa de enraizamiento, entre las plantas procedentes de explantos apicales y las plantas que provienen de explantos basales.

IV.2.1.4.2. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo este ensayo de enraizamiento, se procedió a la siembra de explantos apicales y basales comentados anteriormente, en medio de cultivo ½ MS sólido y sin reguladores hormonales.

Las condiciones de incubación fueron las mismas que las comentadas en las anteriores fases del protocolo de micropropagación vegetal.

La duración del ensayo fue de 30 días, y semanalmente se observó bajo la lupa la presencia o ausencia de raíces en cada uno de los explantos sembrados. La longitud máxima de la parte aérea, la longitud máxima de las raíces, el número de nudos y el número de raíces, fueron los cuatros parámetros evaluados en esta fase.

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

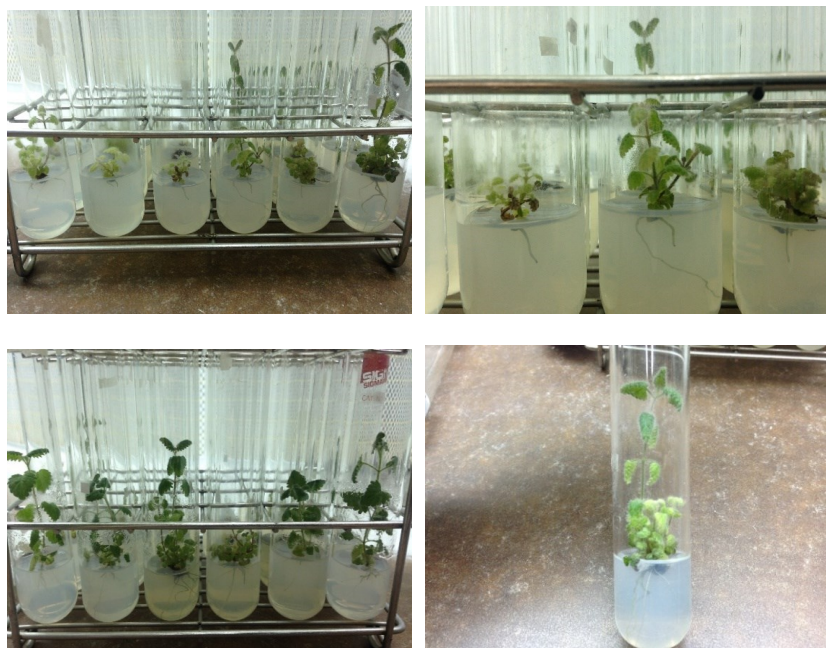


Figura 4.19.- a) Gradilla con plántulas de *Nepeta teydea* (procedentes de explantos basales) durante la fase de enraizamiento; b) Gradilla con plántulas de *Nepeta teydea* (procedentes de explantos apicales) durante la fase de enraizamiento

IV.2.1.5. FASE DE PASO A TIERRA Y ACLIMATACION

Esta fase, es el proceso que hace posible la transición de una planta en condiciones *in vitro* a condiciones de *in vivo* (Debergh, 1991), y constituye un paso crítico, del que depende el éxito o fracaso del protocolo de micropropagación (Pérez-Francés, 2006).

Durante esta etapa (Fig.4.23), las vitroplantas (desarrolladas en un ambiente óptimo para su crecimiento y con el mínimo estrés) irán adquiriendo las características anatómicas y fisiológicas necesarias para sobrevivir a las duras condiciones de campo.

IV.2.1.5.1. MATERIAL

Se seleccionaron plantas de *Nepeta teydea* enraizadas *in vitro* de 1 mes de edad, procedentes de explantos apicales y basales y crecidas en medio $\frac{1}{2}$ MS sin reguladores de crecimiento, que presentaban un buen desarrollo del sistema radicular y sin síntomas aparentes de contaminación (Fig. 4.20).

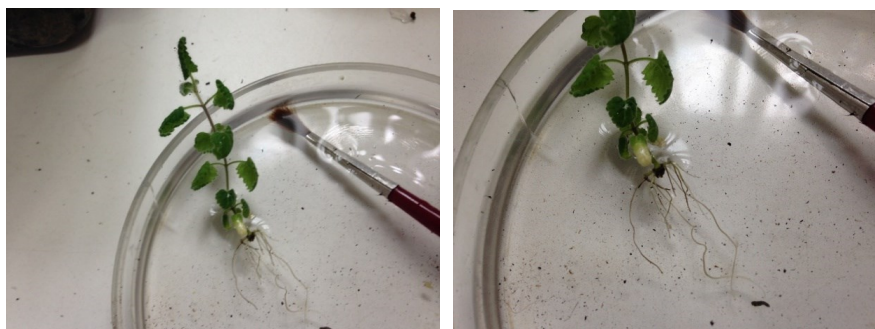


Figura 4.20.- a) Plantas *in vitro* de *Nepeta teydea* enraizadas, seleccionadas para el paso a tierra y aclimatación; b) Detalle del sistema radicular de *Nepeta teydea*.

IV.2.1.5.2. METODOLOGÍA

IV.2.1.5.2.1. METODOLOGÍA DE LA FASE PASO A TIERRA

El primer paso de este procedimiento, consiste en sacar con ayuda de una pinza desinfectada las vitroplantas de los tubos de ensayos que contienen medio de cultivo (Fig.4.21.1), y lavar cuidadosamente la base del tallo y las raíces cada una de las plantas con agua destilada estéril, para eliminar los posibles restos de agar (Fig. 4.21.2-3). Posteriormente, se sumergen la base del tallo y las raíces de las plántulas en una solución fungicida de Previcur (1ml/l) y de Pelt (0.5.ml/l) durante unos minutos (Fig. 4.21.3).



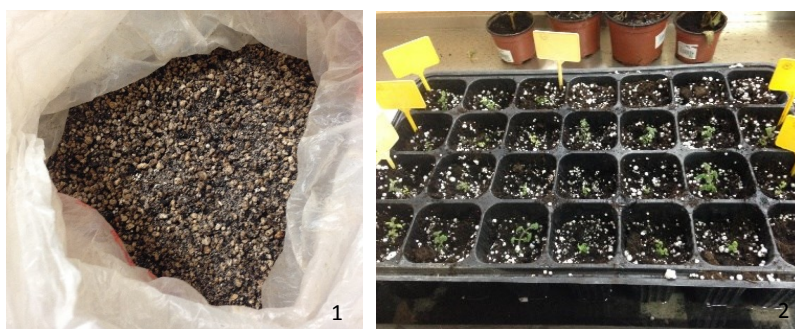
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Figura 4.21.- Pasos generales seguidos para el paso a tierra de *Nepeta teydea*. 1) Vitroplanta enraizada, seleccionada para la fase de paso a tierra; 2) Las vitroplantas se sacaron del tubo de ensayo y se colocaron en agua destilada templada. Con ayuda de un pincel se eliminaron los posibles restos de agar de sus raíces y base del tallo; 3) Plántulas en agua estéril, con las raíces limpias de cualquier resto de agar; 4) Plántulas sometidas al tratamiento fúngico.

Para la siembra de las plántulas, se empleó un tipo de sustrato previamente esterilizado en el autoclave, y que consistió en una mezcla de turba/perlita (2:1) (Fig. 4.22.1). La turba utilizada en nuestros ensayos es producida por Ostendorf Gärtnererden GmbH & Co. KG. Rudolf-Diesel-Straße 25.D-49377 Vechta. Procede de turberas altas de Alemania, poco y medianamente descompuestas (H4-H8), con todos los nutrientes necesarios para las plantas (100-300mg/l de nitrógeno (N) y fosfatos (P₂O₅), y 150-400mg/l de potasio (K₂O)), y un contenido en sales <1.5g/l.

Este sustrato se esterilizó en el autoclave y se colocó en bandejas de semilleros de 28 alveolos, que previamente fueron desinfectadas con hipoclorito sódico y detergente.



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 4.22.- 1) Sustrato esterilizado utilizado para el paso de tierra de *Nepeta teydea*, una mezcla de turba y perlita (2:1); 2) Plántulas de *Nepeta teydea* sembradas en sustrato esterilizado, dentro de una bandeja de semillero de 28 alveolos que utilizamos para el paso de tierra.

Posteriormente, se colocaron las bandejas de semilleros con las vitroplantas sembradas en ellas (Fig. 4.22.2), dentro de unas bandejas azules, que contenía agua destilada en el fondo.

IV.2.1.5.2.2. METODOLOGÍA DE LA FASE DE ACLIMATACIÓN

Los principales parámetros que se deben tener en cuenta durante esta etapa son la humedad relativa, la luminosidad y la temperatura.

Los ensayos realizados se basaron en la reducción de la humedad relativa. Para ello, las plantas transferidas al sustrato comentado anteriormente, permanecieron dentro de la cámara de cultivo, en las mismas condiciones de humedad relativa, luz y temperatura en las que se desarrollaron las plantas *in vitro*. Para ello, las bandejas se cubrieron con un plástico transparente (papel film) y se mantuvieron con agua destilada en el fondo (Fig. 4.24.1). Tras dos semanas en estas condiciones, el plástico fue cuidadosamente perforado diariamente hasta no observar condensación en su interior (Fig. 4.24.2), y se procedió a la eliminación de este plástico que cubría las bandejas (Fig. 4.24.3). Una semana después de quitarles el plástico (Fig. 4.24.4), las bandejas con plantas de *Nepeta* se sacaron de las condiciones controladas de la cámara de incubación (Fig. 4.24.5), y se mantuvieron dentro del laboratorio durante un período de 45 días (Fig. 4.24.6).

En cuanto a la fertilización, muchas especies vegetales crecen más vigorosamente si se abonan de forma regular después de trasplantar. Por ello, nosotros usamos una solución que contenía los macronutrientes, los micronutrientes, vitaminas y aminoácidos del medio MS al 50%.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS SUPERIORES

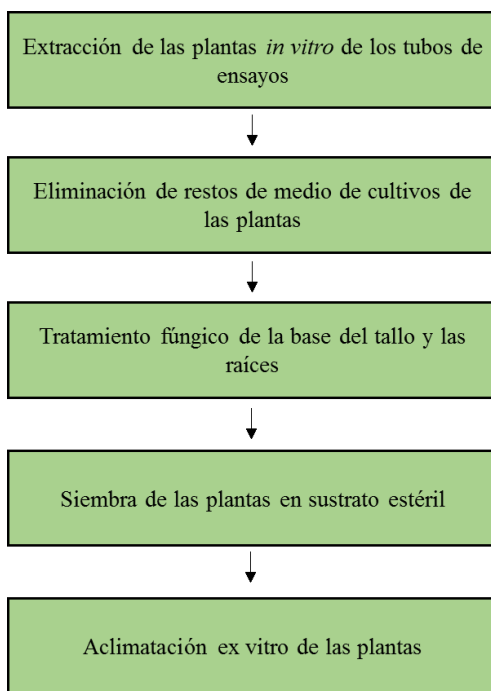
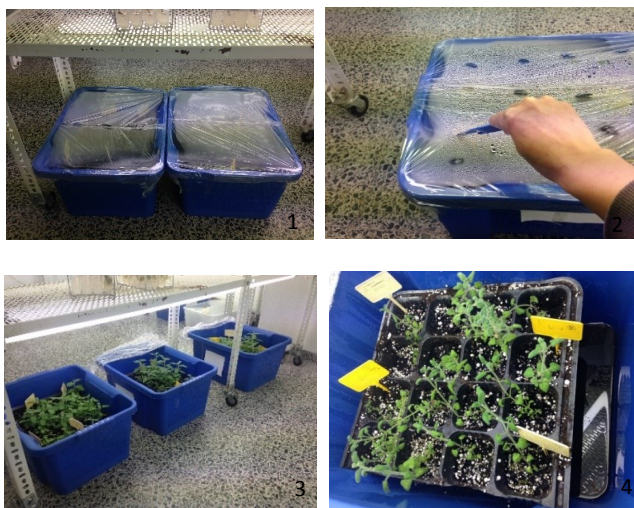


Figura 4.23.- Protocolo de paso a tierra y aclimatación de las plántulas de *Nepeta teydea* crecidas en condiciones *in vitro*.

Los parámetros que se analizaron durante el paso a tierra y la fase de aclimatación fueron el porcentaje de contaminación y el porcentaje de supervivencia de las plantas.



3

4

90

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Figura 4.24.- Pasos seguidos para llevar a cabo la fase de aclimatación de las vitroplantas. 1) Bandejas sembradas con *Nepeta teydea* cubiertas con plástico dentro de la cámara de incubación; 2) Bandejas sembradas con *Nepeta teydea* con plástico perforado dentro de la cámara de incubación; 3) Bandejas sembradas con *Nepeta teydea* con plástico perforado prácticamente eliminado, dentro de la cámara de incubación; 4) Bandejas sembradas con *Nepeta teydea* sin plásticos dentro de la cámara de incubación; 5) Bandejas con *Nepeta teydea* tras 7 días sin plástico dentro de la cámara de incubación; 6) Bandejas que contiene las de *Nepeta teydea* aclimatadas *ex vitro* dentro del laboratorio.

IV.2.2. MICROPROPAGACIÓN DE CALLOS DE *NEPETA TEYDEA*

IV.2.2.1. INDUCCIÓN DE CALLOS DE *NEPETA TEYDEA*

Esta etapa consiste en el inicio de la formación de un tejido tumoral (callo), y para ello, se recurre a la generación de heridas sobre cualquier tipo de órgano o tejido diferenciado vegetal (Pierik, 1990).

IV.2.2.1.1. MATERIAL

La inducción de un cultivo de callo se inicia con la selección de una porción de la planta, al que denominaremos explanto. En nuestro caso, hemos utilizado como material vegetal de partida, plántulas de *Nepeta teydea* obtenidas de la fase de multiplicación *in vitro*, y en concreto, usamos como explanto, tallos jóvenes (no suberizados) sin nudos de 0.5cm de longitud.

IV.2.2.1.2. METODOLOGÍA

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

El primer paso de la inducción de callos de *Nepeta teydea* consistió, en la inducción de heridas del material vegetal seleccionado para este proceso. Para ello, se procedió a la realización de varios cortes superficiales (con ayuda de un bisturí estéril), en los trozos de tallos jóvenes. Posteriormente, estos explantos se depositaron sobre la superficie del medio de cultivo en posición horizontal (Fig. 4.25).



Figura 4.25.- Explantos apicales de tallo de *Nepeta teydea*, sembrados horizontalmente en medio de inducción de callos

Para inducir la dediferenciación de los explantos, es decir, la formación de callo, normalmente se suministra reguladores de crecimiento exógenos al medio de cultivo. De manera que, algunos explantos sólo requieren la presencia de una auxina o de una citoquinina, mientras en otros casos, es necesaria la combinación de auxinas y citoquinina a la vez.

En nuestro trabajo, hemos empleado el medio de cultivo ½ MS sólido, suplementado con diferentes concentraciones de los siguientes reguladores de crecimiento: dos tipos de auxina, el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y el ANA (ácido naftalenacético); y una citoquinina, BA (benciladenina) (Fig. 4.26).



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 4.26.- Fitohormonas 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), ANA (ácido naftalenacético) y BA (bencilaminopurina), obtenidas de la casa comercial Sigma, utilizadas durante la fase de inducción de callos de *Nepeta teydea*, a partir de explantos de tallos de esta misma especie vegetal.

Estas hormonas se han empleado en los medios de inducción de callo, tanto de manera individualizada como de forma combinada (Tabla 4.9).

Tabla 4.9.- Tabla con la descripción de los diferentes medios de cultivo utilizados para la inducción de callos de *Nepeta teydea*.

Medios	2,4-D (mg/ml)	ANA (mg/ml)	BA (mg/ml)
M1	0.5	-	-
M2	1	-	-
M3	1.5	-	-
M4	2	-	-
M5	2.5	-	-
M6	-	0.5	-
M7	-	1	-
M8	-	1.5	-
M9	-	2	-
M10	-	2.5	-
M11	-	-	0.5
M12	-	-	1
M13	-	-	1.5
M14	-	-	2
M15	-	-	2.5
M16	0.5	-	0.5
M17	1	-	1
M18	1.5	-	1.5
M19	2	-	2
M20	2.5	-	2.5
M21	-	0.5	0.5
M22	-	1	1
M23	-	1.5	1.5
M24	-	2	2
M25	-	2.5	2.5

93

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 27/06/2017 09:46:14

JUAN IGNACIO FRIAS VIERA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 19:33:58

FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

29/06/2017 09:05:47

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

18/07/2017 14:28:34

Estos cultivos fueron mantenidos durante 30 días dentro de una cámara de incubación, con las mismas condiciones controladas de temperatura, humedad, que las comentadas durante todo el proceso de cultivo *in vitro* de las plantas de *Nepeta teydea*. En cuanto al parámetro de iluminación, los explantos sembrados en los diferentes medios de inducción de callos (25 medios de cultivo diferentes), fueron incubados bajo dos regímenes lumínicos diferentes: oscuridad total (Fig. 4.27.1) y fotoperiodo (16h de luz y 8h de oscuridad) (Fig. 4.27.2).



Figura 4.27.- 1) Inducción de callos de *Nepeta teydea* en condiciones de oscuridad dentro de la cámara de incubación; 2) Inducción de callos de *Nepeta teydea* en condiciones de fotoperiodo dentro de la cámara de incubación.

Veinte días después de la siembra de los explantos, aparecieron los primeros tejidos desdiferenciados (callos) (Fig. 4.28), con diferente coloración y distinta consistencia.

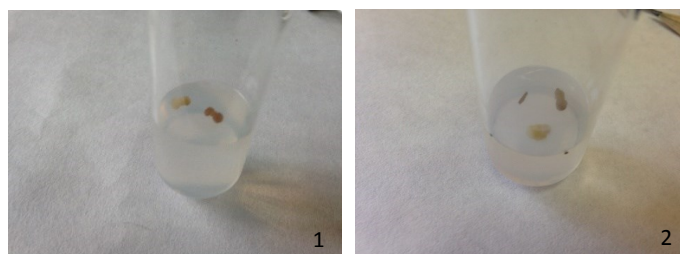


Figura 4.28.- 1) Aparición de tejido calloso en los extremos de los explantos de tallos jóvenes en medio de inducción de callos; 2) Tubo con medio de inducción de callos, en el que se observa un trozo de tallo sin formación de callo, un explanto de tallo desdiferenciado, y un callo totalmente formado.

Sesenta días después de la siembra, los callos formados (Fig. 4.29.1) se escindieron del explanto madre (Fig. 4.29.2) y se procedió a su análisis morfológico y se tomaron los valores de peso fresco de los callos (Fig. 4.29.3) obtenidos en cada medio ensayado.

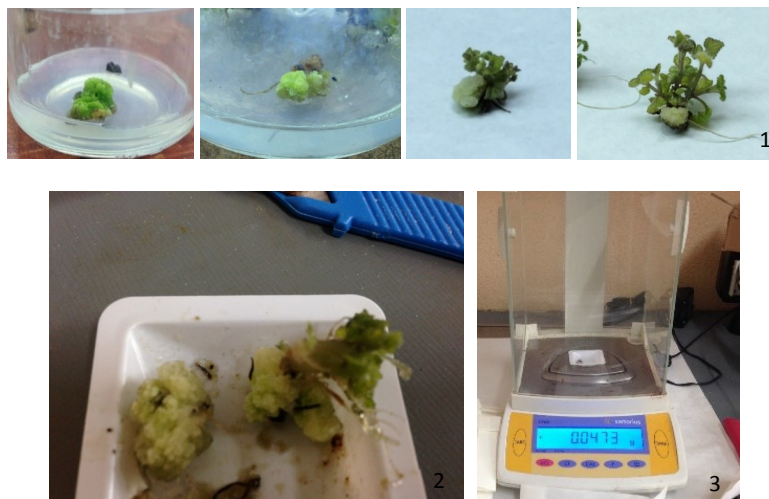


Figura 4.29.- 1) Callos inducidos a partir de explantos de tallos jóvenes en distintos medios de inducción de callos ensayados; 2) Separación del callo del explanto madre y de resto de tejidos diferenciados; 3) Calculando el peso fresco de los callos de *Nepeta teydea*, obtenidos en los diferentes ensayos de inducción de callo.

Posteriormente, cada uno de los callos obtenidos en esta fase, se etiquetó y se sometieron a un proceso de desecación dentro de una estufa (Fig. 4.30.1) a 60°C de temperatura durante 15 días. Estos callos desecados (Fig. 4.30.3) se colocaron dentro de un desecador (Fig. 4.30.2) para volverlos a pesar, y así obtener los datos de peso seco de los callos (Fig. 4.30.4).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Figura 4.30.- 1) Estufa HERAEUS (HANAU.220V. 5,2A) en la que se deshidrataron los callos de *Nepeta teydea* de los diferentes ensayos de inducción de callo; 2) Desecador utilizado para evitar la hidratación de los callos desecados; 3) Aspecto de un callo de *Nepeta teydea* desecado; 4) Calculando el peso seco de los callos de *Nepeta teydea*, obtenidos en los diferentes ensayos.

El último parámetro analizado en la fase de inducción de callos de *Nepeta teydea*, fue el índice de crecimiento de los callos. Para calcular el índice de crecimiento de callos se siguió la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Peso fresco final} - \text{Peso fresco inicial}}{\text{Peso fresco inicial}}$$

IV.2.2.2. CULTIVO *IN VITRO* DE CALLOS DE *NEPETA TEYDEA*

Una vez conseguimos la inducción de los callos de *Nepeta teydea*, el siguiente paso es el cultivo de los callos en un medio de cultivo nuevo, que sea idóneo para su óptimo crecimiento y desarrollo.

IV.2.2.2.1. MATERIAL

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

El material vegetal utilizado en esta fase, fueron callos de *Nepeta teydea* obtenidos de los medios de inducción de callo: medio ½ MS suplementado con 2mg/l de ANA (en condiciones de oscuridad total y de fotoperiodo) (Fig. 4.31.1-2) y del medio ½ MS suplementado con 2mg/l de 2,4-D (en condiciones de oscuridad total y de fotoperiodo) (Fig. 4.31.3-4), tras 60 días desde la siembra del explanto madre.

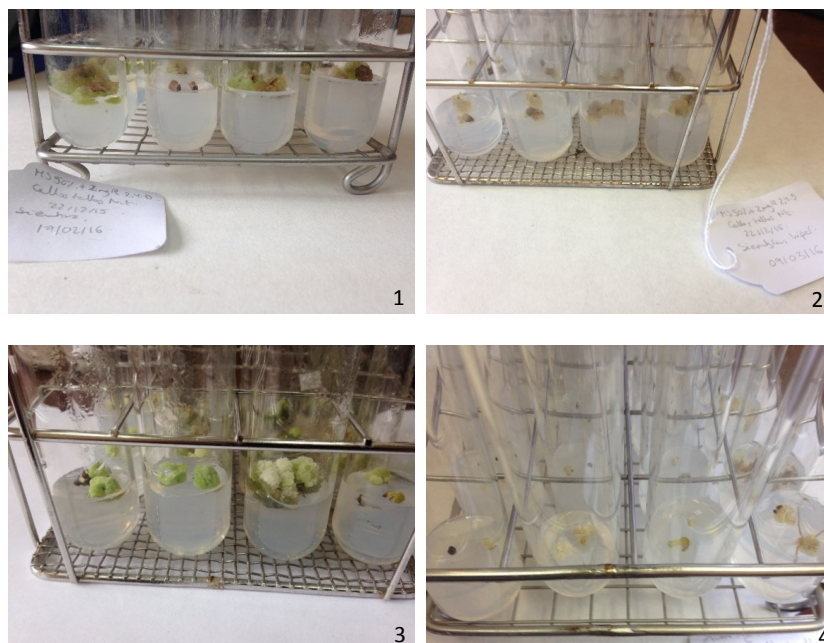


Figura 4.31.- Material vegetal utilizado para la fase de cultivo *in vitro* de callos de *Nepeta teydea*: 1) callos inducidos con 2mg/l de 2,4-D en condiciones de fotoperiodo; 2) callos inducidos con 2mg/l de 2,4-D en condiciones de oscuridad total; 3) callos inducidos con 2mg/l de ANA en condiciones de fotoperiodo; 4) callos inducidos con 2mg/l de ANA en condiciones de oscuridad total.

IV.2.2.2.2. METODOLOGÍA

Una vez inducido los callos de *Nepeta teydea* mencionados en el párrafo anterior, y habiendo alcanzado éstos un desarrollo aceptable, se procedió a transferirlos a un medio de cultivo nuevo. Para ello, los callos formados durante la fase de inducción, fueron escindidos (con ayuda de un bisturí estéril), de los posibles restos de tejidos del explanto inicial.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Esos callos aislados del explanto inicial son sembrados sobre un medio de cultivo nuevo. Por lo general, se trata de medios de cultivos iguales a los empleados para la fase de inducción de callos, exceptuando, que las concentraciones de auxinas y citoquininas es mucho más bajas (Fig. 4.32). En nuestro caso, se utilizó como medio de cultivo de callos, el medio ½ MS suplementado con 0.2mg/L de ANA combinado con 2mg/L de BA.



Figura 4.32.- Preparación de medios de cultivo sólido con reguladores de crecimiento (ANA y BA) para el cultivo de callos de *Nepeta teydea*.

El mantenimiento del cultivo de callo se consigue, realizando periódicamente subcultivos de los callos. Para ello, el callo se dividió en varios trozos, de 0.5g de peso, y se transfirió de nuevo a medio de cultivo de callo fresco (Fig. 4.33). Esta operación se realizó cada 21 días, con el fin de renovar los nutrientes del medio de cultivo.



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 4.33.- Subcultivos de los callos de *Nepeta teydea* dentro de la cámara de flujo laminar. Los callos se escinden y se transfieren a un medio de cultivo de callo fresco.

Las condiciones de incubación de los callos durante esta fase, fueron las mismas que en la fase de inducción de callos (misma temperatura, humedad y dos regímenes lumínicos (fotoperiodo y oscuridad total) (Fig. 4.34).

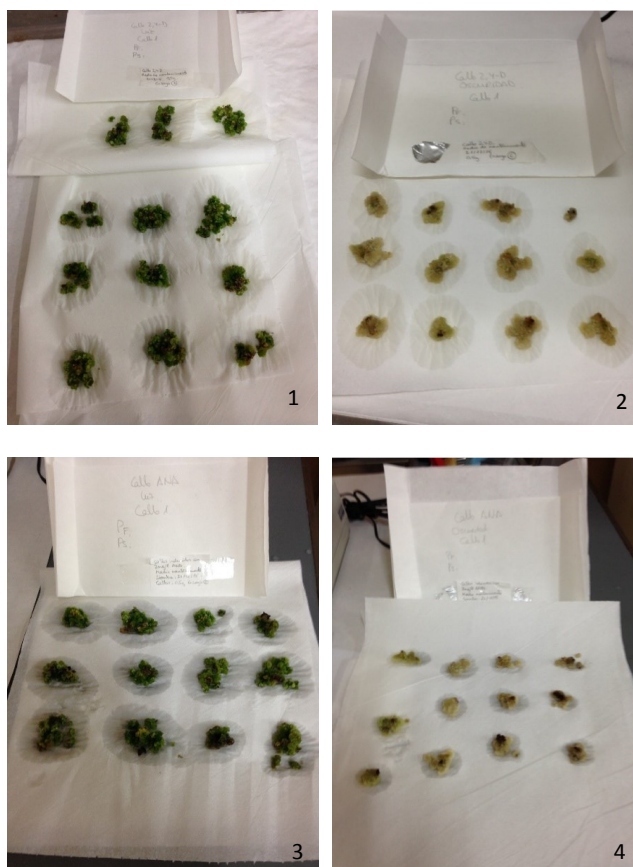


Figura 4.34.- Material vegetal fresco obtenidos al final de la fase de cultivo *in vitro* de callos de *Nepeta teydea*, todos crecidos en el medio $\frac{1}{2}$ MS suplementado con 0.2mg/L de ANA combinado con 2mg/L de BA. 1) Callos procedentes de la inducción con 2,4-D, y en condiciones de fotoperiodo; 2) Callos procedentes de la inducción con 2,4-D, y en condiciones de oscuridad total; 3) Callos procedentes de la inducción con ANA, y en condiciones de fotoperiodo; 4) Callos procedentes de la inducción con ANA, y en condiciones de oscuridad total.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Los parámetros analizados en la fase de cultivo de callos de *Nepeta teydea*, fueron, el peso fresco, el peso seco, y el índice de crecimiento de los callos. Para calcular el índice de crecimiento de callos se siguió la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Peso fresco final} - \text{Peso fresco inicial}}{\text{Peso fresco inicial}}$$

IV.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de las medias del porcentaje de contaminación y germinación de semillas durante la fase de germinación, las medias de longitud de los microesquejes en la fase de establecimiento, las medias de la TM en la fase de multiplicación, el porcentaje de microesquejes enraizados, el número de raíces desarrolladas por planta, longitud máxima de las plantas y porcentaje de supervivencia durante etapa de paso a tierra y aclimatación, y las medias de los parámetros peso seco y peso frescos en la etapa de inducción y cultivo de callos, se utilizó el paquete estadístico SPSS 19.0 para Windows. Los datos cuantitativos se analizaron usando análisis de varianza. En los casos en los que se encontraron diferencias significativas ($\alpha= 0.05$), se realizó el test de Duncan para contrastar las medias. Los resultados se expresaron como el valor de las medias.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

IV.3. RESULTADOS

IV.3.1. RESULTADOS DE LA MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS DE *NEPETA TEYDEA*

IV.3.1.1. FASE DE GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

IV.3.1.1.1. ESTERILIZACIÓN DE LAS SEMILLAS

El éxito de un protocolo de esterilización depende tanto del diseño del protocolo en sí, como del estado fitosanitario en el que se encuentre el material vegetal de partida.

La eficacia de la esterilización de las semillas de *Nepeta teydea*, se determinó por el porcentaje de contaminación observado en cada uno de los protocolos llevados a cabo. La contaminación producida con todos los agentes esterilizantes ensayados, fue mayoritariamente fúngica, seguidas de la contaminación bacteriana (Fig. 4.35).



Figura 4.35.- Imágenes de semillas de *Nepeta teydea* en placas de Petri no contaminadas (parte izquierda) y contaminadas con hongos y bacterias (parte derecha).

Aunque los datos de contaminación se recogieron semanalmente durante toda la fase de germinación, aquí se han representado únicamente los valores obtenidos a las 4 semanas de la siembra, ya que generalmente tras este período de tiempo, las semillas no aumentan su porcentaje de germinación, y por otro lado, se produce la contaminación masiva de las semillas sembradas (con independencia del protocolo de esterilización utilizado), debido seguramente, a la manipulación de las placas para el riego de las

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

semillas. En la figura 4.36, representa dichos porcentajes para cada uno de los protocolos de esterilización ensayados.

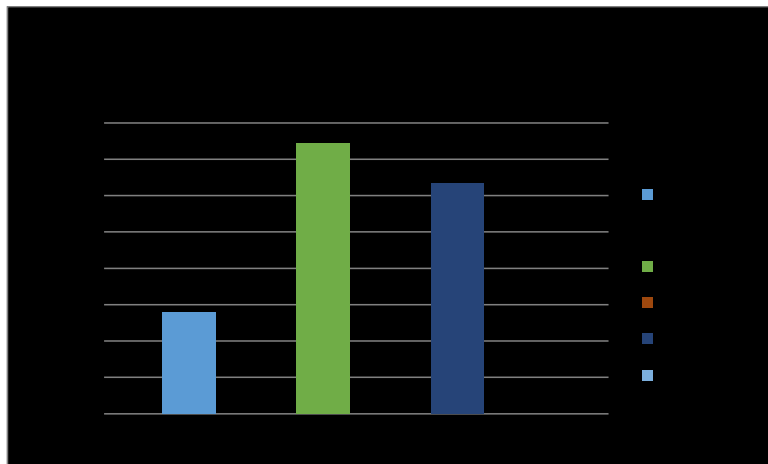


Figura 4.36.- Porcentaje de contaminación de las semillas de *Nepeta teydea* con los protocolos de esterilización E₁ (hipoclorito cálcico), E₂ (peróxido de hidrógeno) y E₃ (hipoclorito sódico), sin utilizar ácido sulfúrico, y sometidas a condiciones de oscuridad total y a fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad.

Como podemos observamos en la gráfica superior, los porcentajes de contaminación más elevados se muestran en condiciones de luz, con el protocolo E₂, seguido muy cerca del protocolo E₃. Los porcentajes de contaminación más bajos los presentan las semillas de *Nepeta teydea* sometidas al protocolo de esterilización E₁.

Sin embargo, en condiciones de oscuridad, con independencia del agente esterilizante utilizado, no se observan ningún tipo de contaminación en las placas, es decir, se consigue una eficacia del 100% de los protocolos de esterilización.

En la siguiente gráfica (Fig. 4.37), se muestran los porcentajes de contaminación de semillas con otros protocolos de esterilización, en los que además de utilizar diferentes agentes de esterilización, se realiza un proceso de escarificación química con el ácido sulfúrico (H₂SO₄).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

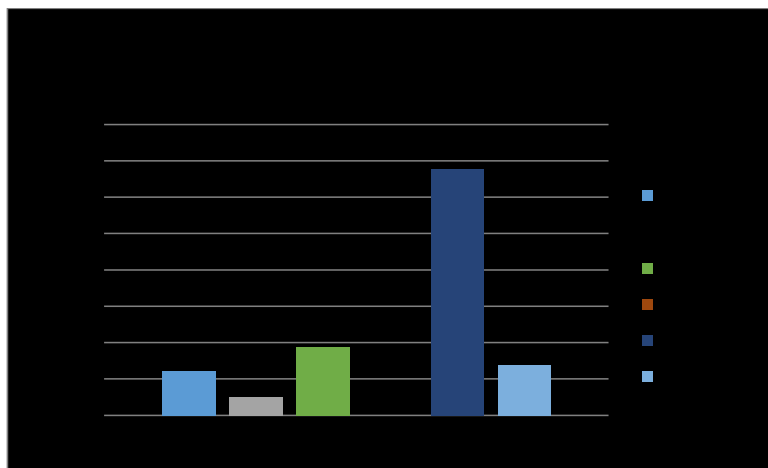


Figura 4.37.- Porcentaje de contaminación de las semillas de *Nepeta teydea* con los protocolos de esterilización E₄ (hipoclorito cálcico), E₅ (peróxido de hidrógeno) y E₆ (hipoclorito sódico), aplicando ácido sulfúrico, y sometidas a condiciones de oscuridad total y a fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad.

Los datos de la figura 4.37, nos indican de manera generalizada que la adición del ácido sulfúrico, no tiene un efecto positivo en el proceso de esterilización de semillas de *Nepeta teydea*. En el caso concreto del protocolo E₆ con luz, podemos ver como se produce un aumento del porcentaje de contaminación de las semillas de más del 50%, con respecto al protocolo E₃ (uso del mismo agente desinfectante, pero sin escarificación química). También se detecta un mayor porcentaje de contaminación en el protocolo E₄ oscuridad y en E₆ oscuridad, que pasa de un 0% de contaminación sin la adición del ácido a un 5% y un 13.9%, respectivamente.

No obstante, parece que la escarificación química, prácticamente no afecta a aquellas semillas sometidas al protocolo E₄ luz, y a E₅ oscuridad, manteniéndose el porcentaje de contaminación prácticamente igual.

Solo en el caso del protocolo E₅ luz, parece que la escarificación química tiene muy buenos resultados, disminuyendo el porcentaje de contaminación a casi la mitad, con un 18.9% de semillas contaminas, con respecto al protocolo E₂ luz, con un 37.2% de contaminación.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Tabla 4.10.- Porcentajes de contaminación observados en los seis protocolos de esterilización analizados E₁, E₂, E₃, E₄, E₅ y E₆, y sometidos a condiciones de oscuridad total y a fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad.

Protocolo de esterilización	Número de semillas sembradas	% de semillas contaminadas
E ₁ luz	180	13.9
E ₁ oscuridad	180	0
E ₂ luz	180	37.2
E ₂ oscuridad	180	0
E ₃ luz	180	31.7
E ₃ oscuridad	180	0
E ₄ luz	180	12.25
E ₄ oscuridad	180	5
E ₅ luz	180	18.9
E ₅ oscuridad	180	0
E ₆ luz	180	67.75
E ₆ oscuridad	180	13.9

Como se puede observar en esta tabla 4.10, los porcentajes de contaminación más bajos generalmente, se observan en aquellos protocolos de esterilización que se llevan a cabo en condiciones de oscuridad, con independencia del agente esterilizante utilizado o de la aplicación o no de la escarificación química. En estas condiciones, se consigue una eficacia del protocolo de esterilización por encima del 86%, y en muchos de nuestros ensayos (E₁ oscuridad, E₂ oscuridad, E₃ oscuridad y E₅ oscuridad) se consigue incluso un éxito del 100% del protocolo de esterilización.

Sin embargo, en condiciones de luz, los porcentajes de contaminación de las semillas son normalmente mayores a los de los protocolos de esterilización en condiciones de oscuridad (exceptuando el caso de E₄ luz con un 12.25% de semillas contaminadas, y el protocolo E₁ luz, que presenta el mismo porcentaje de contaminación que el protocolo E₆ oscuridad, con un 13.9% de semillas contaminadas). De manera que

nos encontramos con porcentajes de contaminación relativamente bajos como son un 12.25% en el protocolo E₄ luz, un 13.9% en el protocolo E₁ luz, y un 18.9% en el protocolo E₅ luz, o con valores mayores, como son el 31.7% en el protocolo E₃ luz y 37.2% en el protocolo E₂ luz. Finalmente, el protocolo de esterilización E₆ luz, es el que presenta el mayor porcentaje de semillas contaminadas, con un 67.75%.

Estos resultados ponen de manifiesto la efectividad de los diferentes protocolos de esterilización llevados a cabo.

IV.3.1.1.2. GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

Para evaluar el efecto de los distintos tratamientos (diferentes protocolos de esterilización, escarificación química, la adición de reguladores de crecimiento y el efecto de la luz) sobre el poder germinativo de las semillas de *Nepeta teydea*, se calculó el porcentaje de germinación a los 30 días de cada ensayo.

IV.3.1.1.2.1. EFECTO DEL AGENTE DESINFECTANTE UTILIZADO EN EL PROTOCOLO DE ESTERILIZACIÓN SOBRE LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

Podemos observar en la figura 4.37, que las semillas presentan porcentajes de germinación mayores en condiciones de luz (Fig. 4.38.1) que en condiciones de oscuridad (Fig. 4.38.2), sobretodo en el caso de los protocolos E₁ y E₂. En el caso de los protocolos de esterilización E₃, parece que el porcentaje de germinación es independiente de las condiciones de iluminación a las que se someta las semillas durante esta fase.

El mejor protocolo de esterilización para la germinación de semillas se observa en el caso del protocolo E₃ luz, seguido muy de cerca del protocolo E₂ luz. El peor porcentaje de germinación se observa con el protocolo de esterilización E₁.

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

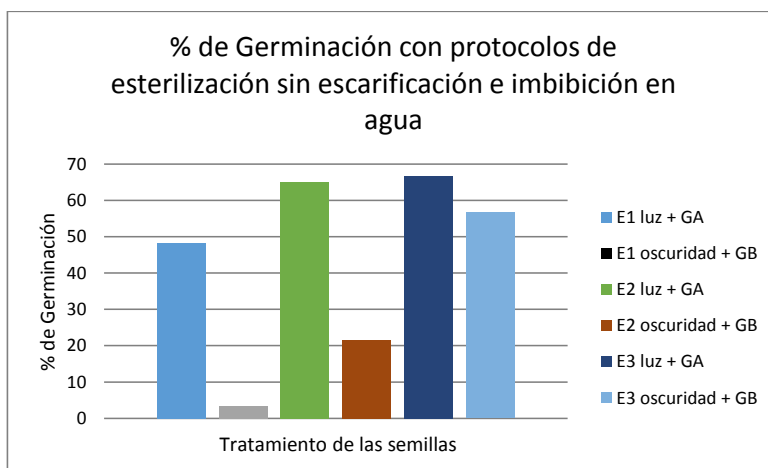


Figura 4.37.- Porcentaje de germinación de las semillas de *Nepeta teydea* a las 4 semanas de realizar el proceso de esterilización con diferentes agentes desinfectantes, sin escarificación química, y con imbibición de las semillas con agua durante 24 horas en condiciones de oscuridad, y germinadas en condiciones de oscuridad total y bajo fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad.

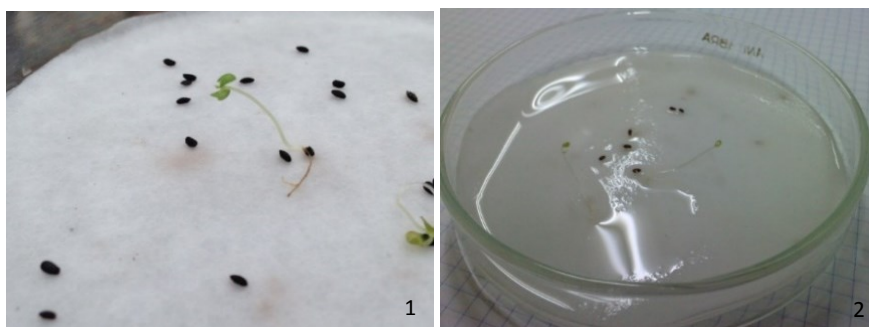


Figura 4.38.- Imágenes de las semillas de *Nepeta teydea* germinadas en placas de Petri: 1) en condiciones de fotoperiodo; 2) en condiciones de oscuridad total. Nótese que las semillas germinadas en condiciones de fotoperiodo, presentan los cotiledones de color verde, mientras que las semillas germinadas en condiciones de oscuridad, muestran color amarillo.

IV.3.1.1.2.2. EFECTO DE LA ESCARIFICACIÓN QUÍMICA (APLICACIÓN DE ÁCIDO SULFÚRICO) APLICADA DURANTE EL PROTOCOLO DE ESTERILIZACIÓN SOBRE LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

En la figura 4.39, se muestra como de manera generalizada, la escarificación química de las semillas sin pre-tratamiento con ácido giberélico, produce una disminución generalizada del porcentaje de germinación de las semillas. Aquí, el efecto más drástico se produjo en el protocolo E₄ en condiciones de oscuridad, pasando de más de un 60% en condiciones sin escarificación, a menos de un 5% de germinación con el tratamiento con el ácido. Mientras que, en el resto de los protocolos de esterilización se observó una reducción de la germinación cerca de la mitad que en el caso de las semillas sin escarificación.

Con la aplicación del ácido sulfúrico, el máximo porcentaje de germinación se consigue con el protocolo E₆ en condiciones de luz, seguido del E₆ en condiciones de oscuridad y del protocolo E₄ en condiciones de luz. El peor porcentaje de germinación se obtuvo con el protocolo E₄ con condiciones de fotoperiodo y los dos protocolos de E₅.

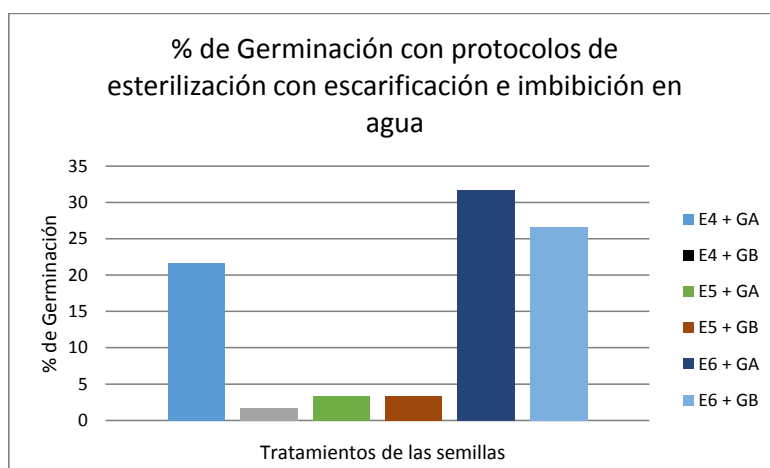


Figura 4.39.- Porcentaje de germinación de las semillas de *Nepeta teydea* a las 4 semanas de la siembra, tras la esterilización con los diferentes agentes desinfectantes con aplicación de escarificación química, y la imbibición en agua de las semillas durante 24 horas en condiciones de oscuridad, y germinadas en condiciones de oscuridad total y fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad.

IV.3.1.1.2.3. EFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO CON ÁCIDO GIBERÉLICO SOBRE LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

La aplicación del pre-tratamiento con GA₃ con independencia de la concentración aplicada, (Fig. 4.40) aumentó en todos los casos los porcentajes de germinación (Fig. 4.41.2), en comparación con los casos en los que no se aplicó pre-tratamiento (Fig. 4.41.1).

Además, podemos ver los mejores porcentajes de germinación se obtuvieron en el protocolo E₁ con 3mg/l de GA₃ y con fotoperiodo, en el protocolo E₂ con 3mg/l de GA₃ en oscuridad y en el protocolo E₂ con 3mg/l de GA₃ con fotoperiodo. Los peores resultados de germinación en todos los protocolos de esterilización utilizados sin escarificación, se obtuvieron cuando las semillas fueron pre-tratadas con 5mg/l de GA₃ en condiciones de oscuridad.

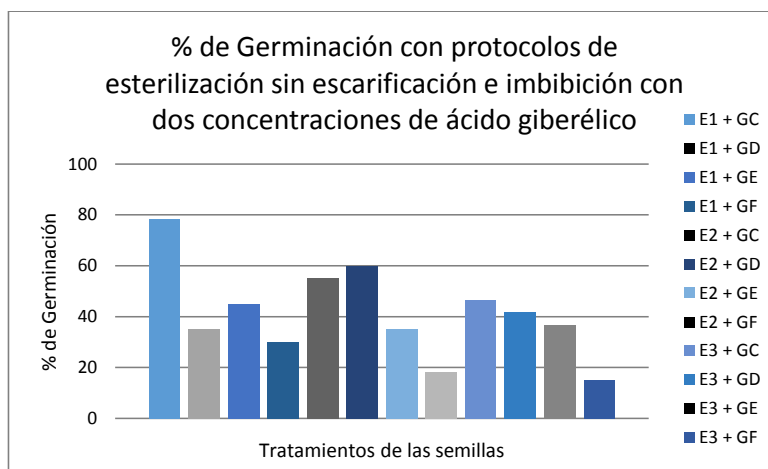


Figura 4.40.- Porcentaje de germinación de las semillas de *Nepeta teydea* a las 4 semanas de la siembra, tras la esterilización con los diferentes agentes de desinfección, sin el uso de ácido, y con una imbibición de las semillas en dos concentraciones diferentes de ácido giberélico de 24h en condiciones de oscuridad, y germinadas en condiciones de totalidad oscuridad o bajo fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

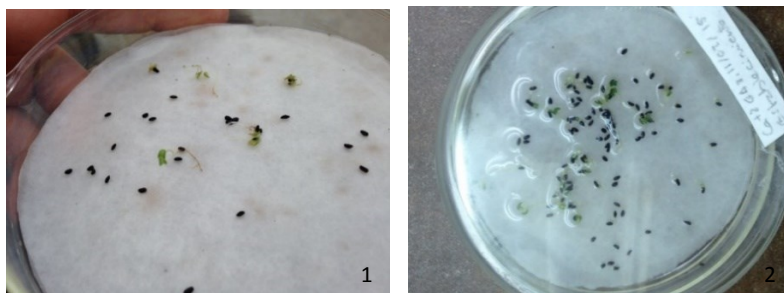


Figura 4.41.- Imágenes de semillas de *Nepeta teydea* germinadas en placas de Petri: 1) sin pre-tratamiento con ácido giberélico; 2) con pre-tratamiento de ácido giberélico.

Cuando a las semillas son sometidas a escarificación química y posteriormente son pre-tratadas con concentraciones diferentes de GA₃ (Fig. 4.42), lo que observamos es que se produce una disminución de todos los porcentajes de germinación, con respecto a las semillas pre-tratadas con GA₃, pero sin aplicación del ácido sulfúrico. De hecho, en algunos protocolos tales como E₄+GE, E₄+GF, E₅+GF y E₆+GE, no se detectó germinación de las semillas.

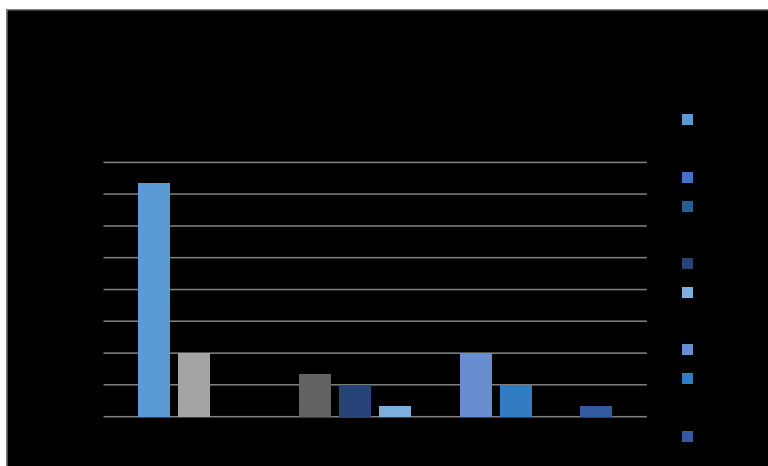


Figura 4.42.- Porcentaje de germinación de las semillas de *Nepeta teydea* a las 4 semanas de la siembra, tras la esterilización con los diferentes agentes de desinfección, con el uso de ácido, y con una imbibición de las semillas en dos concentraciones diferentes de ácido giberélico de 24h en condiciones de oscuridad, y germinadas bajo condiciones de oscuridad total o fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad.

En la tabla 4.11, se resumen el porcentaje de germinación de las semillas de *Nepeta teydea*, en todos los ensayos de germinación realizados en este trabajo.

Tabla 4.11.- Porcentaje de germinación de las semillas de *Nepeta teydea* a las 4 semanas de la siembra, tras la esterilización con los diferentes agentes de desinfección, con el uso o no de ácido, y con una imbibición de las semillas en agua y en dos concentraciones diferentes de ácido giberélico durante 24h en condiciones de oscuridad, y germinadas bajo condiciones de total oscuridad o fotoperiodo de 16hluz/8h oscuridad.

Tratamiento de las semillas	Número de semillas sembradas	% de semillas germinadas
E ₁ + GA	60	48.3
E ₁ + GB	60	3.3
E ₁ + GC	60	78.3
E ₁ + GD	60	35
E ₁ + GE	60	45
E ₁ + GF	60	30
E ₂ + GA	60	65
E ₂ + GB	60	21.7
E ₂ + GC	60	55
E ₂ + GD	60	60
E ₂ + GE	60	35
E ₂ + GF	60	18.3
E ₃ + GA	60	66.7
E ₃ + GB	60	56.7
E ₃ + GC	60	46.7
E ₃ + GD	60	41.7
E ₃ + GE	60	36.7
E ₃ + GF	60	15
E ₄ + GA	60	21.7
E ₄ + GB	60	1.7
E ₄ + GC	60	36.7
E ₄ + GD	60	10
E ₄ + GE	60	0
E ₅ + GF	60	0
E ₅ + GA	60	3.3
E ₅ + GB	60	3.3
E ₅ + GC	60	6.7
E ₅ + GD	60	5
E ₅ + GE	60	1.7
E ₅ + GF	60	0
E ₆ + GA	60	31.7
E ₆ + GB	60	26.7
E ₆ + GC	60	10

E₆ + GD	60	5
E₆ + GE	60	0
E₆ + GF	60	1.7

IV.3.1.2. FASE DE ESTABLECIMIENTO

IV.3.1.2.1. EFECTO DE LA FORMULACIÓN SALINA SOBRE EL DESARROLLO *IN VITRO* DE *NEPETA TEYDEA*

El desarrollo de un protocolo de micropropagación para cualquier planta varía en función del explanto inicial elegido, de la composición del medio de cultivo seleccionado, del aporte hormonal exógeno, así como del tipo de hormona/s empleados.

El Medio 1 se diferencia del Medio 2 en la concentración salina del medio MS, que el primero está al 100%, mientras que el segundo se encuentra al 50% de la concentración.

Para analizar el comportamiento de las plántulas en estudio a lo largo del tiempo de cultivo (30 días), se evaluó los siguientes parámetros: el porcentaje de supervivencia, el porcentaje de hiperhidricidad, longitud aérea (log. aer.), longitud radicular (long. raíz), número de nudos (nº nudos) y número de raíz (nº raíz). Los resultados obtenidos en estos ensayos, se representan en la en las figuras 4.43, 4.44 y 4.45.

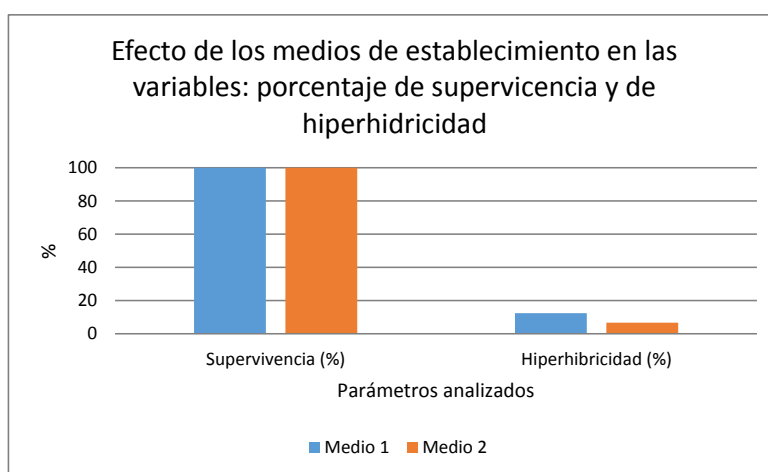


Figura 4.43.- Representación de los valores medios de las variables porcentaje de supervivencia y porcentaje de hiperhidricidad, en cada uno de los medios ensayados durante la fase de establecimiento (Medio 1 y Medio 2).

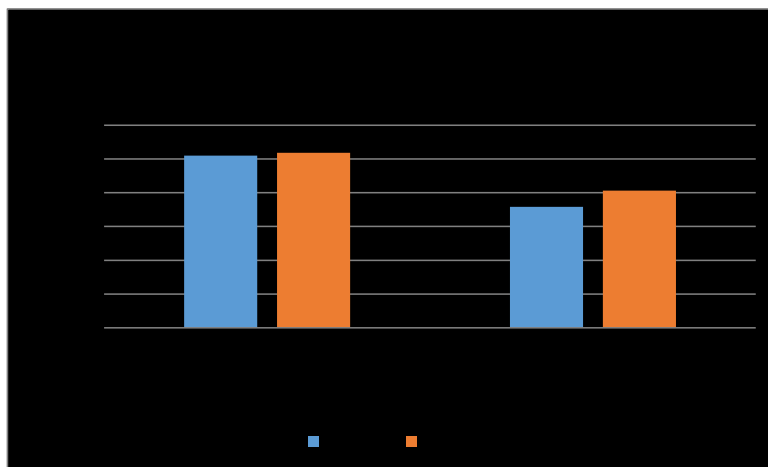


Figura 4.44.- Representación de los valores medios de las variables longitud aérea y longitud radicular por explanto, en cada uno de los medios ensayados durante la fase de establecimiento (Medio 1 y Medio 2).

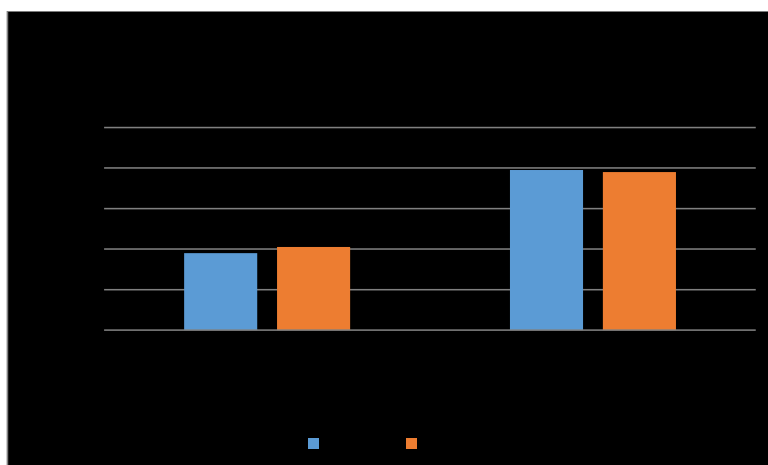


Figura 4.45.- Representación de los valores medios de las variables número de nudos y número de raíces por explanto, en cada uno de los medios ensayados durante la fase de establecimiento (Medio 1 y Medio 2).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 965383		Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14	
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58	
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47	
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34	

Los análisis muestran que existe únicamente diferencias significativas entre los medios de cultivos ensayados respecto a la variable porcentaje de hiperhidricidad, donde se aprecia que en el Medio 1 los explantos han presentado un mayor porcentaje de hiperhidricidad (12.5%) con respecto al Medio 2 (6.7%). En el resto de los parámetros analizados durante esta fase (porcentaje de supervivencia, longitud aérea y radicular y número de nudos y raíces por explantos), no se aprecian diferencias significativas entre los dos medios de establecimiento analizados (Fig. 4.46).

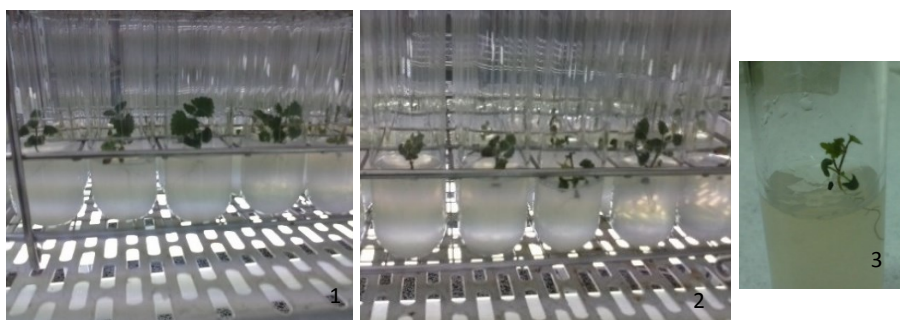


Figura 4.46.- Plántulas de *Nepeta teydea* desarrolladas durante la fase de establecimiento. 1) En medio MS al 100% sin reguladores de crecimiento (MS0), denominado Medio 1; 2) Medio ½ MS sin reguladores de crecimiento (½ MS0), denominado Medio 2; 3) Detalle de una plántula de *Nepeta teydea* en el medio MS.

IV.3.1.3. FASE DE MULTIPLICACIÓN

IV.3.1.3.1. EFECTO DE LOS REGULADORES CRECIMIENTOS SOBRE LA TASA DE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *NEPETA TEYDEA* EN UN MEDIO ½ MS.

De todos los componentes químicos de un medio de cultivo, los que afectan de forma más importante a la tasa de multiplicación son los reguladores de crecimiento presentes en él (Pérez-Francés, 2006). Así, el uso de concentraciones elevadas de ácido naftalenacético (ANA) sobre el desarrollo de los brotes, parece desprogramar el patrón morfogénético, desorganizando los tejidos e induciendo la formación de callos (Gregori y Lorenzini, 1974; Pennazio y Vecciati, 1976). Sin embargo, a bajas concentraciones de ABA y en combinación con la benciladenina (BA), una citoquinina, se promueve el desarrollo vigoroso de brotes capaces de desarrollar raíces espontáneamente, con un efecto mucho menos marcado en cuanto a la calogénesis (Novak et al., 1980).

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

IV.3.1.3.1.1. EFECTO DE LA BENCILADENINA SOBRE LA TASA DE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *NEPETA TEYDEA* EN UN MEDIO ½ MS.

Las plántulas desarrolladas en el medio de multiplicación M1 (carente de reguladores de crecimiento), presentaron crecimiento normal, con enraizamiento espontáneo (Fig. 4.47).

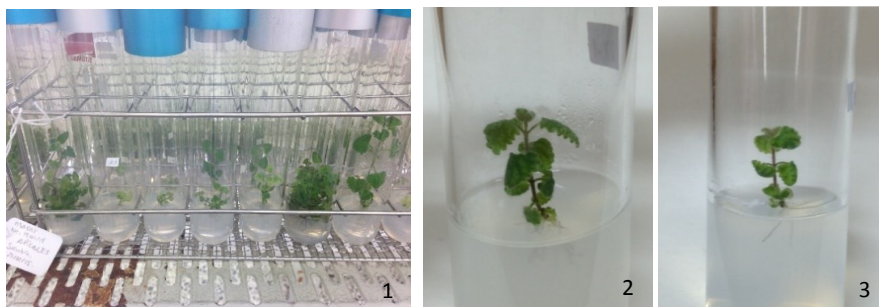


Figura 4.47.- 1) Imágenes de plántulas de *Nepeta teydea* crecidas en medio de multiplicación M1; 2) Detalle de una vitropianta en este medio procedente de explantos apicales; 3) Detalle de una vitropianta en este medio procedente de explantos basales.

Las plántulas desarrolladas en el medio de multiplicación M2, M3 y M4 (medios MS suplementados con concentraciones crecientes del regulador de crecimiento BA) se obtuvieron plántulas que morfológicamente variaron con respecto a las plántulas crecidas en medio carente de reguladores de crecimientos. Podemos apreciar que a medida que aumenta la concentración de BA en el medio de multiplicación, las plántulas dejaron de producir raíces, para producir callos en la porción basal del explanto, y en cuanto al aspecto de la parte aérea de estas plántulas, observamos que las plántulas presentaron hojas cada vez más pequeñas y tallos con mayor número de nudos (Fig. 4.48, Fig. 4.49 y Fig. 4.50).



114

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 27/06/2017 09:46:14

JUAN IGNACIO FRIAS VIERA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 19:33:58

FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

29/06/2017 09:05:47

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

18/07/2017 14:28:34

Figura 4.48.- 1) Imágenes de plántulas de *Nepeta teydea* crecidas en medio de multiplicación M2; 2) Detalle de una vitroplanta en este medio procedente de explantos aplicales; 3) Detalle de una vitroplanta en este medio procedente de explantos basales.



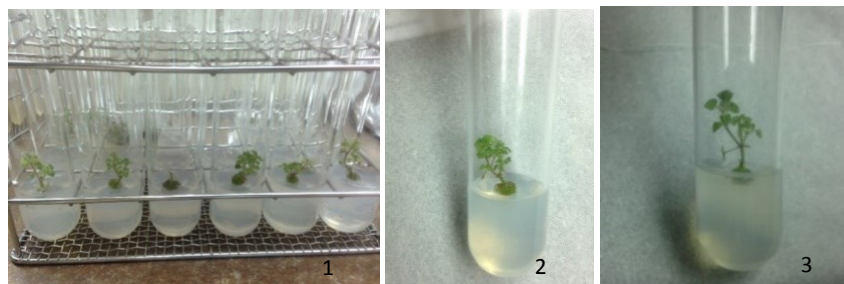
Figura 4.49.- 1) Imágenes de plántulas de *Nepeta teydea* crecidas en medio de multiplicación M3; 2) Detalle de una vitroplanta en este medio procedente de explantos aplicales; 3) Detalle de una vitroplanta en este medio procedente de explantos basales.



Figura 4.50.- 1) Imágenes de plántulas de *Nepeta teydea* crecidas en medio de multiplicación M4; 2) Detalle de una vitroplanta en este medio procedente de explantos aplicales; 3) Detalle de una vitroplanta en este medio procedente de explantos basales.

IV.3.1.3.1.2. EFECTO DE LA BENCILADENINA Y EL ÁCIDO NAFTALENACÉTICO SOBRE LA TASA DE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *NEPETA TEYDEA* EN UN MEDIO ½ MS.

Las plántulas desarrolladas en el medio de multiplicación M5 y M6 (medios MS suplementados con concentraciones crecientes de los reguladores de crecimientos BA y ANA) se obtuvieron plántulas con anomalías destacables, como es la generación de un mayor desarrollo de callos, que se oscure sobretodo en el M6, probablemente por una alta producción de fenoles (Fig. 4.51 y Fig. 4.52).



Figuras 4.51.- 1) Imágenes de plántulas de *Nepeta teydea* crecidas en medio de multiplicación M5; 2) Detalle de una vitroplanta en este medio procedente de explantos apicales; 3) Detalle de una vitroplanta en este medio procedente de explantos basales.



Figuras 4.52.- 1) Imágenes de plántulas de *Nepeta teydea* crecidas en medio de multiplicación M6; 2) Detalle de una vitroplanta en este medio procedente de explantos apicales; 3) Detalle de una vitroplanta en este medio procedente de explantos basales.

De manera generalizada, en todos los medios de multiplicación suplementados con reguladores de crecimiento (los medios M2, M3, M4, M5 y M6), se detectó el desarrollo de tejidos hiperhídricos en las plántulas (Fig. 4.53). Estas plantulas mostraron una morfología muy característica, con hojas grandes engrosadas y brillantes, tallos deformados y formación tanto de raíces como de callos.



Figuras 4.53.- Imágenes de plántulas de *Nepeta teydea* crecidas en los diferentes medios de multiplicación suplementados con los reguladores de crecimientos, presentaron el fenómeno de hiperhidricidad.

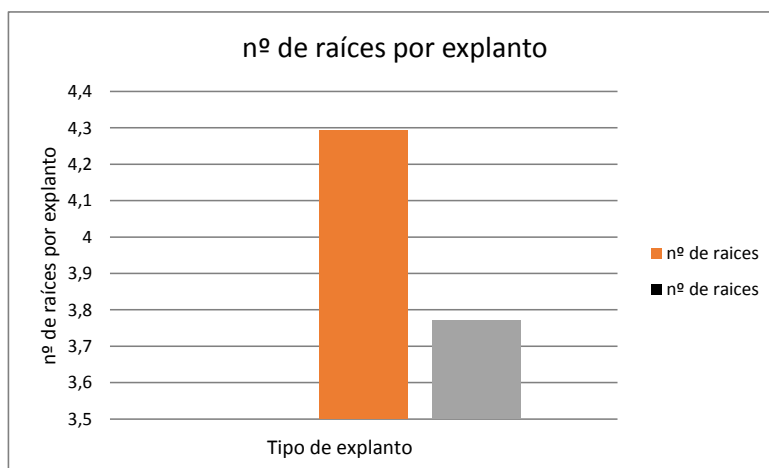
IV.3.1.4. FASE DE ENRAIZAMIENTO

IV.3.1.4.1. EFECTO DEL TIPO DE EXPLANTO (APICAL O BASAL) EN EL ENRAIZAMIENTO DE *NEPETA TEYDEA*.

Después de 4 semanas se observó la formación espontánea de raíces sin la adición de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo ½ MS0. Las plántulas o microesquejes, presentaron un desarrollo normal sin el desarrollo de callo en la base de los explantos en ningún caso.

Las primeras raíces comenzaron a ser visibles bajo la lupa a los 7 días de la siembra en el medio ½ MS. No se observó el desarrollo de callo en ningún caso, formándose las raíces por un proceso de rizogénesis directa. Todas las raíces se desarrollaron por debajo del medio de cultivo, aunque en raras ocasiones, hubo desarrollo de raíces tanto por encima como por debajo del medio, con abundante presencia de pelos radiculares en aquellas que se desarrollaron por encima del medio.

Tras 30 días de cultivo, se analizó el número medio de raíces en ambos tipos de explantos en el medio de cultivo ½ MS (Fig. 4.54). Tanto en los explantos apicales como en los explantos basales, el número medio de raíces fue de más de 3 raíces por explanto.



117

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 4.54.- Representación gráfica de los valores medios del número de raíces (cm) en los explantos apicales y basales, durante la fase de enraizamiento.

Al mismo tiempo, se analizó la longitud máxima de las raíces de los dos tipos de explantos (Fig. 4.55). Las raíces de los explantos apicales en el medio ½ MS alcanzaron una longitud media de casi 20cm, mientras que las desarrolladas a partir de explantos basales tuvieron una longitud media de 25 cm.

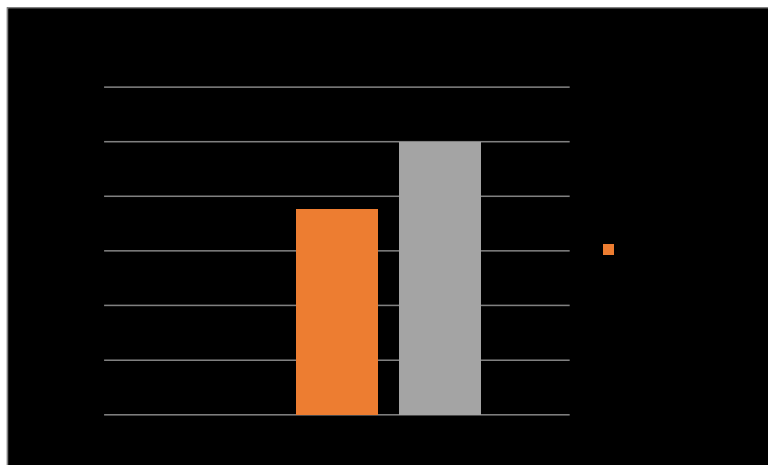


Figura 4.55.- Representación gráfica de los valores medios de la longitud de la raíz (cm) en los explantos apicales y basales, durante la fase de enraizamiento.

El porcentaje de microesquejes enraizados en medio de cultivo ½ MS para ambos tipos de explantos, fue el mismo, de un 100%. Para el resto de las variables analizadas en esta fase (número de raíces, longitudes de raíces) tampoco se detectó diferencias importantes (Tabla 4.14).

Tabla 4.14.- Porcentaje de enraizamiento, número y longitud media de raíces desarrolladas en microesquejes de *Nepeta teydea* procedentes de explantos apicales y basales, tras 30 días de su siembra en un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento.

Tipo de explanto	% de Enraizamiento	Número de raíces por explanto	Longitud radicular media por explanto
Apical	100	4.3	18.8

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Basal	100	3.8	25
--------------	-----	-----	----

Se analizó también, la longitud máxima de la parte aérea de las plantas enraizadas (Fig. 4.56), obteniendo una longitud media de 31.6cm en el caso de los explantos apicales, y una longitud media de 27.2cm en plantas procedentes de explantos basales.

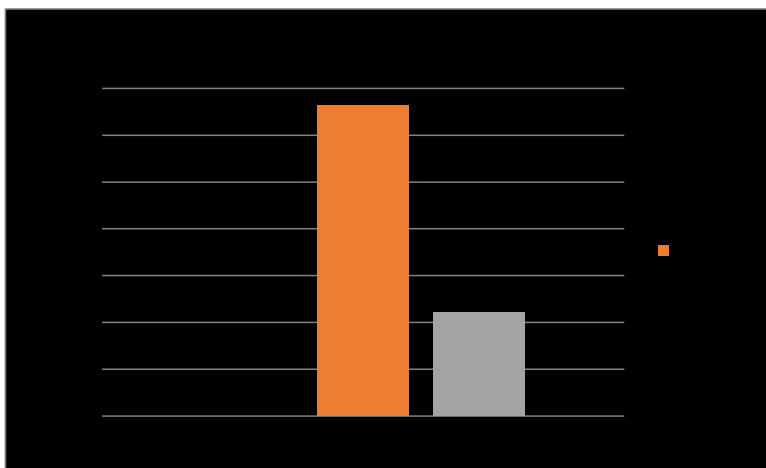


Figura 4.56.- Representación gráfica de los valores medios de la longitud de la parte aérea (cm) en los explantos apicales y basales, durante la fase de enraizamiento.

En cuanto a la morfología de las plantas enraizadas, observamos que en las plántulas obtenidas de explantos apicales, presentan el doble de la longitud aérea con respecto a la longitud de la raíz. En el caso de las plántulas obtenidas de explantos basales, observamos que tanto el sistema radicular como la parte aérea miden prácticamente lo mismo (Fig. 4.57).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 965383		Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14	
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58	
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47	
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34	

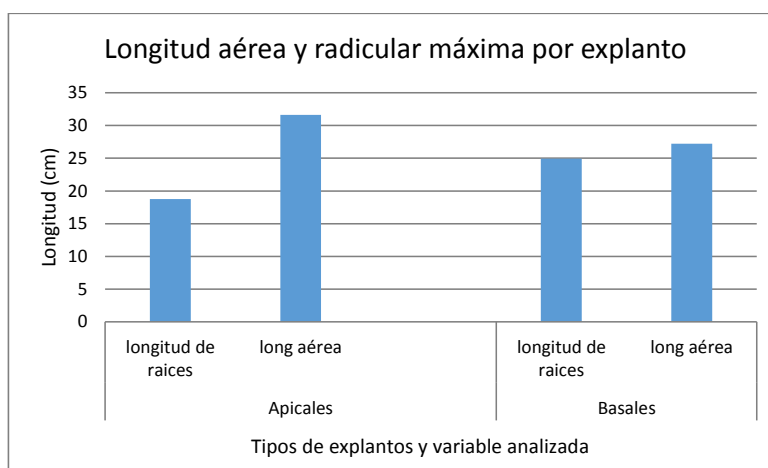


Figura 4.57.- Representación gráfica de los valores medios de la longitud de la raíz y longitud de la parte aérea (cm) en los explantos apicales y basales, durante la fase de enraizamiento.

IV.3.1.5. FASE DE PASO A TIERRA Y ACLIMATACIÓN

IV.3.1.5.1. EFECTO DEL TIPO DE EXPLANTO (APICAL O BASAL) EN EL PASO A TIERRA Y ACLIMATACIÓN DE *NEPETA TEYDEA*.

Se escogieron las plantas procedentes de explantos apicales y basales enraizadas durante la fase de enraizamiento *in vitro*, que mostraron sistemas radiculares mejor desarrollados, para llevar a cabo la etapa de paso a tierra.

Durante la extracción de las vitroplantas de los recipientes de cristal, la limpieza de las raíces y base de tallos, el tratamiento fungicida de las mismas y la siembra de las plantas en el sustrato, no se produjo rotura ni pérdida de raíces en ningún caso.

Las plantas sembradas en bandejas de semilleros, se cubrieron con un plástico transparente y se colocaron en bandejas que contenía agua destilada en el fondo. De esta manera, mantuvimos la humedad relativa al 100% durante 14 días después del paso a tierra. El plástico que cubría las plantas se comenzó a perforar poco a poco, con la finalidad de reducir muy lentamente la humedad. A los 13 días, se comenzó a abrir el plástico transparente y a descubrir las plantas hasta la eliminación total del mismo. Sin embargo, se mantuvo la bandeja que contenía agua destilada en el fondo. Finalmente, a los 7 días después de quitarles el plástico, las bandejas con plantas de *Nepeta* se sacaron

de las condiciones controladas de la cámara de incubación, y se mantuvieron dentro del laboratorio durante un período de 45 días.

Se observó que mientras las plantas estaban cubiertas con el plástico transparente, presentaban hojas de pequeño tamaño, largos internodos y en general mostraban aspecto endeble (Fig. 4.58.1), pero después de una semana sin el plástico, las plantas comenzaron a presentar un aspecto vigoroso, con hojas de mayor tamaño, comenzaron a desarrollar nuevas hojas y presentaron un buen desarrollo del sistema radicular (Fig. 4.58.2).



Figura 4.58.- Detalle de plantas de *Nepeta teydea* (procedentes de explantos apicales) con mezcla de turba/perlita (2:1) y desarrollo *ex vitro*. 1) Plantas dentro de la cámara de incubación sin cubierta de plástico; 2) Plantas fuera de la cámara de incubación, en condiciones de invernadero-laboratorio.

Para evaluar la eficiencia del proceso de paso a tierra y la posterior fase de aclimatación de *Nepeta teydea*, y el efecto del tipo de explanto (apical y basal) empleado en este paso crítico del protocolo de micropropagación, se procedió a analizar diferentes parámetros.

Morfológicamente, se aprecia diferencias importantes en cuanto al desarrollo aéreo de las plantas de *Nepeta teydea* aclimatadas *ex vitro* (Fig. 4.59).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Figura 4.59.- Imágenes de plantas de *Nepeta teydea* aclimatadas *ex vitro*: 1) Planta procedente de explanto apical; 2) Planta procedente de explanto basal.

En la figura 4.60 y en la figura 4.61, se representan las longitudes aéreas y radiculares de las plántulas procedentes de explantos apicales y basales, en condiciones *in vitro* (antes del paso a tierra) y en condiciones *ex vitro* (plantas aclimatadas).

En la figura 4.60, detectamos que en las plántulas procedentes de explantos apicales de *Nepeta teydea*, durante la fase de paso a tierra y aclimatación, se produce un aumento tanto de la longitud área como de las raíces.

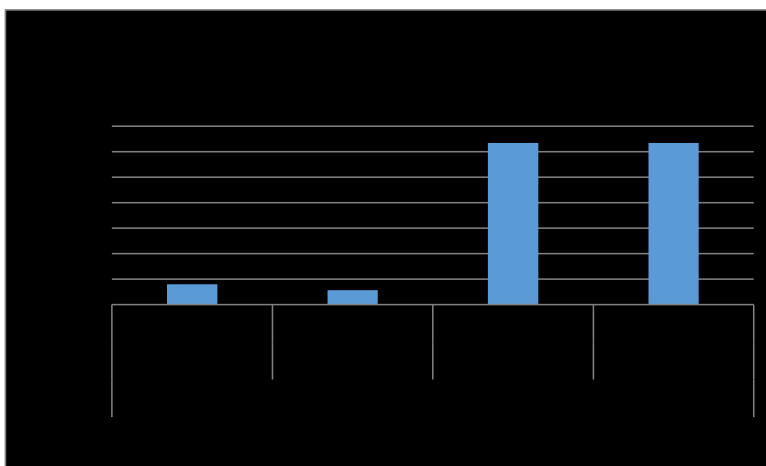


Figura 4.60.- Representación gráfica de los valores medios de la longitud de la parte aérea y la longitud de la raíz (mm) en plantas en condiciones de *in vitro* y aclimatadas, procedentes de explantos apicales, durante la fase de paso a tierra y aclimatación.

Sin embargo, cuando las plántulas proceden de explantos basales de *Nepeta teydea*, se produce un aumento de la longitud aérea mucho mayor que la longitud de las raíces, durante la fase de paso a tierra y aclimatación (Fig.461).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

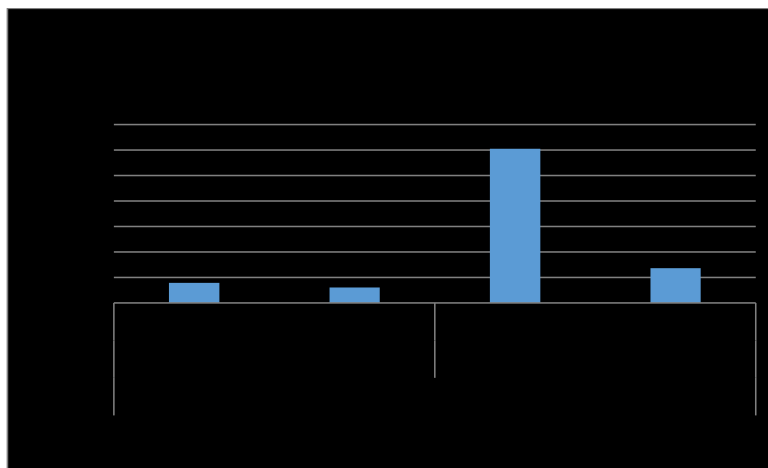
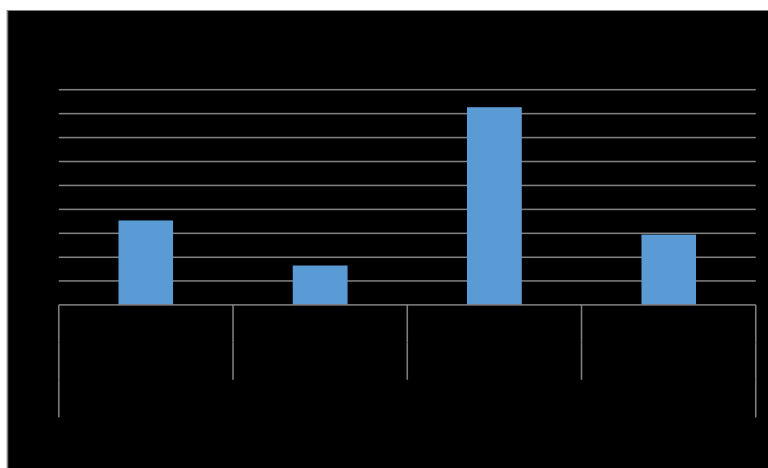


Figura 4.61.- Representación gráfica de los valores medios de la longitud de la parte aérea y la longitud de la raíz (mm) en plantas en condiciones de *in vitro* y aclimatadas, procedentes de explantos basales, durante la fase de paso a tierra y aclimatación.

Otros parámetros analizados durante esta fase del protocolo de micropropagación, fueron el número de nudos y raíces por plántulas (Fig. 4.62 y Fig. 4.63), y el porcentaje de supervivencia y contaminación de las mismas (Fig. 4.64).

El estudio del número de nudos y raíces de las plántulas de *Nepeta teydea* aclimatadas *ex vitro*, procedentes tantos de explantos apicales como basales, mostraron un comportamiento muy similar. Ambos casos, se produjo un mayor número de nudos que del número de raíces.



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 4.62.- Representación gráfica de los valores medios del número de nudos y del número de raíces (mm) en plantas en condiciones de *in vitro* y aclimatadas, procedentes de explantos apicales, durante la fase de paso a tierra y aclimatación.

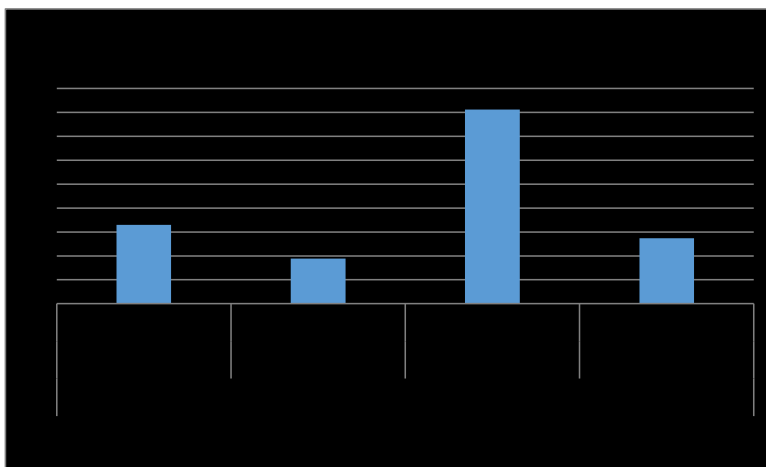
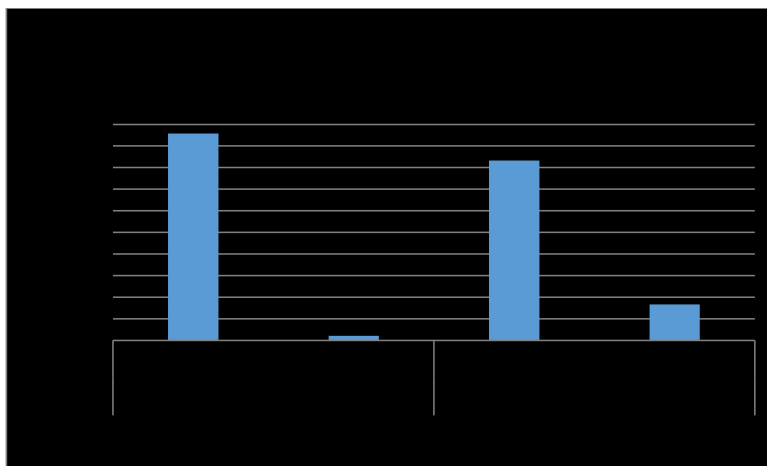


Figura 4.63.- Representación gráfica de los valores medios del número de nudos por plantas y del número de raíces (mm) en plantas en condiciones de *in vitro* y aclimatadas, procedentes de explantos basales, durante la fase de paso a tierra y aclimatación.

En cuanto a las variables porcentaje de supervivencia y contaminación de las plántulas de *Nepeta teydea* tras el paso a tierra y la etapa de aclimatación *ex vitro* (Fig. 4.64), se apreció de manera generaliza, que en las plántulas de *Nepeta teydea* presentaron altos % de supervivencia y un bajo % de explantos contaminados.



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 4.64.- Representación gráfica de los valores medios del porcentaje de supervivencia y del porcentaje de contaminación de las plantas procedentes de explantos apicales y basales, al final de la etapa de paso a tierra y aclimatación.

Podemos resumir que el paso a tierra de *Nepeta teydea* no presentó complicaciones. Tanto la parte aérea como las raíces de las plantas aclimatadas *ex vitro*, presentaron un buen desarrollo, no mostrando síntomas aparentes de contaminación o necrosis. En general, las plantas tuvieron un desarrollo destacado de la parte aérea, con respecto al crecimiento de las raíces.

IV.3.2. RESULTADOS DE LA MICROPROPAGACIÓN DE CALLOS DE *NEPETA TEYDEA*

IV.3.2.1. FASE DE INDUCCIÓN DE CALLOS DE *NEPETA TEYDEA*

Para evaluar el tratamiento y el medio de cultivo que mejor favoreció la formación de callos, se procedió a la evaluación el crecimiento de los callos, mediante el análisis de una serie de parámetros como son: formación de callo, color y consistencia del callo, y por último el peso fresco y seco de los callos generados a partir de explantos de tallos de *Nepeta teydea*, que nos permitió medir el índice de crecimiento de los callos, en los 26 medios de cultivos ensayados.

De manera generalizada, los segmentos de tallos utilizados como material vegetal de partida para la inducción de callos de *Nepeta teydea*, se mantuvieron verdes desde el momento de la inoculación en el medio hasta el momento de la formación de callos, momento en el que el explanto comenzó a engrosarse únicamente en las regiones de corte, y en función del desarrollo y crecimiento del callo, se limitó la formación del callo a estas zonas de heridas, y la parte central del segmento se mantuvo como tallo que se tornó a color marrón, convirtiéndose finalmente en un tejido necrótico; o todo el segmento de tallo se comenzó a engrosar y terminó por convertirse totalmente en un callo.

El hecho de que las regiones de corte del explanto sean las primeras zonas en las que se produce la formación de callos, se debe posiblemente a la tendencia de los tejidos vegetales a formar callo a partir de heridas como una reacción defensiva natural (George, 2008).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Se detectó diferencias significativas en la inducción y en formación de callos en función de las condiciones de luz a las que fueron sometidos los cultivos. En un principio los microcallos fueron translúcidos para adquirir más tarde una coloración verde más o menos intenso en el caso de los callos incubados en condiciones de fotoperiodo, y en el caso de los cultivos incubados en oscuridad total, las células de los callos adquirieron una coloración amarillenta-marrón.

En el medio control M1 (desprovisto de reguladores de crecimiento), no se produjo callo (Fig. 4.65), de manera que los fragmentos de tallos pasaron de ser de color verde a empezarse necrosarse, hasta que las células murieron.

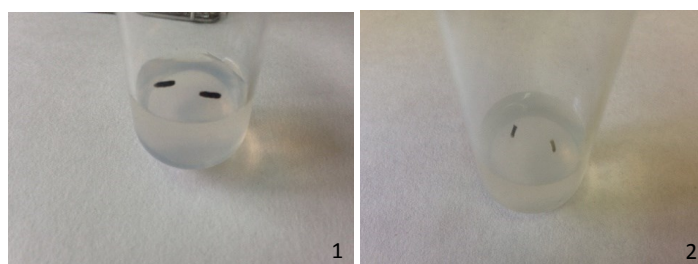


Figura 4.65.- Inducción de callos en medio de cultivo M1 (MS0, sin reguladores de crecimiento): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

La formación de callo, empleando como regulador de crecimiento el 2,4-D, en diferentes concentraciones, se muestra desde la figura 4.66 hasta la figura 4.70. Observamos que a medida que se aumentó la concentración de 2,4-D en el medio de cultivo, se produjo una mayor formación de callos. Dichos callos de consistencia compacta, se caracterizaron por ser de color verde con la presencia de zonas marrones debido probablemente a la oxidación ocasionada por la producción de fenoles.

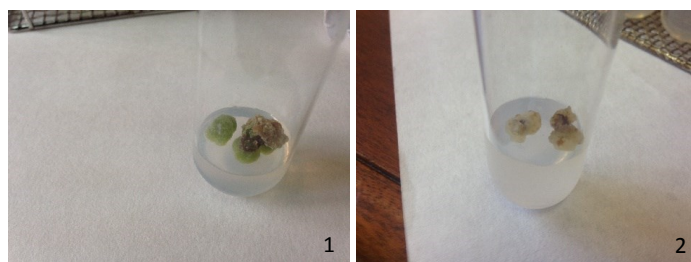


Figura 4.66.- Inducción de callos en medio de cultivo M2 (medio suplementado con 2,4-D 0.5mg/ml): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

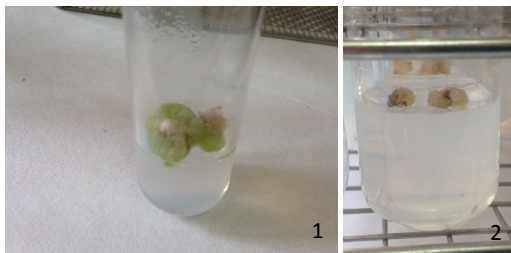


Figura 4.67.- Inducción de callos en medio de cultivo M3 (medio suplementado con 2,4-D 1mg/ml): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

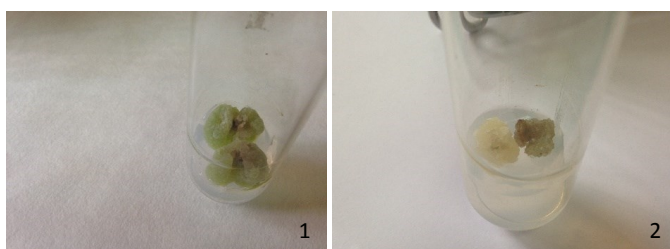


Figura 4.68.- Inducción de callos en medio de cultivo M4 (medio suplementado con 2,4-D 1,5mg/ml): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

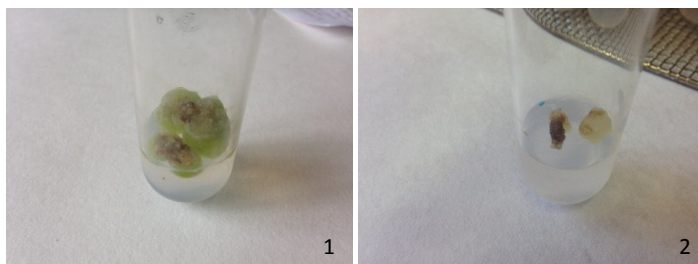


Figura 4.69.- Inducción de callos en medio de cultivo M5 (medio suplementado con 2,4-D 2mg/ml): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

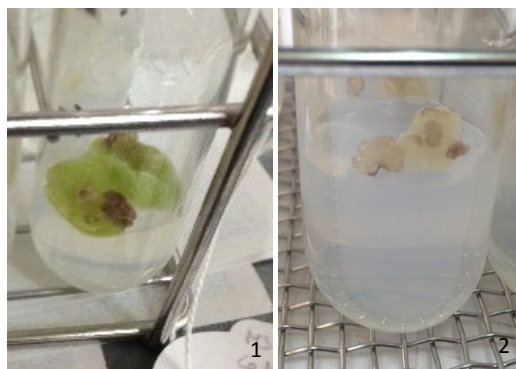


Figura 4.70.- Inducción de callos en medio de cultivo M6 (medio suplementado con 2,4-D 2,5mg/ml): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

El empleo del regulador de crecimiento ANA, para la inducción de callos de *Nepeta teydea*, se muestra en las figuras 4.71, 4.72, 4.73, 4.74 y 4.75. En este caso detectamos que, a concentraciones bajas de ANA, sólo generó pequeños callos en las zonas de cortes (bajo condiciones de fotoperiodo) que no consiguieron sobrevivir (Fig. 4.71.1).

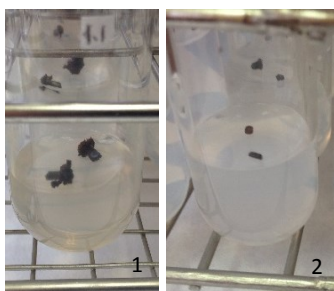


Figura 4.71.- Inducción de callos en medio de cultivo M7 (medio suplementado con ANA 0,5mg/ml): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

Pero cuando se aumenta la concentración de ANA en los medios de cultivos, detectamos que, bajo condiciones de fotoperiodo, se produjo un aumento en la formación de callos con algunas zonas marrones. En condiciones de oscuridad total, observamos que los explantos de tallos dieron lugar a callos de pequeño que exhibieron procesos de organogénesis, observándose la formación de tallos adventicios (Fig. 4.73.2 y Fig. 4.75.2-3) y raíces en el tejido del callo (Fig. 4.72.2).

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

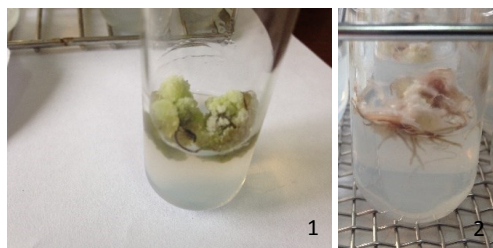


Figura 4.72.- Inducción de callos en medio de cultivo M8 (medio suplementado con ANA 1mg/ml): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

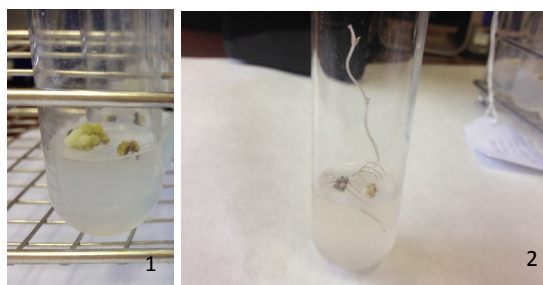
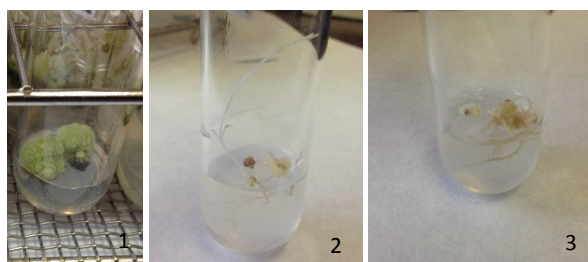


Figura 4.73.- Inducción de callos en medio de cultivo M9 (medio suplementado con ANA 1,5mg/ml): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.



Figura 4.74.- Inducción de callos en medio de cultivo M10 (medio suplementado con ANA 2mg/ml): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 4.75.- Inducción de callos en medio de cultivo M11 (medio suplementado con ANA 2.5mg/ml): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2 y 3) Condiciones de oscuridad total.

Los callos del medio suplementado con 2mg/ml de ANA fueron los únicos que no presentaron zonas marrones en condiciones de fotoperiodo y menor cantidad de raíces en condiciones de oscuridad total (Fig. 4.74).

En cuanto a los medios de cultivos suplementados con el regulador BA (Fig. 4.76- 4.80), detectamos que hubo poca formación de callos, limitándose a las zonas de cortes del explanto y en algunos casos, no se detectó proceso de calogénesis (Fig. 4.79.1 y Fig. 4.80.1) en condiciones de fotoperiodo. Bajo condiciones de oscuridad, en la mayoría de los casos, se apreció la formación de callos con zonas de color marrón, debido probablemente a la oxidación ocasionada por la producción de fenoles. En el caso del medio de cultivo con 0.5mg/ml de ANA, los callos presentaron tallos adventicios (Fig. 4.76.2).

Los callos inducidos con BA se caracterizaron por ser friables, y presentar color amarillento-marrón.

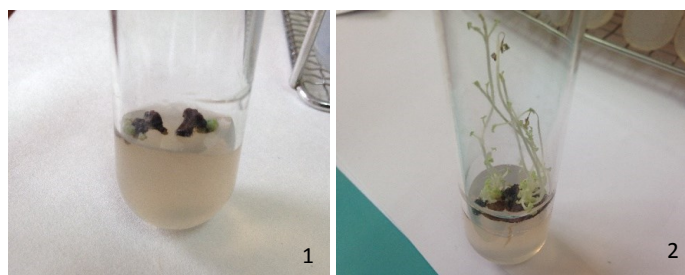
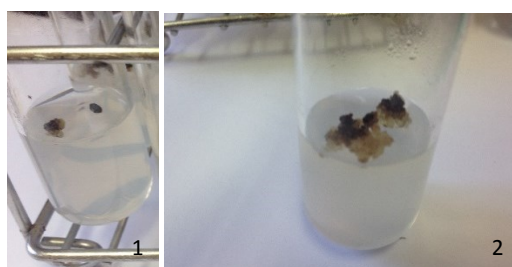


Figura 4.76.- Inducción de callos en medio de cultivo M12 (medio suplementado con BA 0.5mg/ml): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.



Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 4.77.- Inducción de callos en medio de cultivo M13 (medio suplementado con BA 1mg/ml): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

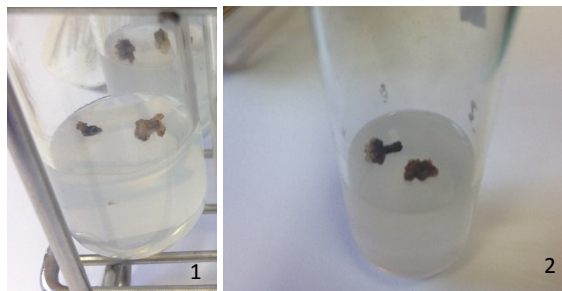


Figura 4.78.- Inducción de callos en medio de cultivo M14 (medio suplementado con BA 1,5mg/ml): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

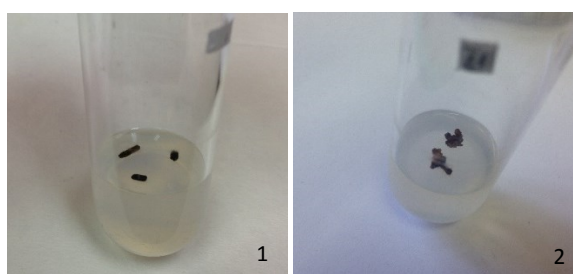


Figura 4.79.- Inducción de callos en medio de cultivo M15 (medio suplementado con BA 2mg/ml): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

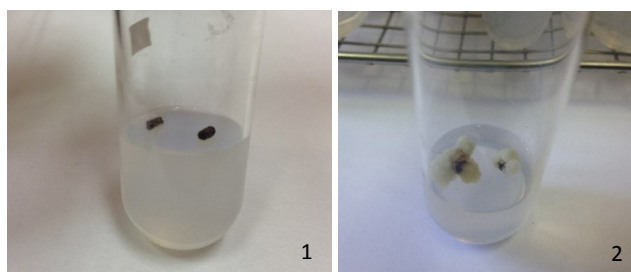


Figura 4.80.- Inducción de callos en medio de cultivo M16 (medio suplementado con BA 2,5mg/ml): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

Cuando se emplearon medios de incubación suplementados con diferentes concentraciones de la combinación de BA y 2,4-D (Fig. 4.81- 4.85), se generaron callos de color verde-amarillentos, en general de tamaño pequeño-medio bajo condiciones de

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

fotoperiodo, mientras que, en condiciones de oscuridad, se produjo la inducción de pequeños callos.

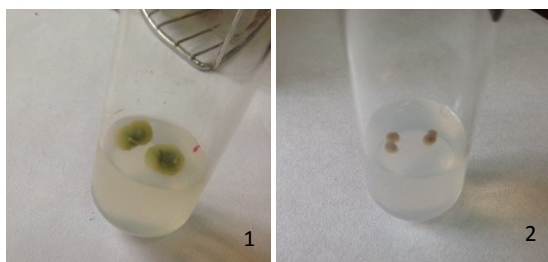


Figura 4.81.- Inducción de callos en medio de cultivo M17 (medio suplementado con BA y 2,4-D (0,5mg/ml)): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

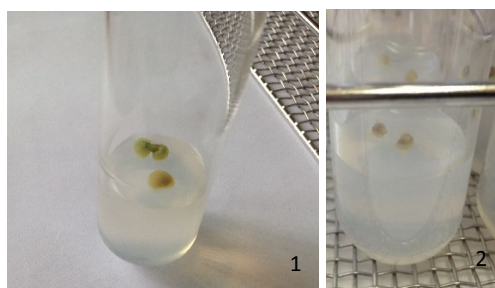


Figura 4.82.- Inducción de callos en medio de cultivo M18 (medio suplementado con BA y 2,4-D (1mg/ml)): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

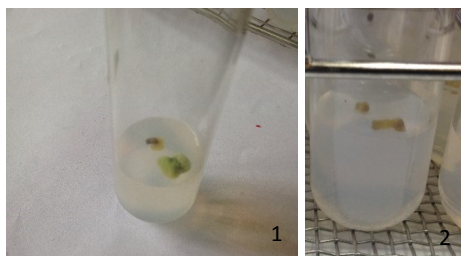


Figura 4.83.- Inducción de callos en medio de cultivo M19 (medio suplementado con BA y 2,4-D (1,5mg/ml)): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

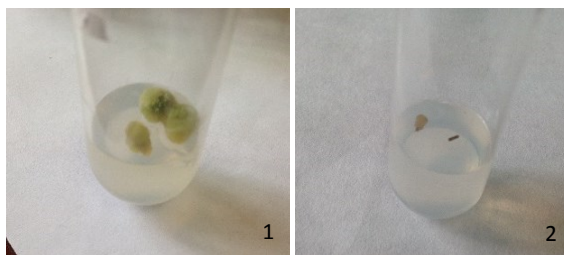


Figura 4.84.- Inducción de callos en medio de cultivo M20 (medio suplementado con BA y 2,4-D (2mg/ml)): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

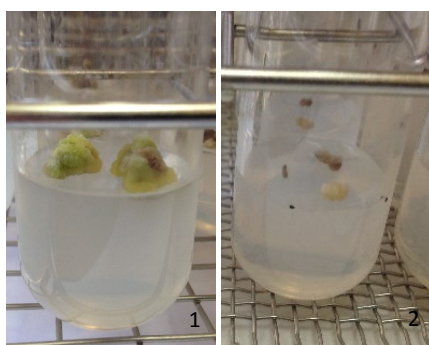


Figura 4.85.- Inducción de callos en medio de cultivo M21 (medio suplementado con BA y 2,4-D (2,5mg/ml)): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

Cuando se empleó medios de cultivo con diferentes concentraciones de la combinación de BA y ANA (Fig. 4.86- 4.90), se obtuvieron callos de color verde intenso con consistencia compacta en condiciones de fotoperiodo, mientras que, en condiciones de oscuridad, se detectó a bajas concentraciones de ambos reguladores de crecimiento (0.5mg/ml) la presencia de callos con tallos adventicios (Fig. 4.86.1), y a alta concentraciones (2.5mg/ml) no se detectó la presencia de callogénesis (Fig. 4.90.2).

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

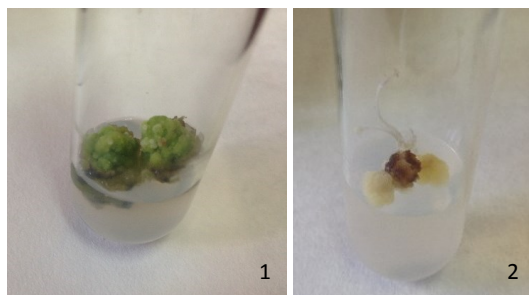


Figura 4.86.- Inducción de callos en medio de cultivo M22 (medio suplementado con BA y ANA (0,5mg/ml)): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

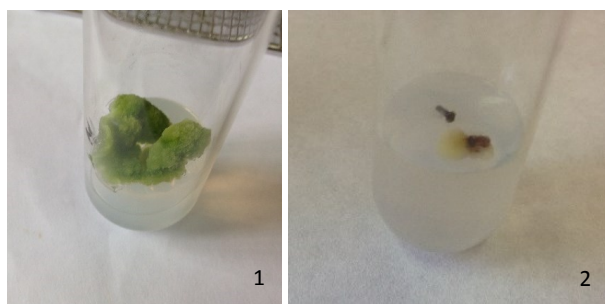


Figura 4.87.- Inducción de callos en medio de cultivo M23 (medio suplementado con BA y ANA (1mg/ml)): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.



Figura 4.88.- Inducción de callos en medio de cultivo M24 (medio suplementado con BA y ANA (1,5mg/ml)): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.



Figura 4.89.- Inducción de callos en medio de cultivo M25 (medio suplementado con BA y ANA (2mg/ml)): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.



Figura 4.90.- Inducción de callos en medio de cultivo M26 (medio suplementado con BA y ANA (2,5mg/ml)): 1) Condiciones de fotoperiodo; 2) Condiciones de oscuridad total.

De manera generalizada, la respuesta callogenética fue mayor en medios suplementados con reguladores hormonales y bajo condiciones de fotoperiodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad), que en el medio carente de hormonas y en condiciones de oscuridad.

IV.3.2.2. FASE DE CULTIVO *IN VITRO* DE CALLOS DE *NEPETA TEYDEA*

Para llevar a cabo la fase de multiplicación de callos de *Nepeta teydea*, se utilizaron los callos obtenidos de medio de inducción M5 (2mg/ml de ANA) (Fig. 4.91.1) y M10 (2mg/ml de 2,4-D) (Fig. 4.91.2). Para evaluar el crecimiento de estos callos en el medio de mantenimiento de callos (medio MS suplementado con ANA (0.2 mg/L) y BA (2mg/L)) (Fig. 4.92.3), se analizó el peso fresco y seco de los callos desarrollados.

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

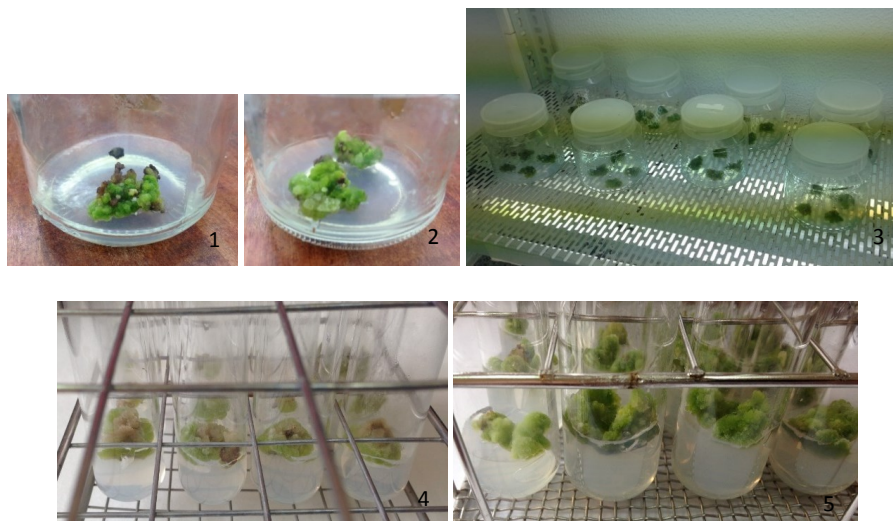


Figura 4.91.- 1) Callos empleados para iniciar el cultivo *in vitro* de callos de *Nepeta teydea*: 1) Callos inducidos con ANA (2mg/ml); 2) Callos inducidos con 2,4-D (2mg/ml); 3) Cultivo *in vitro* de callos de *Nepeta teydea* en el medio MS suplementado con ANA (0.2 mg/L) y BA (2mg/L) dentro de la cámara de incubación en condiciones de fotoperiodo; 4) Cultivo de callos inducidos con 2mg/L de 2,4-D; 5) Cultivo de callos inducidos con 2mg/L de ANA.

En ambas líneas de cultivos de callos de *Nepeta teydea* (Fig. 4.91.4 y Fig. 4.91.5), tanto los inducidos bajo condiciones de oscuridad como bajo fotoperiodo, produjeron una escasa o nula incidencia de procesos morfológicos, con escasa presencia de zonas marrones debido probablemente a la oxidación ocasionada por la producción de fenoles. Esto nos indica que, el medio de mantenimiento utilizado en este trabajo es adecuado para la multiplicación *in vitro* de callos de esta especie vegetal.

IV.4. DISCUSIÓN

IV. 4.1. DISCUSIÓN DE LA MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS DE *NEPETA TEYDEA*

IV.4.1.1. PROTOCOLO DE ESTERILIZACIÓN

La esterilización del material vegetal de partida, constituye una de las etapas más críticas a la hora de comenzar el cultivo *in vitro* de una planta. En nuestro trabajo, las semillas fueron el material de partida para iniciar el cultivo de esta especie, ya que permiten el mantenimiento de una base genética más amplia (Fay, 1992; Benson et al., 2000).

El tratamiento de esterilización de las semillas más efectivo fue, la aplicación de hipoclorito cálcico, seguido muy de cerca del peróxido de hidrógeno. Los mayores porcentajes de contaminación de *Nepeta teydea* se obtuvieron utilizando hipoclorito sódico, un agente desinfectante que se ha utilizado para la esterilización de semillas de otras especies de *Nepeta* como es el caso de *N. rtanjensis*, *N. sibirica*, *N. nervosa* (Nestorović et al., 2010), y en otras especies de la familia como es el caso de *Sideritis stricta* Boiss & Heldr (Yavuz, 2016).

IV.4.1.2. FASE DE GERMINACIÓN

La combinación de los diferentes tratamientos de imbibición con la escarificación química (con ácido sulfúrico) no dió buenos resultados en el porcentaje de germinación, de hecho, en algunos casos la germinación de las semillas fue nula. El tratamiento más eficaz para promover la germinación de semillas de *Nepeta teydea* consistió en la imbibición de las semillas en una solución de GA₃ (3mg/ml) durante 24h en condiciones de fotoperiodo. Estos resultados, concuerdan con las semillas de otras especies de *Nepeta* como son *N. rtanjensis*, *N. sibirica* y *N. nervosa*, donde se indujo la germinación por un tratamiento durante 24h en tratamiento con solución 1mM de GA. (Nestorović et al., 2010).

La germinación de muchas especies es independiente a la luz, y en algunas otras, presentan mayores porcentajes de germinación en condiciones de oscuridad que en condiciones de luz (Gorai et al., 2011). En *Nepeta teydea*, parece que sus semillas son dependientes de la luz, al igual que ocurre con las semillas de *Nepeta rtanjensis* donde

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

el máximo porcentaje de germinación (un 60%) se obtuvo tras 8 días expuestas a la irradiación con luz blanca continua (Todorović et al., 2007). No obstante, las semillas de otras especies de la familia Lamiaceae, como es el caso de *Sideritis Stricta* Boiss & Heldr, se han germinado en condiciones de oscuridad total (Yavuz, 2016).

No obstante, el requerimiento por la luz de *Nepeta teydea* pudo ser sustituido por el uso de giberelina (GA₃), como se observa en el ensayo E₂, con imbibición en una solución de GA₃ (3mg/L) y en condiciones de oscuridad. Este dato, concuerda con los resultados de *Nepeta rtanjensis*, donde el uso de diferentes giberelinas (GA₃, GA₄ y GA₇), que estimularon la germinación en condiciones de oscuridad. De hecho, el máximo porcentaje de germinación se obtuvo con semillas tratadas con 10⁻³mol/L de GA₃ (Todorović et al., 2007).

En nuestro trabajo, conseguimos obtener un porcentaje de germinación de las semillas de *Nepeta teydea* de un 78.3%. Este valor de germinación es alto, si tenemos en cuenta los resultados obtenidos en otras especies de *Nepeta*, como son *N. cataria* L., *N. nuda* L. spp. nuda, *N. parviflora* M. Bieb y *N. ucrania* L. spp. ucrania, en donde además de detectar diferencias significativas en cuanto a sus características germinativas, no se consiguieron obtener porcentajes de germinación superiores al 15%, independientemente de los métodos utilizados o los tratamientos aplicados (diferentes condiciones de iluminación, distintos tratamientos térmicos, etc.) (Padure, 2006).

IV.4.1.3. FASE DE ESTABLECIMIENTO

En nuestro trabajo, se ha establecido como medio de cultivo para la fase de establecimiento de *Nepeta teydea*, un medio ½ MS0, debido a que en el medio MS0 se detectó un mayor porcentaje de hiperhidricidad. Además, el no aportar sustancias reguladoras externas garantiza con mayor seguridad la estabilidad del patrón de desarrollo predeterminado en el material.

El desarrollo de hiperhidricidad en el cultivo *in vitro* ha sido relacionado con el aporte exógeno de citoquininas (Leshem et al., 1988; Ivanova et al., 2006), donde la adición de BA suele promover altos valores de hiperhidricidad. También, elevadas concentraciones de iones amonio han sido también relacionadas con el incremento de la hiperhidricidad en diversas especies (Vieitez et al., 1985).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Este mismo medio utilizado para *Nepeta teydea* (½ MS0) se utilizó para el cultivo *in vitro* de *Salvia brachyodon* (Mišić et al., 2006).

Además, se ha descrito un protocolo de micropropagación para *Nepeta rtanjensis* usando medio MS0 como medio de establecimiento, y su aplicación con ligeras modificaciones (valores de pH diferentes), han permitido también la micropropagación de otras especies de *Nepeta*, como es el caso de *N. rtanjensis*, *N. sibirica*, *N. nervosa* (Nestorović et al., 2010).

Sin embargo, en otros miembros de la familia Lamiaceae como *Mentha piperita* L, se utilizó medio MS suplementado con 2mg/L de IBA, como medio de iniciación (Mehta et al., 2012). También, en el establecimiento de *Lavandula* spp., se ha utilizado el medio MS suplementado con BA sólo o en combinación con auxinas (IAA, IBA y ANA) (Gonçalves & Romano, 2013).

IV.4.1.4. FASE DE MULTIPLICACIÓN

El cultivo *in vitro* de *Nepeta teydea* se llevó a cabo con éxito en todos los ensayos en todos los ensayos realizados, aunque con distintos grados de eficacia en función del tipo de explanto y del tipo de regulador de crecimiento empleado. Se observaron diferencias significativas entre el medio control (sin reguladores hormonales) y los medios suplementados con BA y los medios suplementados con la combinación de BA y ANA, por lo que la adición de estas hormonas al medio ha resultado eficaz para inducir la multiplicación en esta especie.

Para la multiplicación de *Nepeta teydea* se utilizó como material de partida segmentos de tallos uninodales (apicales y basales). Este tipo de explante, se ha utilizado ampliamente en la micropropagación de especies de la familia Lamiaceae, como es el caso de *N. rtanjensis* (Mišić et al., 2004), *Mentha piperita* L (Mehta et al., 2012), *Origanum acutidens* (Yildirin, 2013), *Salvia brachyodon* (Mišić et al., 2006), *Satureja avromanica* Maroofi (Mozafari et al., 2015), etc. En algunos trabajos, los diferentes resultados obtenidos con segmentos basales y apicales, se han relacionado con el estado fisiológico de los brotes en distintas regiones del tallo o debido a la existencia de un gradiente de reguladores de crecimiento (Vieitez et al., 1985; Label et al., 1988).

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Este proceso de multiplicación está condicionado por diferentes factores, entre los que se encuentran, la composición del medio y el tipo de explanto empleado, y la forma de evaluar los resultados obtenidos en esta fase es mediante el cálculo de la tasa de multiplicación.

IV.4.1.4.1. EFECTO DE LA BENCILADENINA SOBRE LA TASA DE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *NEPETA TEYDEA* EN UN MEDIO ½ MS.

Durante la fase de multiplicación de *Nepeta teydea* se emplearon medios de cultivos que contenían diferentes concentraciones de benciladenina (BA). Se ha confirmado que medios suplementados con BA como único regulador de crecimiento, exhibió buenos resultados en la micropropagación de varias especies de la familia Lamiaceae como fueron: *Myrtus communis*, *Calamintha nepeta* L., *Lavandula angustifolia* Mill., *Salvia officinalis* (Pistelli et al., 2013) y *Nepeta nuda ssp* (Nedelkova et al., 2012).

También se ha confirmado que cultivos MS suplementados con otro tipo de citoquinina, como el BAP, promovieron la formación de yemas axilares de *Salvia brachyodon* (Mišić et al., 2006), de *Sideritis stricta* (Yavuz, 2016) y de *Mentha piperita* L. (Mehta et al., 2012).

En la micropropagación de *Lavanda pedunculata*, se observó que altas concentraciones de BA (0.5mg/L) indujo un alto número de pequeñas yemas, debido a que las citoquininas además de promover la proliferación de yemas axilares, también es un inhibidor de la elongación de las yemas (Zuzarte et al., 2010). Sin embargo, en el caso de *Satureja avromanica*, el mayor número de yemas se consiguió con el medio MS suplementado con 2mg/L de BA, y la longitud más larga de los brotes se obtuvo con medios MS suplementados con 5mg/L de BA (Mozafari et al., 2015).

En general, el desarrollo de hiperhidricidad en *Nepeta teydea*, fue más elevado en los medios que contenían reguladores de crecimiento que en el medio control (½ MS0). Observamos que a medida que se incrementó las concentraciones hormonales, se produjo un aumento del porcentaje de hiperhidricidad. Además, esta hiperhidricidad afectó a la multiplicación, ya que todos los tejidos desarrollados presentaban hiperhidricidad, sin que llegasen a formarse en ningún caso brotes sanos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Otro fenómeno que se produce con frecuencia en los cultivos *in vitro* de especies de *Lavandula* como son *L. dentata*, *L. stoechas* y *L. vera*, es la presencia de hiperhidricidad en las yemas de estas plantas (Zuzarte et al., 2010). Aunque son numerosos los factores que pueden inducir la aparición de esta malformación fisiológica, parece que las condiciones artificiales *in vitro*, en especial, la presencia de exceso de citoquininas en el medio de cultivo, es uno de los más importantes promotores de este fenotipo (Zuzarte et al., 2010; Gonçalves & Romano, 2013). De hecho, durante la micropropagación de *Salvia valentina*, yemas de esta planta expuestas a altas concentraciones de BA ocasionalmente exhibieron síntomas de hiperhidricidad (Cuenca & Amo-Marco, 2000).

Sin embargo, en estudios realizados con *Nepeta rtanjensis*, se demostró que la adición de citoquininas al medio de cultivo, no estimuló la producción de yemas axilares en comparación con el medio control. Todo lo contrario, con altas concentraciones de citoquininas, sólo se obtuvieron brotes enanos con raíces rudimentarias (Mišić et al., 2004).

IV.4.1.4.2. EFECTO DE LA BENCILADENINA Y EL ÁCIDO NAFTALENACÉTICO SOBRE LA TASA DE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE *NEPETA TEYDEA* EN UN MEDIO ½ MS.

En la fase de multiplicación de *Nepeta teydea*, también se emplearon medios MS suplementados con una combinación de auxina (ANA) y citoquinina (BA). De hecho, para *Crithmum maritimum* (Pistelli et al., 2013) el mayor número de yemas se obtuvo con un medio MS suplementado ANA y BA.

En plantas de *Origanum acutidens*, el medio con el que se consiguió la máxima generación de yemas, fue el medio MS suplementado con 1.80mg/L de BAP y 0.2mg/l de ANA (Yildirin, 2013). Sin embargo, en *Mentha spicata* L., aunque se observó que el medio de cultivo suplementado con una combinación de ANA (0.5 ppm) y BAP (1ppm), produjo un alto número de yemas, los medios que sólo contenían BAP, mostraron ser los mejores para la multiplicación *in vitro* de esta especie (Paudel & Pant, 2008).

IV.4.1.5. FASE DE ENRAIZAMIENTO

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

En *Nepeta teydea*, no fue necesaria llevar a cabo esta fase, ya que las plantas desarrolladas a partir de explantos nodales, enraizaron espontáneamente en las fases *in vitro* anteriores. Existen especies (especialmente herbáceas), que son capaces de desarrollar el sistema radicular desde las primeras fases del cultivo, mientras en otras, el enraizamiento tiene lugar *ex vitro*, a la vez que el proceso de aclimatación.

El enraizamiento se llevó a cabo con éxito. El medio ensayado ($\frac{1}{2}$ MS) promovió la formación de raíces en ausencia de reguladores. Este enraizamiento espontáneo se ha detectado también en otras plantas de *Nepeta*, como son *N. rtanjensis* (Mišić et al., 2004) y *N. nervosa* (con un 40% de enraizamiento aproximadamente) y *N. sibirica* (30% de enraizamiento) (Nestorović et al., 2010).

También se ha descrito que las plántulas de *Lavandula* spp. son fáciles de enraizar, incluso en medio sin hormona. En muchos trabajos, se ha visto favorecido su enraizamiento, empleando medios que contienen bajas concentración de macronutrientes, como es el $\frac{1}{2}$ MS o el $\frac{1}{4}$ MS (Gonçalves & Romano, 2013).

En otros miembros de la familia Lamiaceae se ha estimulado el enraizamiento con la adición a los medios de reguladores de crecimiento. Así para *Salvia Brachyodon* se utilizaron medios $\frac{1}{2}$ MS suplementados con diferentes tipos de auxinas (entre 0.5-1.7 μ M de AIA, ANA e IBA) (Mišić et al., 2006).

Cuando al medio de cultivo fue suplementado únicamente con ANA, se obtuvo una extensa formación de raíces en plantas de *Mentha spicata* L. (Paudel & Pant, 2008), y en plantas de *Origanum acutidens* (Yildirin, 2013).

En el caso de *Mentha piperita* (Mehta et al., 2012) y de *Sideritis stricta*, el IBA demostró ser la mejor auxina inductora de raíces en la familia Lamiaceae (Yavuz, 2016).

IV.4.1.6. FASE DE PASO A TIERRA Y ACLIMATACIÓN

El proceso de aclimatación de *Nepeta teydea* culminó con éxito, sin que se obtuvieran grandes pérdidas en las plantas destinadas a la aclimatación. Los mismos resultados se han obtenidos en plantas de *Nepeta rtanjensis* aclimatadas en condiciones de invernadero y de campo abierto, con tasas de supervivencia del 99% (Mišić et al., 2004).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

El protocolo de paso a tierra y aclimatación llevado a cabo para plantas *in vitro* de *Nepeta teydea*, coincide en muchos aspectos con el empleado para el caso de otras especies de la familia, como son *Satureja avromanica* Maroofi (Mozafari et al., 2015) y *Salvia brachyodon* (Mišić et al., 2006). En ambos casos, las vitroplantas fueron tratadas con fungicidas antes de pasarlas a tierra, y el sustrato utilizado consistió principalmente en una mezcla de turbas. En el caso de *Satureja avromanica* Maroofi, a la mezcla de turbas se le añadió perlita, con una tasa de supervivencia del 60% (Mozafari et al., 2015).

Las plantas *in vitro* de *Nepeta teydea* pasadas a tierra, estuvieron inicialmente protegidas con una cubierta de plástico, y fueron aclimatadas abriendo gradualmente la cubierta hasta descubrirlas totalmente. La utilización de estas cubiertas de plásticos durante la aclimatación de vitroplantas, ha sido utilizada obteniendo buenos resultados, en plantas de *Salvia brachyodon* (Mišić et al., 2006).

En otras especies de la familia Lamiaceae, se ha descrito que la aclimatación es generalmente simple, con pocos cambios morfológicos y una elevada supervivencia, como ocurre en *Lavandula* spp. (Gonçalves & Romano, 2013), o como en *Sideritis stricta*, donde se consiguió un 90% de plantas aclimatadas (Yavuz, 2016).

IV. 4.2. DISCUSIÓN DE LA MICROPROPAGACIÓN DE CALLOS DE *NEPETA TEYDEA*

IV. 4.2.1. FASE DE INDUCCIÓN DE CALLOS DE *NEPETA TEYDEA*

Diferentes concentraciones y combinaciones de hormonas se usaron en medio MS para la inducción de callos utilizando segmentos de tallos de *Nepeta teydea*. La nula o escasa inducción de callos en el medio de cultivo sin hormonas, M1, es una evidencia que la composición básica del medio de cultivo suplementado con los reguladores de crecimiento empleados (2,4-D, ANA, BA y la combinación entre ellas) favorecieron la proliferación celular en segmentos de tallos de *Nepeta teydea*.

En nuestros ensayos, el empleo de fitohormonas exógenas como el 2,4-D y ANA, indujo la callogénesis, al igual que se sucede con *Salvia hortensis* y *Salvia avromanica* (Kamiri et al., 2014). La influencia de estos reguladores en la formación de callo podría estar relacionada con la capacidad que tienen estos compuestos de estimular la división de las células, e influir indirectamente en la regulación del ciclo celular

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

(Arellano et al., 2008). De hecho, el 2,4-D, es la auxina de mayor empleo y más efectiva para la inducción de callo, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas (George, 2008). En el caso de las dicotiledóneas, las concentraciones de mayor uso de este compuesto para la inducción de callo se encuentran generalmente en el rango de 1.1mg/L a los 3.31mg/L (Machakova et al., 2008).

En algunas especies de la familia Lamiaceae, como en *Satureja avromanica* y en *Satureja avromanica* Maroofi, (Mozafari et al., 2015), se detectó que la presencia de 2,4-D en el medio dio lugar a callogénesis en la mayoría de los explantes.

En nuestro trabajo, el 2,4-D produjo la presencia de callos con la formación de brotes y raíces. El efecto que produce esta hormona en caña de azúcar (*Saccharum* spp.) (Jiménez, 1995), fue también la formación de raíces a bajas concentraciones, mientras que con altas concentraciones de 2,4-D deja de producirse de raíces y se produce la formación de callos.

El uso de ANA en los medios de inducción de callos de *Nepeta teydea*, condujo a un alto porcentaje de explantos con callos. En el caso de *Salvia avromanica*, se detectó un aumento de la formación de callos con el aumento de las concentraciones de ANA en el medio (Kamiri et al., 2014).

Aunque es bien conocido el efecto promotor del BA en la formación de callo en plantas (Alarcón et al., 2006), los medios de cultivos suplementados con diferentes concentraciones de citoquininas, dieron lugar a callos de *Nepeta teydea* friables, de pequeño tamaño. En estudios realizados con *Nepeta nuda* ssp se observó que, sólo cuando se aplicaba altas concentraciones del regulador BA, se indujo la callogénesis (Nedelkova et al., 2012)

En el presente trabajo, con la hormona BA, se observó ennegrecimiento de los explantes. Este resultado concuerda con otros trabajos donde se ha observado que la adición de citoquininas en el medio de cultivo puede oscurecer el color de los callos por la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en el explanto (Matos & Sánchez, 2011).

Pliego & Barceló (2001) recomiendan que, en la fase de inducción de callos en plantas, se utilice una alta concentración de auxina, normalmente 2,4-D o una combinación de auxina-citoquinina. En nuestro trabajo, los resultados obtenidos cuando

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

se empleo de auxinas (2,4-D y ANA) combinadas con citoquinina (BA) en el medio de cultivo, dependieron de la concentración y tipo de combinación auxina/citoquinina empleada. En general los callos inducidos con la combinación ANA y BA, eran compactos de color verde intenso. Esta característica es probablemente debida al efecto de las concentraciones de citocininas que aumentan la síntesis de clorofila en las plantas (George, 1993; Zaffari et al., 1998).

IV. 4.2.2. FASE DE CULTIVO *IN VITRO* DE CALLOS DE *NEPETA TEYDEA*

La utilización de un medio MS suplementados con ANA (0.2mg/L) y BA (2mg/L) para la multiplicación de callos de *Nepeta teydea*, dio lugar a muy buenos resultados. Esta misma composición hormonal del medio se ha empleado con éxito para el cultivo de callos de *Bupleurum salicifolium*, obteniéndose subcultivos estables de esta especie vegetal (Luis et al., 2010).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

IV.5. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón JC, Castaño HI, Corrales LL, Jiménez SL, Díaz A. 2006.** Evaluación de algunas combinaciones de reguladores de crecimiento inductoras de callos en achote (*Bixa Orellana* L), planta activa contra la mordedura de serpientes. *Vitae* 13 (1): 17-23.
- Arellano Y, García E, Vázquez J. 2008.** Estimulación de la síntesis de ADN y de proteínas del ciclo celular por auxinas durante la germinación de maíz. *Agrociencia* 42 (6): 637-644.
- Barcelo CJ, Nicolas RG, Sabater GB, Sánchez TR. 2001.** *Fisiología Vegetal*. Ed. Pirámide. Madrid.
- Benson EE, Danaher JE, Pimbley IM, Anderson CT, Wake JE, Daley S, Adams LK. 2000.** In vitro micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant. *Biodiversity & Conservation* 9: 711-726.
- Bhalla R, Narasimhan K, Swarup S. 2005.** Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. *Plant Cell Rep* 24:562-571.
- Bonga JM, von Aderkas P. 1992.** *In vitro* culture of trees. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- Bonga JM, Durzan DJ. 1982.** *Tissue culture in Forestry*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publisher. The Netherlands.
- Collin HA, Edwards GS. 1998.** *Plant Cell Culture*. BIOS Scientific Publ. Oxford, UK.
- Cuenca S, Arro-Marco JB. 2000.** In vitro propagation of two Spanish species of *Salvia* through bud proliferation. *In vitro Cell Dev Biol- Plant* 36: 225-229.
- Davies PJ. 1995.** *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht, Kluwer Academic. New York, U.S.A.
- Debergh PC, Maene L. 1981.** A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort* 14: 335-345.

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Debergh PC, Read PE.1991:** Micropropagation. In: Micropropagation (Eds: P.C. Debergh & R.H. Zimmerman). Kluwer Acad. Publ. Netherlands. pp: 1-13.
- Debergh P, Zimmerman RH. 1991.** Micropropagation: Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. Boston, London.
- Fiehn O. 2002.** Metabolomics: The link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 48:155-171.
- Fraccioli G, Marani F.1998.** Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal, and H. Koganezawa. Plant virus disease control. (Eds: Hadidi A, Khetarpal RK, Koganezawa H). The American Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp. 346-380.
- Fay M. 1992.** Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 28: 1-4.
- Fossard 1977.** (sacado del pierik 1976.). De: Tissue cultura for plant propagators. Univ. New England Printery, Armidale, Australia 1- 409.
- George EF. 1993.** Plant propagation by tissue culture. The thechnology. Exegetics Ltd. England.
- George EF, Hall MA, De Klerk, GJ. 2008.** Plant Propagation by Tissue Culture. Vol I. 3rd Ed. The Background Springer Verlag. Dordrecht, Netherlands.
- Gonçalves S, Romano A. 2013.** In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 31: 166-174.
- Gorai M, Gasmi H, Neffati M. 2011.** Factors influencing seed germination of medicinal plant *Salvia aegyptiaca* L. (Lamiaceae). *Saudi Journal of Biological Sciences* 18: 255-260.
- Halperin, 1969.** (sacado del pierik 1976). *Ann Rev Plant Physiol* 20: 395-418
- Howell SH. 1998.** Molecular Genetics of Plant Development. Ed. Cambridge, UK.
- Howell SH, Lall S, Che P. 2003.** Cytokinins ans shoot development. *Trends Plant Sci* 8: 453-459.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Ivanova M, Novák O, Strnad M, van Staden J. 2006.** Endogenous cytokininin shoots of *Aloe polyphylla* cultured in vitro in relation of hiperhydricity, exogenous cytokinis and gelling agents. *Plant Growth Regulation* 50: 219-230.
- Jiménez G.** 1998. Cultivos de ápices y meristemos. En: *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología* (Ed: Pérez Ponce). Santa Clara, Cuba. pp. 45-46
- Karuppusamy S. 2009.** A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research* 3:1222-1239.
- Kamiri N, Ghampour HR, Yari M. 2014.** Effect of different growth regulators on callus induction and plant regeneration of *Satureja* species. *Annual Research & Review in Biology* 4 (16): 2646-2654.
- Kozai T, Kubota C, Jeong BR. (1997).** Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell Tiss Org Cult* 541:49-56.
- Label P, Maldiney R, Sossountzov L, Cornu D, Migianic E. 1988.** Endogenous levels of abscisic acid, índole-3-acetic acid and benzyladenine during in vitro bud growth induction of wild cherry (*Prunus avium* L.) *Plant Growth Regulation* 7: 171-180.
- Leshem B, Shaley DP, Izhar S. 1988.** Cytokinin as an inducer of vitrification in melón. *Annals of Botany* 61: 225-260.
- Luis JC, Valdés GF, Frías I. 2010.** Síntesis de lignanos mediante peroxidasas aisladas de callos de *Bupleurum salicifolium*. *Majorensis* 6: 10-15.
- Machakova I, Zazimalova E, George EF. 2008.** *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3Ed. Springer. (Eds: George EF, Hall MA, De Klerl G). The Netherlands.
- Matos AA, Sánchez A. 2011.** Evaluación de reguladores de crecimiento para la inducción de callo en *Aloe vera* L. *Multiciencias* 11 (1): 7-14.
- Mehta J, Naruka R, Sain M, Dwivedi, A, Sharma D, Mirza J. 2012.** An efficient protocol for clonal micropropagation of *Mentha piperita* L (Pipperment). *Asian J Plant Sci Res* 2 (4): 518-523.

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Mišić D, Ghalawenji NA, Grubišić DV. 2004.** Micropropagation and reintroduction of *Nepeta rnanjensis*, an endemic and critically endangered perennial of Serbia. *Phyton* (Horn, Austria) 45: 9-20.
- Mišić D, Grubišić D, Konjević R. 2006.** Micropropagation of *Salvia brachyodon* through nodal explants. *Biologia Plantarum* 50 (3): 473-476.
- Mozafari AA, Vafae Y, Karami E. 2015.** In vitro propagation and conservation of *Satureja avromanica* Maroofti- an indigenous threatened medicinal plant of Iran. *Physiol MOL Biol Plants* 21 (3): 433-439.
- Muñoz de Malajovich MA. 2016.** Biotecnología. 2ª Ed. Universidad Nacional de Quilmes. Argentina.
- Murashige T, Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nedelkova YY, Dimitrova MA, Yordanova ZP, Kapchina-Toteva VM. 2012.** Micropropagation of *Nepeta nuda* ssp. *nuda* (Lamiaceae). Influence of auxins and cytokinins. *Acta Hort* 955: 269-274.
- Nestorović J, Mišić D, Šiler B, Soković M, Glamočlija J, Ćirić A, Maksimović V, Grubišić D. 2010.** Nepetalactone content in shoot cultures of three endemic *Nepeta* species and the evaluation of their antimicrobial activity. *Fitoterapia* 81: 621-626.
- Padure IM. 2006.** Seed germination and morpho-anatomical studies of the seedlings in genus *Nepeta* L. (*Lamiaceae*, *Nepetoideae*) in Romania. *Acta Bot Horti Buc* 33: 63-70.
- Paudel BR, Pant B. 2008.** Micropropagation of *Mentha spicata* L. Medicinal Plants in Nepal: An Anthology of Contemporary Research. (Eds: Jha PK, Karmacharya, SB, Chettri MK, Thapa CB, Shrestha BB). Kathmandu, Nepal. Pp. 101-106.
- Pérez-Clemente RM, Perez-Sanjuan A, García-Ferriz L, Beltran JP, Canas LA. 2004.** Transgenic peach plants (*Prunus persica* L.) produced by genetic transformation of embryo sections using the green fluorescent protein (GFP) as an in vivo marker. *Mol Breed* 14:419-427.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Pérez RM. 2000.** Cryostorage of *Citrus* embryogenic cultures. In: Jain S.M. Gupta, P.K, Newton, R.J. (Kluwer Academic Publishers (eds.)). The Netherlands. pp. 687-705.
- Pérez- Francés J F. 2006.** Cultivo *in vitro* de plantas y sus aplicaciones en agricultura. Ed. ARTE Comunicación Visual S. L. Santa Cruz de Tenerife.
- Pierik RML. 1990.** *Cultivo in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Pierik RML. 1997.** *In vitro* culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Pistelli L, Noccioli C, D'Angiolillo F, Pistelli L. 2013.** Composition of volatile in micropropagated and field grown aromatic plants from Tuscany Islands. ABP 60: 43-50.
- Pliego F, Barceló A. 2001.** Morfogénesis *in vitro*. En: Introducción a la Biotecnología Vegetal. Métodos y aplicaciones. (Eds: Caballero JL, Valpuesta V, Muñoz J). Córdoba, España. pp. 233-242.
- Sajc L, Grubisic D, Vunjak-Novakovic G. 2000.** Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. Biochem Eng J 4:89-99.
- Segura J. 2000.** Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. (Eds. Azcón-Bieto J & Talón M). McGraw-Hill. Interamericana. Madrid. pp: 285-303.
- Segura J. 2000a.** Citoquininas. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal (Eds. Azcón-Bieto J & Talón M). McGraw-Hill, Interamericana, Madrid. pp: 343-360.
- Sharrock RA, Quail PH. 1989.** Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. Genes Dev 3:1745-1757.
- Talón M. 2000.** Giberelinas. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal (Eds. Azcón-Bieto J & Talón M). McGraw-Hill. Interamericana. Madrid. pp:325-341.

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Tanji KK. 2002.** Salinity in the soil environment. In: Salinity: environment-plantmolecules. (Eds: Läuchli A, Lüttge U). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp. 21-52.
- Teasdale RD. 1987.** Micronutrients. In: Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. I. (Eds: Bonga JM & Durzan DJ). Martinus Nijhoff Publ. Dordrecht. pp: 17-49.
- Theorell H. 1942.** The preparation and some properties of crystalline horseradish peroxidase. Arkiv Kem Mineral Geol, 16A, No 2:1-11.
- Todorović S, Živković S, Giba Z, Grubišić D. 2007.** Basic seed germination characteristics of the endemic species *Nepeta rtanjensis* (Lamiaceae). Plant Species Biology 22: 205-210.
- Van Bragt J, Pierik RLM. 1971.** The effect of autoclaving on the gibberellin A3. In: Effects of sterilization on components in nutrient media. (Eds: Van Bragt J, Mossel DAA, Pierik RLM, Veldstra H). Wageningen, The Netherlands. pp.133-137.
- Van Huylenbroeck JM, Debergh, PC. 1996.** Physiological aspects in acclimatization of micropropagated plantlets. Plant Tiss Cult and Biotech 2 (3): 136-141.
- Vieitez AM, San José MC, Vieitez E. 1985.** In vitro plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L. J Horticultural Science 60: 99-106.
- Yavuz DO. 2016.** Optimization of regeneration conditions and *in vitro* propagation of *Sideritis stricta* Boiss & Heldr. International Journal of Biological Macromolecules 90: 59-62.
- Yildirin MU. 2013.** Micropropagation of *Origanum acutidens* (HAND-MAZZ.) IETSWAART using stem node explants. The Scientific World Journal 201: 1-3
- Zaffari GR, Peres LEP, Kerbauy GB. 1998.** Endogenous levels of cytokinins, IAA, ABA and pigments in variegated somaclones of micropropagated banana leaves. J Plant Growth Regularion 17: 59-61.
- Zuzarte MR, Dinis AM, Cavaleiro C, Salgueiro LR, Canhoto RM. 2010.** Trichomes, essential oils and in vitro propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). Industrial Crops and Products 32: 580-587.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

ESTUDIO HISTOLÓGICO

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

V. ESTUDIO HISTOLOGICO

V.1. INTRODUCCIÓN

V.1.1. HISTOLOGÍA. GENERALIDADES

La histología es la ciencia que estudia a nivel microscópico la anatomía de los seres vivos. Esta disciplina no se detiene sólo en el estudio de los diferentes tejidos y órganos, sino que también se centra en la forma, tamaño y peculiaridades de las distintas células que conforman un organismo.

El desarrollo de las herramientas de investigación como son las diferentes técnicas de microscopía, la histoquímica, la citoquímica, etc., ha permitido grandes avances en el conocimiento histológico, permitiendo de esta manera, mejorar el conocimiento morfológico y anatómico de las muestras. Además, permite determinar la composición química de las mismas, al poder estudiar las enzimas, iones, proteínas, hidratos de carbono, grasas, etc.

En nuestro campo de investigación, la fisiología vegetal, el estudio histológico nos permite tanto estudiar los aspectos morfológicos o microanatómicos de nuestras muestras vegetales, como correlacionar las estructuras de las mismas, con sus funciones. Así, el conocimiento anatómico de las plantas, nos permite entender y evaluar las respuestas fisiológicas que manifiestan frente a diferentes condiciones (*in vitro*, *in vivo*, o estrés).

V.1.2. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS Y MICROSCOPIA

Para llevar a cabo un proceso histológico, es necesario el uso de las técnicas histológicas, que consisten en una serie de procesos a los que se someten las muestras biológicas, con el fin de posibilitar su estudio al microscopio (óptico o electrónico) (Alemán et al., 2007).

El proceso histológico (Fig. 3.1) comienza con la obtención del tejido objeto de estudio que, en el caso concreto de los tejidos vegetales, se realiza directamente tomando muestras de los distintos órganos que componen el cuerpo de la planta. Luego, las muestras son habitualmente fijadas con unas soluciones líquidas denominadas fijadores, que permiten mantener las estructuras celulares y moleculares inalterables durante el procesamiento posterior, conservando una organización lo más parecida posible a como se encontraban en condiciones *in vivo*. Cuando la fijación química o los

151

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

procesos histológicos posteriores pueden alterar las características de la muestra se puede realizar una fijación por congelación rápida.

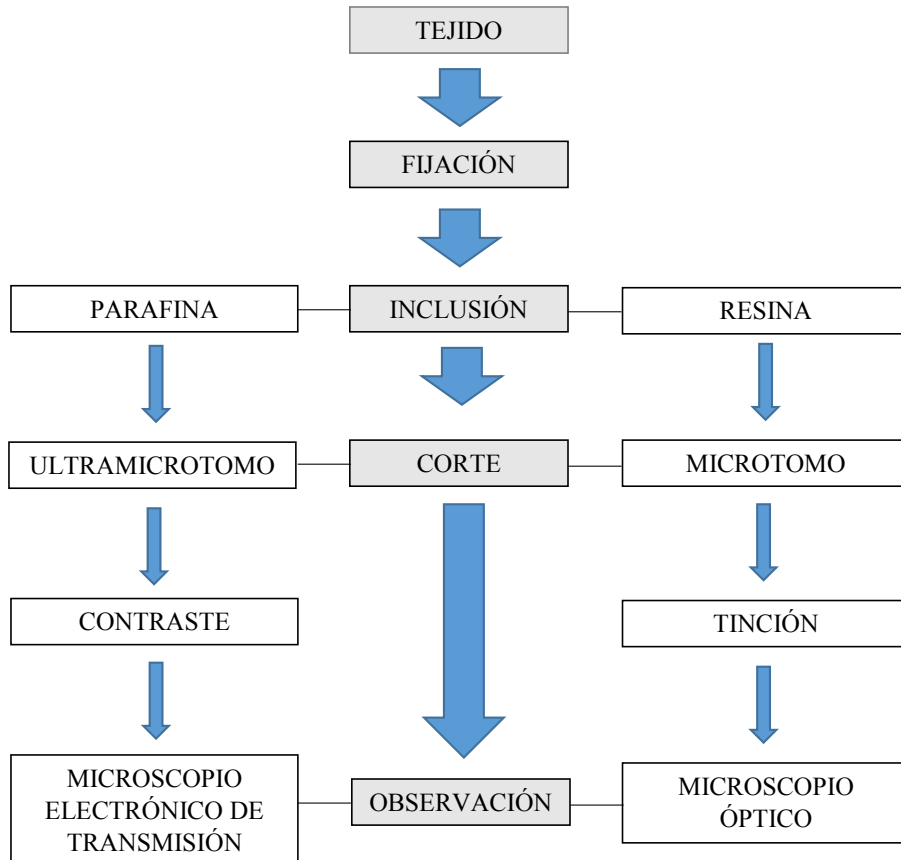


Figura 3.1.- Esquema del proceso histológico.

Normalmente, tras la fijación se procede a incluir el tejido para posteriormente obtener secciones. Cuanto más delgada queramos que sea nuestra sección más tenemos que endurecer nuestra muestra. Esto se consigue embebiendo el tejido con sustancias que polimerizan (resinas) o se vuelven consistentes (ceras como la parafina). Los medios de inclusión no son normalmente hidrosolubles por lo que hay que sustituir el agua de los tejidos por solventes orgánicos liposolubles y posteriormente sustituirlos por el medio de inclusión.

Tras la inclusión, se procede a cortar los tejidos, es decir, obtener secciones, y para ello, existen diferentes aparatos de corte, que permiten conseguir secciones

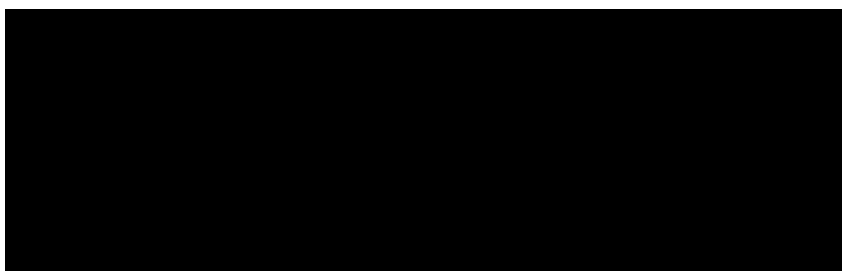
Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

ultrafinas (del orden de nanómetros), semifinas (de 0.5 a 2µm), finas (entre unas 3 y 10 µm) y gruesas (mayores de 10 µm). Habitualmente, para poderlas observar y estudiar, las secciones se tiñen con colorantes que son hidrosolubles, por lo que hay que eliminar el medio de inclusión para que los colorantes puedan unirse al tejido. Aunque las secciones ultrafinas se pueden contrastar con metales pesados y las semifinas con colorantes sin necesidad de eliminar el medio de inclusión. Finalmente, los tejidos procesados se observan al microscopio óptico o electrónico, para su análisis y estudio (Ross & Pawlina, 2012).

V.1.3. TEJIDOS FUNDAMENTALES DE LAS PLANTAS Y ADAPTACIONES AL AMBIENTE

Los tejidos de las plantas vasculares, se agrupan atendiendo a la función que realizan, en cinco tipos: meristemáticos, protectores, parenquimáticos, mecánicos o de sostén y vasculares (Tabla 3.1).

Tabla 3.1.- Clasificación de los distintos tipos de tejidos vegetales y su función.



V.1.3.1. Tejidos meristemáticos.

Los meristemas son tejidos embrionarios responsables del crecimiento de las plantas y están presentes durante toda su vida. Sus células totipotentes, están continuamente dividiéndose y se diferencian para dar lugar a los elementos de los distintos tejidos de la planta.

Los meristemas se pueden clasificar en meristemas primarios o secundarios. Los primarios son los responsables del crecimiento en longitud de la planta y, según su posición, se dividen en: apicales (situados en el ápice del tallo y de la raíz principal) e intercalares (localizados en la base de los entrenudos de las ramas y en la vaina de las hojas). Por otro lado, están los secundarios o laterales, que son los responsables del

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

aumento de diámetro de los tallos y raíces, y se dividen en: cambium vascular (que conduce a la formación de los tejidos conductores secundarios) y cambium suberoso o felógeno (que origina la peridermis) (Megías et al., 2017).

El cambium vascular, se encuentra localizado entre el xilema y el floema secundario, y puede tener forma cilíndrica (en tallos y raíces) o encontrarse formando haces (Buvat, 1989).

V.1.3.2. Tejidos protectores.

La epidermis es la capa celular más externa de las hojas, tallos, raíces (excepto en la caliptra), verticilos florales, frutos y semillas. Entre sus múltiples funciones destaca su papel en la defensa de la planta frente a agentes bióticos y abióticos, en la regulación de la transpiración y del intercambio de gases a través de los estomas de las hojas y en la acumulación de sustancias que posteriormente serán secretadas. En el caso concreto de la raíz, la epidermis se encarga de la absorción del agua y las sustancias minerales presentes en el suelo (Cortés, 1986).

Normalmente, la epidermis está constituida por una única capa de células, aunque puede ser estratificada, característica que se considera una adaptación xerofítica (Roberts, 1990). Las células epidérmicas pueden mostrar una amplia gama de formas y tamaños dependiendo del medio ambiente donde viva la planta. Por lo general, se trata de células alargadas, con pared celular primaria de grosor variable con plasmodesmos, plastidios no clorofílicos, y una gran vacuola (Cortés, 1986).

En la pared externa de las células epidérmicas de las plantas se deposita una sustancia lipídica impermeable que constituye la cutícula. El espesor de esta capa varía dependiendo de las condiciones medioambientales, siendo más gruesa en plantas de climas secos. Además, sobre ella es posible que se depositen otras sustancias como son, resinas, ceras, aceites, etc. (Cortés, 1986).

En la epidermis de hojas y tallos, se encuentran localizados los estomas, que están formados por dos células oclusivas que dejan en medio un ostiolo, y que están rodeadas por dos o más células, denominadas células anexas, conociéndose todo este conjunto con el nombre de complejo estomático. Los estomas se clasifican en función del número y disposición de las células anexas en anomocíticos, anisocíticos, diacíticos y paracíticos. En función de las células oclusivas, pueden encontrarse al mismo nivel

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

que el resto de las células epidérmicas, sobresalir o quedar hundidos (Cortés, 1986). Por debajo del estoma, se encuentra la cámara subestomática, que se comunica con todo los espacios intercelulares subyacentes (Cutler et al., 2007).

En la epidermis se encuentran también tricomas o pelos vegetales, que se originan a partir de células epidérmicas. Existen numerosas clasificaciones de tricomas dependiendo de su morfología, y del número de células que los constituyen (unicelulares o pluricelulares), por lo que se considera un carácter taxonómico de gran utilidad (Moon et al., 2009). Pueden actuar como estructuras glandulares (tricomas glandulares, con secreción de diversos tipos) y también sirven de protección a la planta frente a una excesiva iluminación, cambios de temperaturas y una excesiva evaporación (tricomas no glandulares) (Kofidis & Bosabalidis, 2008).

También se consideran tejidos protectores, la hipodermis y la endodermis. La hipodermis constituye una o varias capas de células situadas inmediatamente debajo de la epidermis de los órganos aéreos de algunas plantas, y que proviene de la diferenciación de la zona más externa del parénquima. La endodermis, constituye la capa más interna de la corteza en las raíces y algunos tallos. Se trata de una única capa de células con aspecto epidérmico, con grandes vacuolas y cuyas paredes celulares se caracterizan por presentar un engrosamiento parcial, debido a depósitos de suberina y lignina (Buvat, 1989), la denominada Banda de Caspari.

V.1.3.3. Tejidos parenquimáticos.

El parénquima es un tejido poco diferenciado y especializado, que constituye la parte más voluminosa de los órganos esenciales de las plantas vasculares. En él quedan confinadas las principales funciones del vegetal; fotosíntesis, elaboración y almacenamiento de sustancias y procesos de secreción y excreción entre otras (Esau & Eichhorn, 2007). Las células parenquimáticas que se encargan de realizar la fotosíntesis, se caracterizan por contener gran cantidad de cloroplastos. Este tejido fotosintético, se denomina clorénquima, y se encuentra localizado en las hojas y en tallos verdes de la planta (Cortés, 1986), pudiendo adquirir dos formas: en empalizada (formado por células prismáticas alargadas) y esponjoso o lagunar.

Entre las diferentes sustancias almacenadas en este tejido destaca el almidón, aunque también puede contener proteínas, lípidos y azúcares disueltos. Con menos

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

frecuencia pueden acumularse taninos, derivados fenólicos y sustancias minerales cristalizadas (Gritsch & Murphy, 2005).

Dada la multitud de funciones que realiza el parénquima, sus células muestran formas variables (preferentemente prismáticas). La mayoría de las células parenquimáticas, muestran paredes primarias delgadas, aunque existen excepciones, como el parénquima del xilema secundario, que pueden estar lignificadas (Gritsch & Murphy, 2005; Cortés, 1986).

Además, el hecho de que las células parenquimáticas conserven su capacidad para dividirse, incluso cuando son células maduras, le confiere a este tejido un papel importante en la regeneración de heridas (Steward et al., 1970).

V.1.3.4. Tejidos mecánicos o de sostén: colénquima y esclerénquima

Los principales tejidos de sostén son el colénquima y el esclerénquima. El colénquima, se encuentra en los órganos en vía de crecimiento (hojas, tallos, peciolos, etc.), o en órganos maduros de plantas herbáceas. Está constituido por células vivas, más o menos alargadas, con paredes desigualmente engrosadas, y con un número variable de cloroplastos. Este tejido se ha clasificado en función del tipo de engrosamiento de sus paredes celulares en: angular, lagunar y laminar. Las características de su pared le confieren resistencia mecánica, y al no contener lignina, se trata de paredes extensibles, que se amoldan al crecimiento del órgano en el que se encuentra (Cortés, 1986).

El colénquima puede desarrollarse inmediatamente subyacente a la epidermis, o más profundamente. En los tallos, puede formar un círculo completo, o bien bandas longitudinales, mientras que, en las hojas, aparece a ambos lados de las venas y a lo largo de los márgenes del limbo (Paiva & Machado, 2003).

A medida que los órganos crecen en grosor y envejecen, las células se endurecen y la pared adquiere gran resistencia pasando a formar esclerénquima. En las células del esclerénquima, las paredes celulares son duras y lignificadas, y carecen de protoplasma vivo, encontrándose principalmente en órganos adultos que han dejado de crecer. Su desarrollo está controlado por factores hormonales (Esau & Eichhorn, 2007).

En el esclerénquima se pueden distinguir dos tipos celulares: las esclereidas o células pétreas y las fibras. Las esclereidas tienen forma muy variable y presentan

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

paredes gruesas normalmente muy lignificadas y con abundantes poros. Pueden encontrarse aisladas o formando grupos, en el córtex y médula del tallo, en el mesófilo de la hoja, en el peciolo, en la pulpa de los frutos, en la raíz o en las semillas (Cortés, 1986). Las fibras poseen forma alargada, fusiforme y puntiaguda, con luz celular muy reducida; y su citoplasma termina por perderse. Son muy elásticas y poco deformables, lo que les permite soportar considerables flexiones. Se encuentran en todos los órganos de la planta y asociados a diferentes tejidos. Según su localización se distinguen en: extraxilares (localizadas fuera del xilema, en el floema o en haces dispersos por el parénquima) y del xilema (localizadas en el xilema) (Gokul et al., 1996).

V.1.3.5. Tejidos vasculares: xilema y floema.

Los tejidos vasculares constituyen el sistema a través del cual discurren el agua, sustancias disueltas, y los productos elaborados que se distribuyen por toda la planta. Está constituido por el xilema y el floema (Cortés, 1986).

El xilema se encarga del transporte de agua y solutos inorgánicos y orgánicos disueltos desde las raíces a la parte aérea (Cutler et al., 2007). En él, se distinguen cuatro tipos de células: las traqueidas, los elementos de los vasos, las células parenquimáticas y las fibras del esclerénquima. Los dos primeros tipos celulares, son los conductores y en conjunto se denominan elementos traqueales. Estos son alargados, con gruesas paredes celulares y sin contenido protoplásmico en la madurez (Cortés, 1986).

El floema es el encargado de transportar sustancias sintetizadas por la propia planta, desde las hojas a los tallos y las raíces (Cutler et al., 2007). Está formado por: elementos cribosos, células acompañantes, células parenquimáticas y fibras liberianas.

V.1.3.6. Xeromorfismo vs Escleromorfismo

Las plantas han desarrollado diversos mecanismos de adaptación, que están directamente vinculados a las condiciones del ambiente en el que habitan. Estas adaptaciones, implican modificaciones morfológicas o anatómica y fisiológicas, que le permiten a la planta sobrevivir y completar su ciclo de vida en el entorno en el que se encuentra.

Las especies vegetales que viven en ambientes secos caracterizados por escasas precipitaciones (desiertos o semi-desiertos), o en ambientes fríos en los que la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

disponibilidad del agua por la planta se ve reducida porque el agua se encuentra congelada (zonas de alta montaña), presentan características xeromórficas, tales como: disminución del área foliar, cutícula gruesa, paredes celulares engrosadas, estomas hundidos por debajo de la superficie epidérmica, reducción del tamaño del poro estomático, incremento del número de tricomas, aumento de células mecánicas y lignificación de las paredes, acumulación de mucílago, y aumento de la capacidad para almacenar agua. Todas estas adaptaciones xeromórficas permiten a las plantas tolerar mejor la deshidratación y el estrés hídrico (Dickinson, 2000).

Las plantas que viven en suelos con baja fertilidad, es decir, que presentan bajos niveles de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, presentan características escleromórficas (Hill, 1998; Schimper, 1903), como son: aumento de la lignificación, engrosamiento y cutinización de la pared externa de las células epidérmicas, aumento de la densidad estomática, estomas hundidos por debajo de la superficie epidérmica o encriptados, existencia de hipodermis bajo la epidermis, aumento de la lignificación y del tamaño de los haces vasculares, desarrollo del esclerénquima y aumento del parénquima en empalizada (Dickinson, 2000).

Las plantas xerofitas y las plantas esclerófilas presentan características muy similares, por lo que resulta muy complicado determinar si una determinada adaptación es debida a condiciones de limitada disponibilidad de agua o a la escasa presencia de nutrientes en el suelo.

V.1.4. HISTOLOGÍA DE LA FAMILIA LAMIACEAE

V.1.4.1. HISTOLOGÍA DE LA HOJA EN LA FAMILIA LAMIACEAE

Las hojas de las especies de la familia Lamiaceae, son usualmente dorsiventrales, pero se ha observado muchos ejemplos de hoja tipo isobilateral, como es el caso de *Satureja Hortensio* L., *Ziziphora clinopodioides* y *Ziziphora tenuior* (Hatamnei et al., 2008). Las hojas pueden ser persistentes o caducas, especialmente en hábitats secos. Rudal (1980) señaló la importancia taxonómica de la anatomía de la hoja en la xeromórfica subtribu Hyptidinae, al mostrar sus especies, hojas con muchas variaciones.

Las células de la epidermis pueden ser de suaves a papilosas (*Bystropogon*), y puede tener paredes anticlinales desde onduladas a rectas. Una hipodermis de células

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

grandes se observó debajo de la epidermis adaxial de hojas de *Rosmarinus* (Nepetoideae). La presencia o ausencia de hipodermis ayudó a caracterizar dos secciones de *Hyptis*, donde algunas especies muestran muchas similitudes macromorfológicas.

Cantino (1990) estudió la existencia de once tipos diferentes de tricomas en la familia Lamiaceae basándose en el número de células de la cabeza, pudiendo ser una o muchas, y la presencia o ausencia de paredes tangenciales y paredes radiales terciarias o parciales. Determinó además que los tricomas glandulares multicelulares se presentan frecuentemente en la superficie abaxial de numerosos miembros de la familia. El tricoma más complejo se observó sólo en especies de Symphorematoideae, Viticoideae y Ajugoideae y está constituido por una cabeza formada por muchas células y con forma de escama.

Los pelos no glandulares, pueden ser unicelulares o multicelulares, simples y uniseriados o ramificados con diferentes formas. Los pelos unicelulares, están generalizados en toda la familia, y casi siempre acompañados por pelos multicelulares. Esta característica distingue a las Labiadas de la mayoría de las Verbenaceae, en las que casi todos los géneros están caracterizados por poseer sólo pelos unicelulares. Aunque, las Prostantheroideae (especies de la tribu Westringieae), sólo presentan tricomas unicelulares (excepto en muy pocos casos). Mientras que los miembros de la tribu Chloantheae, se caracterizan por poseer pelos multicelulares ramificados, los cuales son característicos de muchos miembros de Symphorematoidea, encontrándose especialmente en las bractéolas donde aparecen estrellados. También existen tricomas ramificados en varios géneros de Lamioideae (*Comanthosphace*, *Rostrinucula*, *Leucosceptrum*, *Gomphostemma*, *Phlomis* y *Marrubium*), dos especies de *Scutellaria* (Scutellarioideae), Nepetoideae, en la tribu Mentheae, en las subtribus Salviinae: *Zhumeria*, *Meriandra*, *Perovskia*, *Rosmarinus*, *Lepechinia*, *Chaunostoma* y en varias especies de *Salvia* y en la tribu Ocimeae, mientras que en Ajugoideae parecen estar restringidos a unas pocas especies del género *Teucrium*. En la subtribu Nepetoideae, los pelos ramificados se encuentran en una sección de *Nepeta*, y en Menthinae.

En la familia Labiaceae se han encontrado 10 tipos diferentes de tricomas (Cantino, 1990), siendo los más frecuentes los anomocíticos y diacíticos. Observándose además estomas dialelocíticos (subfamilia Neotoideae), anisocíticos (Prostantheroideae), paracíticos (*Prostanthera*, *Trichostema*, *Oxera*, y miembros de

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Symphorematoideae y *Petraeovitex*). El resto de tipo de estomas tiende a aparecer con menos frecuencia o muestran poca correlación con la taxonomía.

La distribución de los estomas en la hoja puede variar extremadamente, siendo la superficie abaxial la que presenta mayor densidad estomática, estando en algunas especies restringidos los estomas a esta superficie. Además, los estomas pueden estar hundidos en la epidermis, algunas veces rodeado de pelos o glándulas, o elevados por encima de la superficie epidérmica en especies hirsutas.

La cutícula de la hoja puede estar engrosada, especialmente en especies que viven en hábitats más xéricos. Rudall (1980) observó patrones de estriación característicos en las cutículas foliares de algunas especies de Hyptidinae, y señaló la variación en los patrones cuticulares entre diferentes poblaciones de *Eriope hypenoides* Mart. Ex Benth. (Nepetoideae: Ocimeae).

En cuanto al mesófilo, en *Vitex* (Viticoideae) está compuesto por un tejido empalizado compacto, una condición aparentemente similar a la encontrada en algunas especies de *Salvia* (Nepetoideae). En algunas especies de Hyptidinae, y en *Amasonia* y *Monochilus* (Ajugoideae), se ha observado un mesófilo con una multicapa de empalizada.

En cuanto al tejido vascular, en algunas Nepetoideae y Lamioideae, los haces vasculares están acompañados por una vaina parenquimatosa. Rudall (1980) señaló extensiones de parénquima asociado al tejido vascular tanto con o sin lignificación en diferentes especies de Hyptidinae (Kadereit, 2004).

V.1.4.2. HISTOLOGÍA DEL TALLO EN LA FAMILIA LAMIACEAE

Los tallos en sección transversal son frecuentemente cuadrangulares, con una capa subepidérmica de colénquima, normalmente restringida a los ángulos, pero pudiendo aparecer también en los lados (*Pycnostachys*) o formando un anillo cerrado (Nepetoideae: *Aeollanthus*, *Plectranthus*, *Anisochilus*, y Lamioideae: *Chenopsis*, *Colquhounia*, *Pogostemon*). Se ha observado una hipodermis colenquimatosa en *Clerodendrum inerme* y, en *Bystropogon*, hay fibras asociadas a ella. En Tectona, células pétreas están asociadas al córtex colenquimatoso.

El colénquima está aparentemente ausente en varios géneros de Westringieae y también de *Cuminia*. El córtex de algunas especies de hábitats semi-acuáticos, presenta

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

grandes espacios intercelulares (*Mentha*, *Stachys*, *Pogostemon* y *Prunella*). Se ha observado una endodermis en *Holmskioldia* y *Scutellaria*, y también en muchos géneros de Lamioideae y Nepetoideae, pudiendo estar a menudo suberizado. Sin embargo, Metcalfe y Chalk (1950) no mencionan la existencia de una endodermis en ninguno de los géneros de la mayoría de las subfamilias leñosas: Symphorematoideae, Viticoideae, Ajugoideae o Prostantheroideae.

El corcho o corteza se produce superficialmente o en capas más profundas del tallo en muchos géneros. El periciclo puede contener haces de elementos esclerenquimatosos aislados o puede formar un anillo continuo en *Ajuga*, *Cymaria*, *Marrubium*, *Tectona*, *Clerodendrum* y *Sphenodesma*. Sin embargo, los elementos esclerenquimatosos parecen estar menos desarrollado en el periciclo de muchas Lamioideae y Nepetoideae, y ausentes en *Lamium*, *Galeopsis*, *Comanthosphace* (Lamioideae) y en *Mentha*, *Lallemantia*, *Horminum* y *Prunella* (Nepetoideae: Mentheae).

En cuanto al sistema vascular, los cuatro haces vasculares primarios usualmente se encuentran situados opuestos a los ángulos del tallo (en sección transversal). El floema secundario, comprende fibras en varios grupos, y también se ha observado asociado a él células pétreas en Symphorematoideae, en *Tectona* y *Callicarpa* (*Incertae sedis*). Una localización similar se ha encontrado en varios géneros de Prostantheroideae: tribu Chloantheae: *Chloanthes*, *Cyanostegia* y *Pityrodia*, mientras que en la tribu Westringieae, *Hemiandra*, se encontró que tenía fibras del floema formando un cilindro continuo. Las fibras del floema se han observado en especies de *Scutellaria* y *Tinnea* (Scutellarioideae) y, en *Meriandra*, *Cunila* y *Hoslundia*. Los vasos xilemáticos usualmente tienen perforaciones o punteaduras simples. El xilema, se convierte en un cilindro continuo en una etapa muy temprana en la mayoría de los grupos, aunque se han observado excepciones en *Horminum* (Nepetoideae) y *Physostegia* (Lamioideae). El cilindro está frecuentemente atravesado por estrechos radios lignificados, que aparecen ampliamente, en muchas especies leñosas de *Vitex* (Viticoideae) y *Tectona* (*Incertae sedis*).

Las dimensiones de los elementos de los vasos son a menudo de tamaño medio, pero puede cubrir una amplia gama de tamaños; esto está probablemente está relacionado con el hábitat y el xeromorfismo (Kadereit, 2004).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

V.2. MATERIALES Y MÉTODOS

V. 2.1. MICROSCOPIA ÓPTICA

V.2.1.1 MATERIALES

El material vegetal utilizado en este estudio fue, plantas de *Nepeta teydea* sometidas a diferentes condiciones ambientales:

1.- Plantas de campo (pC). Plantas de *Nepeta teydea* procedentes del Parque Nacional del Teide, concretamente de las cercanías del Parador del Parque y del Llano de Ucanca, a más de 2.000 metros de altitud (Fig.3.2.1).

2.- Plantas obtenidas de cultivo *in vitro* (pIV). Plantas de *Nepeta teydea* de la fase de multiplicación *in vitro*, desarrolladas en una solución nutritiva compuesta por un medio ½ MS0 (Fig. 3.2.2).

3.- Plantas aclimatadas a condiciones *ex vitro* (pA). Plantas de *Nepeta teydea* procedentes de cultivo *in vitro* que se han aclimatado a condiciones *ex vitro* en nuestro laboratorio, sin exposición a luz UV (Fig. 3.2.3).

4.- Plantas aclimatadas a condiciones *ex vitro* y sometidas a tratamientos con luz ultravioleta (pA-UV). Plantas de *Nepeta teydea* procedentes de cultivo *in vitro* que se han aclimatado a condiciones *ex vitro* en nuestro laboratorio, y posteriormente, se sometieron durante 7 días, a un tratamiento con luz ultravioleta, semejante al tratamiento 1, del protocolo 2 con radiación UV-B, del capítulo VI de esta tesis, en el que las plantas se sometieron a condiciones constantes de luz blanca durante 60 minutos, mientras que la luz UV se aplicó en ciclos de 10 minutos (Fig. 3.2.4).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

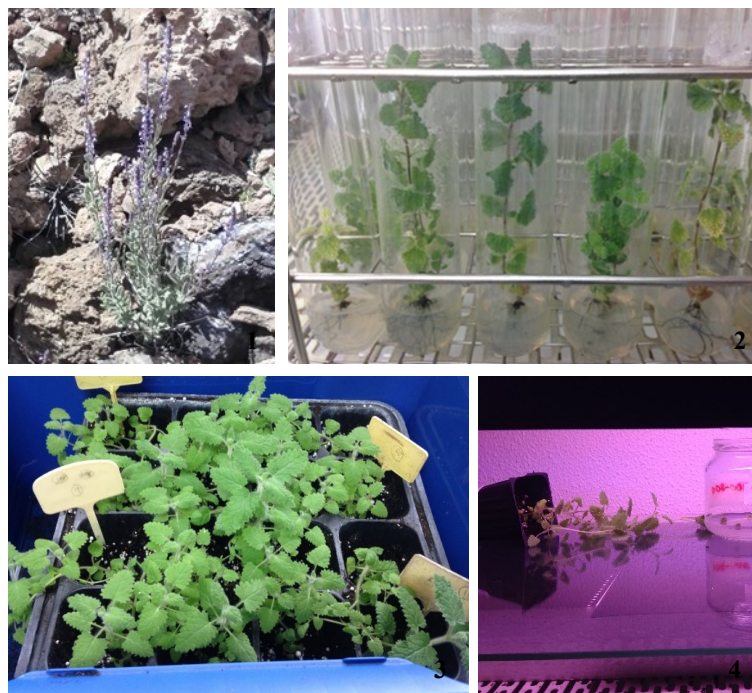
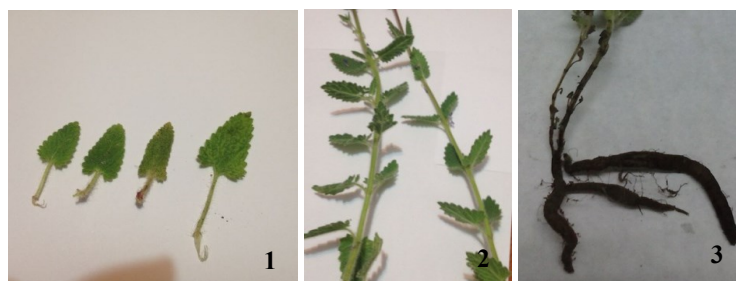


Figura 3.2.- Plantas de *Nepeta teydea* utilizadas para el estudio histológico procedentes de: 1) campo; 2) cultivo *in vitro*; 3) aclimatadas a condiciones *ex vitro* sin exposición a luz UV-b; 4) aclimatadas a condiciones *ex vitro* sometidas al tratamiento con radiación UV-b.

V.2.1.2. METODOLOGÍA

V.2.1.2.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Para el estudio al microscopio óptico, se utilizaron ejemplares jóvenes y en buen estado procedentes de campo, de la fase de multiplicación del cultivo *in vitro* y de la fase de aclimatación *ex vitro*. Para ello, procedimos a la disección de las partes del cuerpo vegetativo de las plantas con ayuda de un bisturí (Fig. 3.3), y obtuvimos segmentos transversales de entre 1 y 2mm de longitud de las hojas, tallos y raíces.



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 965383		Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14	
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58	
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47	
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34	

Figura 3.3.- Muestras vegetales utilizadas para el estudio histológico de *Nepeta teydea*:
1) Hojas; 2) Tallos; 3) Raíces.

V.2.1.2.2. TÉCNICAS DE FIJACIÓN, INCLUSIÓN Y MICROTOMÍA DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

Para poder observar las muestras a través de un microscopio óptico, las secciones deben de ser sometidas a una serie de tratamientos, que incluye la inclusión, sección, deshidratación, tinción, y por último el montaje de la preparación.

• **FIJACIÓN DE LAS MUESTRAS VEGETALES**

Las muestras seleccionadas y cortadas anteriormente, se hidrataron en agua destilada durante 24 horas antes de comenzar el protocolo de fijación. La fijación de las mismas se realizó en una cámara de extracción de gases (Fig. 3.4.1) empleando el fijador formaldehído acético (F.A.A) (Tabla 3.2) durante 2 días (Fig. 3.4.2).



Figura 3.4.- 1) Cámara de extracción de aire que se utilizó durante el procedimiento histológico; 2) Procedimiento de fijación con F.A.A de las muestras de hojas, tallos y raíces de *Nepeta teydea*.

Tabla 3.2.- Componentes y cantidades de los productos químicos necesarios para la preparación del fijador FAA.

COMPONENTES	VOLÚMENES
-------------	-----------

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Etanol 100%	90ml
Ácido acético glacial	5ml
Formaldehido	5ml

- **INCLUSIÓN DE LAS MUESTRAS VEGETALES EN PARAPLAST**

Proceso de deshidratación

Posteriormente el material vegetal fijado se sometió a un proceso de deshidratación en concentraciones crecientes de etanol (70-100%) (Fig.3.5.1).

- **Proceso de diafanización**

El siguiente paso consistió en la impregnación de las muestras en un solvente del paraplást, que es el tolueno. Se comenzó con un baño de la mezcla de tolueno/alcohol en una proporción 1:1 y seguidamente realizaron dos baños de tolueno puro de 15 minutos cada uno (Fig.3.5.1).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Figura 3.5.- Inclusión de las muestras de *Nepeta teydea* en paraplast: 1) Proceso de deshidratación; 2) Paraplast empleado para llevar a cabo este procedimiento, paraplast plus; 3) Fundición en una estufa a 60°C del paraplast.

- Inclusión en paraplast

A continuación, las muestras se embebieron en un medio de inclusión, el paraplast (Fig. 3.5.2). Para ello, las muestras se sumergieron en mezclas líquidas de tolueno/paraplast: 70/30, 50/50 y 30/70 (Fig. 3.6.1) y posteriormente, se realizaron tres baños consecutivos con paraplast puro de 30 minutos cada uno (Fig. 3.6.2). Todo este proceso se realizó dentro de la estufa (SELECTA Mod 207A) (Fig. 3.5.3).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 965383		Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14	
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58	
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47	
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34	



Figura 3.6.- Inclusión de las muestras vegetales de *Nepeta teydea* en paraplast: 1) Mezclas de tolueno/paraplast 70/30, 50/50 y 30/70; 2) Recipientes con las muestras vegetales sumergidas en paraplast puro

Preparación de los bloques de paraplast

Después de la inclusión de las muestras, se realizaron los bloques de paraplast. Para ello, las muestras se colocaron orientadas en paraplast fundido dentro de unos moldes (Fig. 3.7.1-2), y se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta su solidificación (Fig. 3.7.2-3) antes de proceder a la colocación de los bloques en el microtomo para el corte de las secciones (Fig. 3.7.4).

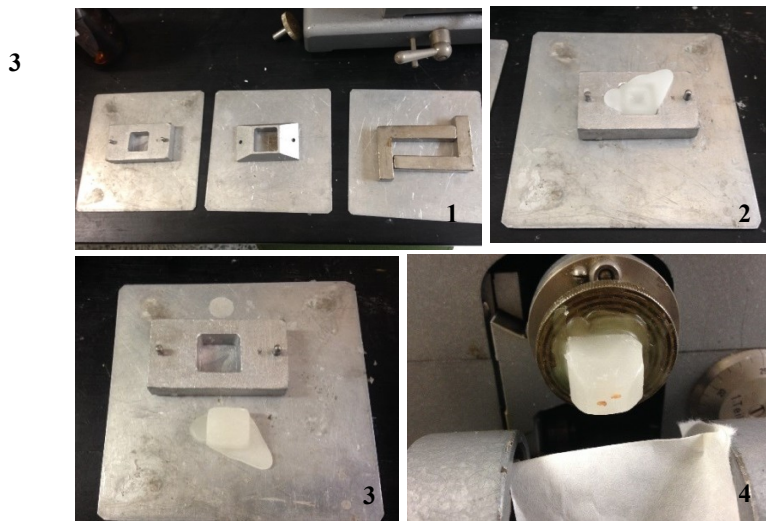


Figura 3.7.- Preparación de los bloques de paraplast que contienen las muestras vegetales de *Nepeta teydea* 1) Diferentes moldes utilizados para la formación de los

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 965383		Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14	
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58	
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47	
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34	

bloques de paraplast; 2) Bloque de paraplast enfriándose tras la colocación de la muestra. 3) Bloque de paraplast ya solidificado; 4) Bloque colocado en el microtomo para su corte.

- **MICROTOMÍA: OBTENCIÓN Y MONTAJE DE LAS SECCIONES**

Las muestras se cortaron a 20 μm con un micrótopo Reichertz tipo Minot (Fig.3.8.1). Las tiras de secciones se recogieron en portaobjetos que contenían un medio albuminado (Tabla 3.3), y se colocaron sobre una plancha calefactora (P SELECTA V 220 Hz W 400. 130°C) a una temperatura de 40°C, quedando las secciones estiradas y adheridas a los portaobjetos (Fig. 3.8.2).

Tabla 3.3.- Componentes del medio albuminado.

COMPONENTES	CANTIDADES
Albúmina seca	1g
Glicerina	8ml
Salicilato de sodio	0.5g
Agua destilada	10ml

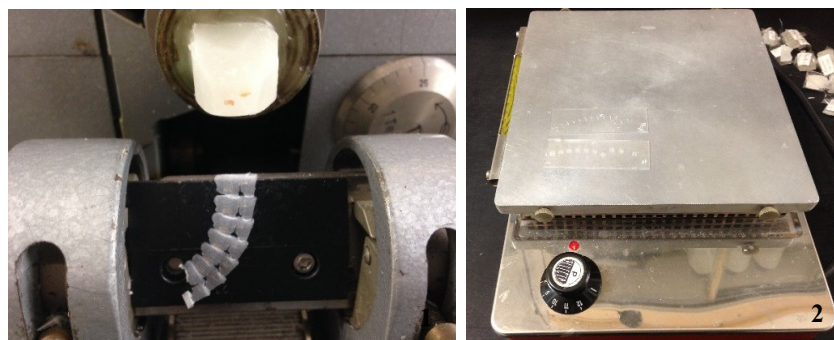


Figura 3.8.- Corte de secciones finas al microtomo. 1) Obtención de los cortes transversales de las muestras vegetales; 2) Placa calefactora empleada durante el montaje con medio albuminado de las secciones.

Una vez montadas las secciones en los portaobjetos, se introdujeron en una estufa a 37-40°C durante al menos 24 horas.

V.2.1.2.3. TÉCNICA DE TINCIÓN DE LAS SECCIONES PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

Las secciones se tiñeron con la “Tinción doble” de Johansen (1940), también denominada la tinción safranina/verde rápido.

En primer lugar, se desparafinaron las secciones mediante 3 baños de 30 minutos cada uno en xileno. A continuación, las secciones se sometieron a un proceso de rehidratación, para ello los portaobjetos se sumergieron en concentraciones decrecientes de etanol (100-70%), de entre 30 minutos y 1h de duración cada una (Fig. 3.9).



Figura 3.9.- Desparafinado y rehidratación de las secciones de *Nepeta teydea*.

Posteriormente los portaobjetos se sumergieron en una solución de safranina (Tabla 3.4), durante 12 h tras lo cual se lavaron con agua para eliminar el exceso de colorante.

Tabla 3.4.- Componentes y cantidades de los productos químicos necesarios para la preparación del colorante Safranina.

COMPONENTES	CANTIDADES
Safranina	1g
Metil-cellosolve	50ml
Etanol 96%	25ml
Acetato sódico	1g
Formaldehído	2ml
Agua	25ml

Tras dos baños en etanol al 100% de 15 minutos cada uno, las muestras se tiñeron con verde rápido (Tabla 3.5) durante 30 segundos y aclaradas con una solución de aceite de clavo, etanol y xileno (2:1:1) (Fig. 3.10.1). Una vez retirado el exceso de colorante los portaobjetos se sumergieron en xileno y posteriormente se cubrieron con un cubreobjetos montado con Eukit (Fig. 3.10.2).

Tabla 3.5.- Componentes y cantidades de los productos químicos necesarios para la preparación del colorante verde rápido.

COMPONENTES	CANTIDADES
Verde rápido	0.5g
Metil-celulosolve	6ml
Aceite de clavo	6ml
Etanol 96%	35ml
Alcohol butílico terciario	35ml
Ácido acético al 1%	12ml

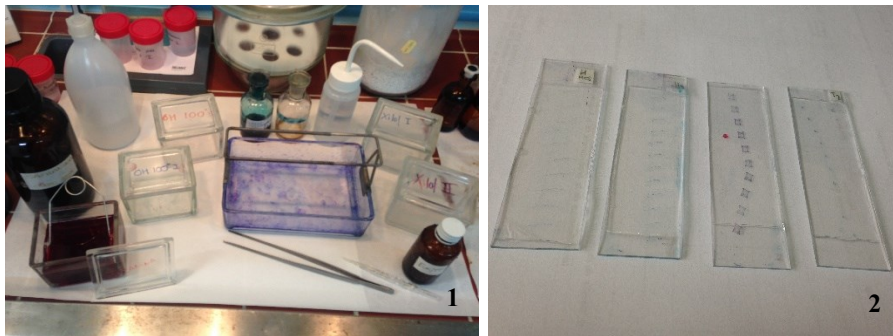


Figura 3.10.- Tinción de las muestras con safranina/verde rápido. 1) Material utilizado para llevar a cabo la tinción de las muestras. 2) Preparaciones histológicas teñidas y montadas, listas para su observación al microscopio óptico.

V.2.1.2.4. OBTENCIÓN Y OBSERVACIÓN DE LAS FOTOMICROGRAFIAS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Las fotomicrografías se observaron y se obtuvieron con un microscopio Optika B-350, con un sistema de captura de imagen por ordenador Motic Images Plus 2.0 ML (Fig. 3.11). Las imágenes se digitalizaron sólo haciendo adaptaciones de contraste.



Figura 3.11.- Sistema utilizado en nuestro laboratorio para la visualización y la toma de las imágenes. Microscopio Optika B-350 con un sistema de captura de imagen por ordenador Motic Images Plus 2.0 ML, con la digitalizamos las imágenes de las muestras.

V.2.1.2.5. ANÁLISIS FITODERMOLÓGICO

Para este estudio, se eligieron hojas de la zona media de pC, pIV y pA que se encontraban en buen estado.

De cada hoja seleccionada, utilizando una lupa Leica ZOOM. 2000™. Model No. Z30V (Fig. 3.12), se separó la epidermis del resto de los tejidos foliares con ayuda de unas pinzas muy finas y un bisturí. Los fragmentos epidérmicos extraídos tanto de la epidermis adaxial como de la epidermis abaxial, se colocaron durante unos segundos en una placa de Petri con agua destilada y unas gotas de hipoclorito sódico y posteriormente se montaron en portaobjetos con una gota de glicerina.

Las preparaciones epidérmicas fueron observadas y fotografiadas con un microscopio Optika B-350, con sistema de captura de imagen por ordenador Motic Images Plus 2.0 ML. Las imágenes se digitalizaron sólo haciendo adaptaciones de contraste.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Figura 3.12.- Lupa Leica ZOOM. 2000™ (Model No. Z30V. 240V) e instrumental de laboratorio utilizado para la obtención de las epidermis foliares.

Los parámetros analizados fueron: morfología de las células epidérmicas, de los estomas y de los tricomas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

V.3. RESULTADOS

V.3.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA HOJA DE *NEPETA TEYDEA*.

V.3.1.1. PLANTAS DE CAMPO (pC)

La hoja en sección transversal (s.t.) muestra un contorno con varias prominencias hacia la superficie abaxial en la zona del nervio principal y de los nervios secundarios (Fig. 3.13.1). Ambas epidermis simples, con células isodiamétricas de diferentes tamaños, más grandes en la superficie abaxial (Fig. 3.13.1.i). Células epidérmicas con paredes anticlinales sinuosas, protegidas por una cutícula delgada y lisa. Además, ambas superficies epidérmicas, presentan una elevada densidad de tricomas tanto glandulares como no glandulares (Figs. 3.13.1-ii, 3.13.2). Los tricomas no glandulares son mayoritariamente pluricelulares simples y alargados (Fig. 3.13.3), aunque también existen en menor medida tricomas unicelulares. En cuanto a los tricomas glandulares, podemos distinguir dos tipos: capitados (Figs. 3.13.4-5) y peltados (Fig. 3.13.6). Los capitados presentan una cabeza y un cuello unicelulares (Fig. 3.13.4-5), o una cabeza unicelular y un cuello pluricelular. Los peltados están constituidos por una cabeza pluricelular formada por cuatro células (Figs. 3.13.6-6i). La región del nervio central presenta mayor cantidad de tricomas con respecto al resto de la superficie de la hoja, al igual que ocurre con la superficie abaxial, que muestra una mayor densidad de tricomas que la superficie adaxial.

La lámina de la hoja es anfiestomática (Figs. 3.13.1, 3.13.1.i, 3.14.2-3), con estomas con forma ovoide, anomocíticos y diacíticos (Figs. 3.14.1-2), a nivel de la superficie epidérmica o levemente elevados (Figs. 3.14.3-3.14.4). En el complejo estomático, destaca una de las células acompañantes por estar más desarrollada que la otra, aunque ambas poseen paredes celulares anticlinales levemente onduladas (Figs. 3.14.1-2). También, se puede observar patrones atípicos de los estomas en ambas epidermis, con la presencia de estomas gemelos (Fig. 3.14.2.2i).

Mesófilo dorsiventral (Fig. 3.13.1.i), formado por un parénquima en empalizada (Fig. 3.14.3) bien organizado, constituido por 1-2 capas de células alargadas y delgadas, con escasos espacios intercelulares. Parénquima esponjoso (hacia el envés), menos organizado (Fig. 3.14.4), con células irregulares con paredes celulares más

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

delgadas que las células del parénquima en empalizada y con numerosos espacios intercelulares.

En los haces vasculares primarios y secundarios se aprecian 1-2 capas de colénquima subepidérmico tipo angular-lagunar en ambas superficies (Fig. 3.15.1).

Los haces vasculares principal y secundarios, con organización colateral, con floema abaxial respecto al xilema (Figs. 3.14.2-3). Los haces vasculares se encuentran debajo del colénquima, rodeados por abundante parénquima.

El haz principal (Fig. 3.14.2) con xilema cuyos elementos muestran paredes engrosadas; cambium vascular formado por 2-3 capas de células alargadas. Posee un casquete de fibras floemáticas, de pequeño tamaño y paredes delgadas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

FIGURA 3.13.- Hoja

Figura 3.13.1.- Visión panorámica de la hoja en s.t., en la que se observa epidermis, parénquima y haz vascular principal.

Figura 3.13.1.ii.- Detalle de la zona internervial con tricomas glandulares y no glandulares y estomas en ambas superficies.

Figuras 3.13.2.- Fotomicrografía de microscopio estereoscópico de los tricomas en el margen de la hoja.

Figuras 3.13.3-6.- Tricomas en visión paradermal. **Figura 3.13.3.-** Tricomas no glandulares flageliforme pluricelulares, uniseriados con el extremo distal de las células terminales delicadas y muy alargadas. **Figura 3.13.4.-** Tricoma glandular capitado con cabeza unicelular oblonga, con una célula cuello y tallo unicelular. **Figura 3.13.5.-** Tricoma glandular capitado con cabeza esférica unicelular y un cuello unicelular. **Figura 3.13.6.-** Tricoma glandular peltado pluricelular, con cabeza multicelular secretora formada por cuatro células (Figura 3.13.6.6i).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

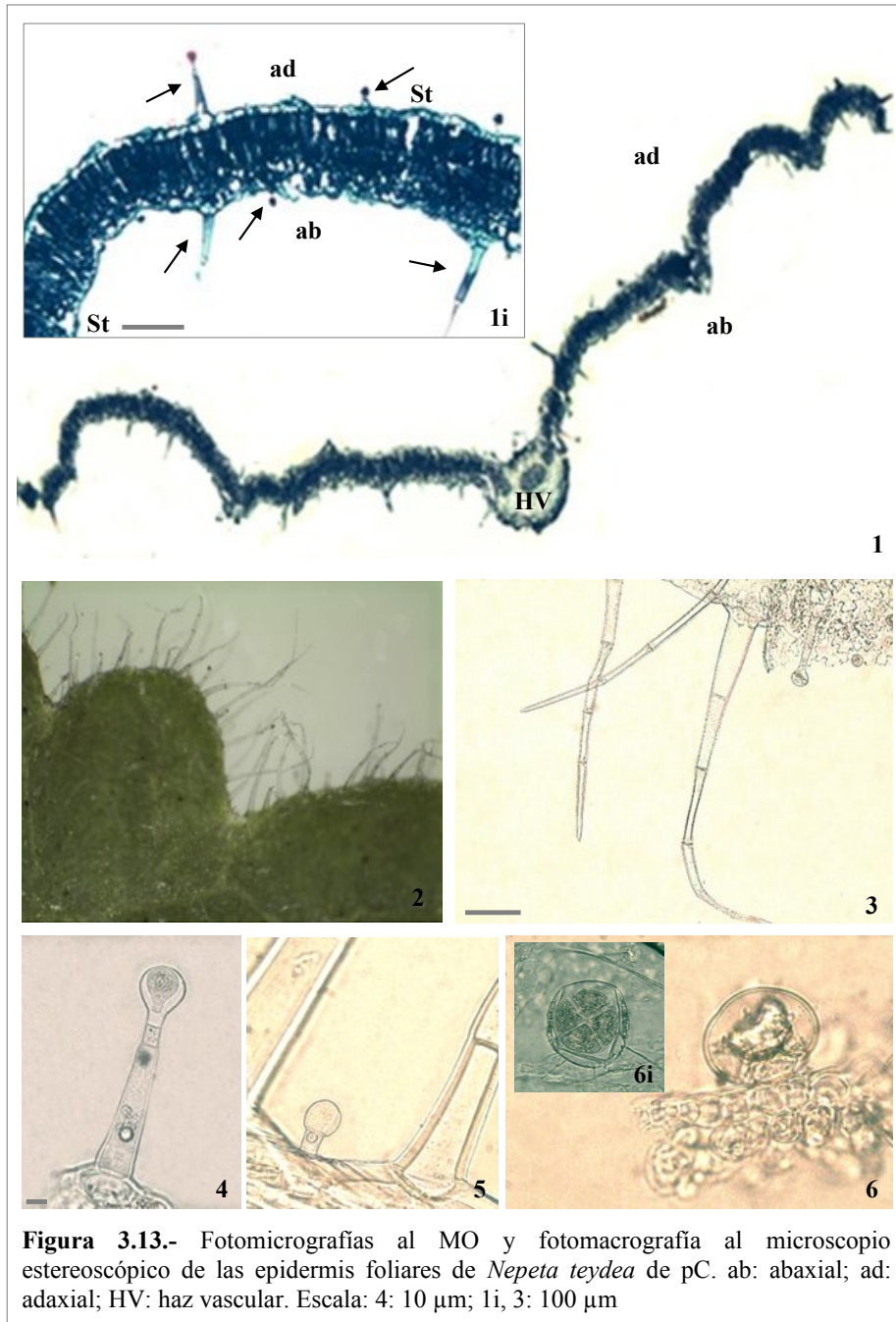


Figura 3.13.- Fotomicrografías al MO y fotomacrografía al microscopio estereoscópico de las epidermis foliares de *Nepeta teydea* de pC. ab: abaxial; ad: adaxial; HV: haz vascular. Escala: 4: 10 µm; 1i, 3: 100 µm

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

FIGURA 3.14.- Hoja

Figuras 3.14.1-2.- Visión paradermal de la epidermis foliar. **Figura 3.14.1.-** Epidermis foliar adaxial con estomas diacíticos al MO. **Figura 3.14.2.-** Epidermis abaxial con estomas diacíticos al MO. **Figura 3.14.2.2i.-** Detalle de estomas gemelos en la superficie abaxial.

Figura 3.14.3.- Epidermis adaxial simple con cutícula delgada, y estoma con una cámara subestomática amplia. Tejido parenquimático en empalizada, cuyas células contienen gran cantidad de cloroplastos.

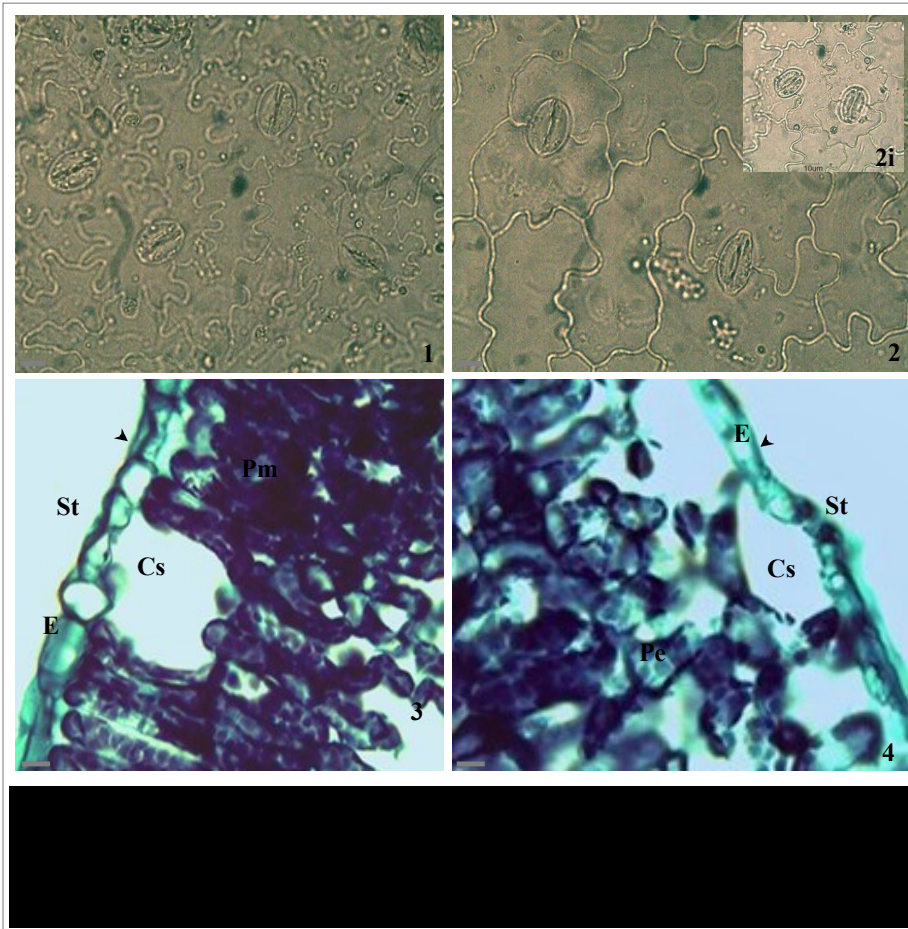
Figura 3.14.4.- Epidermis abaxial simple con cutícula delgada, y estoma a nivel ligeramente superior al resto de las células epidérmicas con su correspondiente cámara subestomática. Tejido parenquimático esponjoso con espacios intercelulares.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

FIGURA 3.15.- Haz vascular en s.t.

Figura 3.15.1.- Nervio principal en el que se observa la epidermis, el colénquima subepidérmico, parénquima y los tres haces vasculares.

Figura 3.15.2.- Haz vascular central del nervio principal con organización colateral, floema abaxial respecto al xilema y cambium vascular

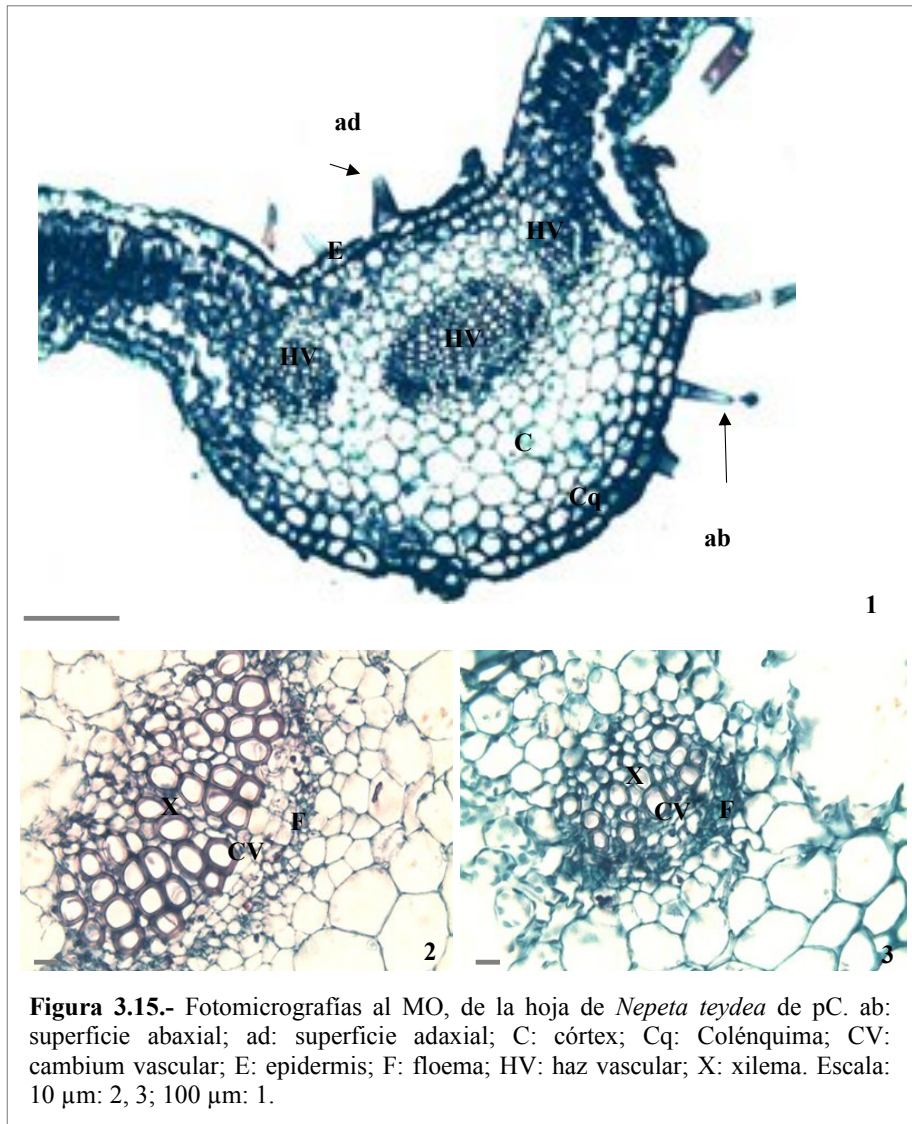
Figura 3.15.3.- Haz vascular de un nervio secundario, con organización colateral, floema adaxial con respecto al xilema y cambium vascular.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 27/06/2017 09:46:14

JUAN IGNACIO FRIAS VIERA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 19:33:58

FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

29/06/2017 09:05:47

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

18/07/2017 14:28:34

V.3.1.2. PLANTAS *IN VITRO* (pIV)

La hoja en s.t. muestra un contorno con varias prominencias hacia la superficie abaxial en la zona del nervio principal y de los nervios secundarios (Fig. 3.16.1). Ambas epidermis simples, uniestratificadas, y protegida por una delgada cutícula. Células epidérmicas isodiamétricas de mayor tamaño en la superficie abaxial (Fig. 3.16.2), que presentan paredes anticlinales sinuosas. Tricomas glandulares y no glandulares en ambas superficies (Figs. 3.16.1-2, 3.17.1). Los tricomas no glandulares son mayoritariamente pluricelulares simples y alargados, aunque también existen en menor medida tricomas unicelulares (Figs. 3.17.2-4). En cuanto a los tricomas glandulares, podemos distinguir dos tipos: capitados y peltados. Los tricomas capitados presentan una cabeza y un cuello unicelulares (Figs. 3.17.5-6), o una cabeza unicelular y un cuello pluricelular (Fig. 3.17.7). Los tricomas peltados, que se encuentran en gran cantidad en la superficie abaxial, están constituidos por una cabeza pluricelular, formada por cuatro células (Fig. 3.17.8). La región del nervio central y la superficie abaxial presentan mayor densidad de tricomas con respecto al resto de la superficie de la hoja.

La lámina de la hoja es anfistomática (Fig. 3.16.2), con estomas con forma ovoide, diacíticos, a nivel de las células epidérmicas en la superficie adaxial, y levemente elevados en la superficie abaxial (Fig. 3.16.2). En el complejo estomático, destaca una de las células acompañantes por estar más desarrollada que la otra, aunque ambas poseen paredes celulares anticlinales levemente onduladas (Figs. 3.17.9-10).

Mesófilo dorsiventral (Figs. 3.16.2, 3.18.1), formado por una única capa de parénquima en empalizada orientada hacia el haz, bien organizada, con escasos espacios intercelulares. (Figs. 3.16.2, 3.18.1). Parénquima esponjoso (hacia el envés), poco organizado, formado por células irregulares grandes, y con numerosos espacios intercelulares (Figs. 3.16.2, 3.18.1).

Los haces vasculares principal y secundarios, presentan una organización colateral, con floema abaxial respecto al xilema (Figs. 3.18.2-3). Los haces vasculares se encuentran rodeados por abundante parénquima. Haz principal con xilema cuyos elementos muestran paredes engrosadas; cambium vascular formado por 2-3 capas de células alargadas (Fig. 3.18.2). Posee un casquete de fibras floemáticas, de pequeño tamaño y paredes delgadas (Fig. 3.18.3).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

FIGURA 3.16.- Hoja en s.t.

Figura 3.16.1.- Visión panorámica en la que se observa la epidermis, el parénquima y el haz vascular principal.

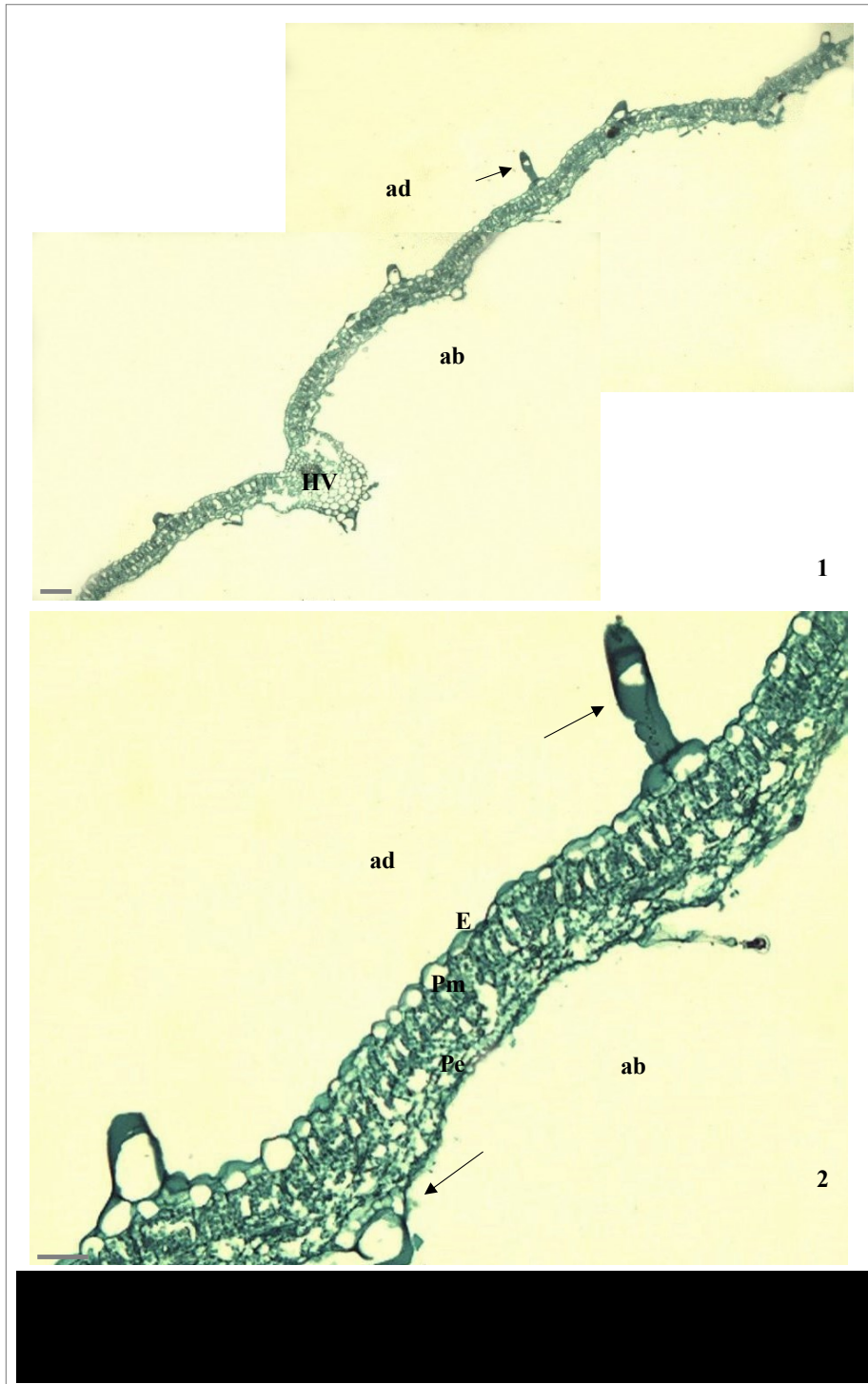
Figura 3.16.2.- Detalle de la región internervial de la hoja, con tricomas glandulares y no glandulares en ambas superficies.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

FIGURA 3.17.- Hoja.

Figura 3.17.1.- Fotomacrografía de microscopio estereoscópico de los tricomas en el margen de la hoja.

Figuras 3.17.2-8.- Tricomas en visión paradermal en ambas superficies epidérmicas.

Figura 3.17.2.- Tricoma no glandular multicelular uniseriado largos, anchos y flexuosos. **Figura 3.17.3.-** Tricoma no glandular bicelular, densamente cubierto de micropapilas, formado por una célula basal ancha y una célula apical agudizada larga.

Figura 3.17.4.- Tricomas no glandulares flageliformes pluricelulares uniseriados y tricoma no glandular unicelular corto. **Figura 3.17.5.-** Tricoma glandular peltado de cabeza pluricelular (formado por cuatro células). **Figura 3.17.6.-** Tricoma glandular capitado con cabeza globosa, cuello unicelular y tallo que puede ser unicelular o pluricelular. **Figura 3.17.7.-** Tricoma glandular capitado con cabeza unicelular en forma de copa y tallo pluricelular. **Figura 3.17.8.-** Tricoma glandular capitado de cabeza unicelular (o bicelular) esférica y cuello y tallo unicelular.

Figuras 3.17.9-10.- Visión paradermal de la epidermis foliar al MO. **Figura 3.17.9.-**

Epidermis foliar adaxial con estomas diacíticos. **Figura 3.17.9i.-** Detalle de un estoma.

Figura 3.17.10.- Epidermis abaxial con estomas diacíticos. **Figura**

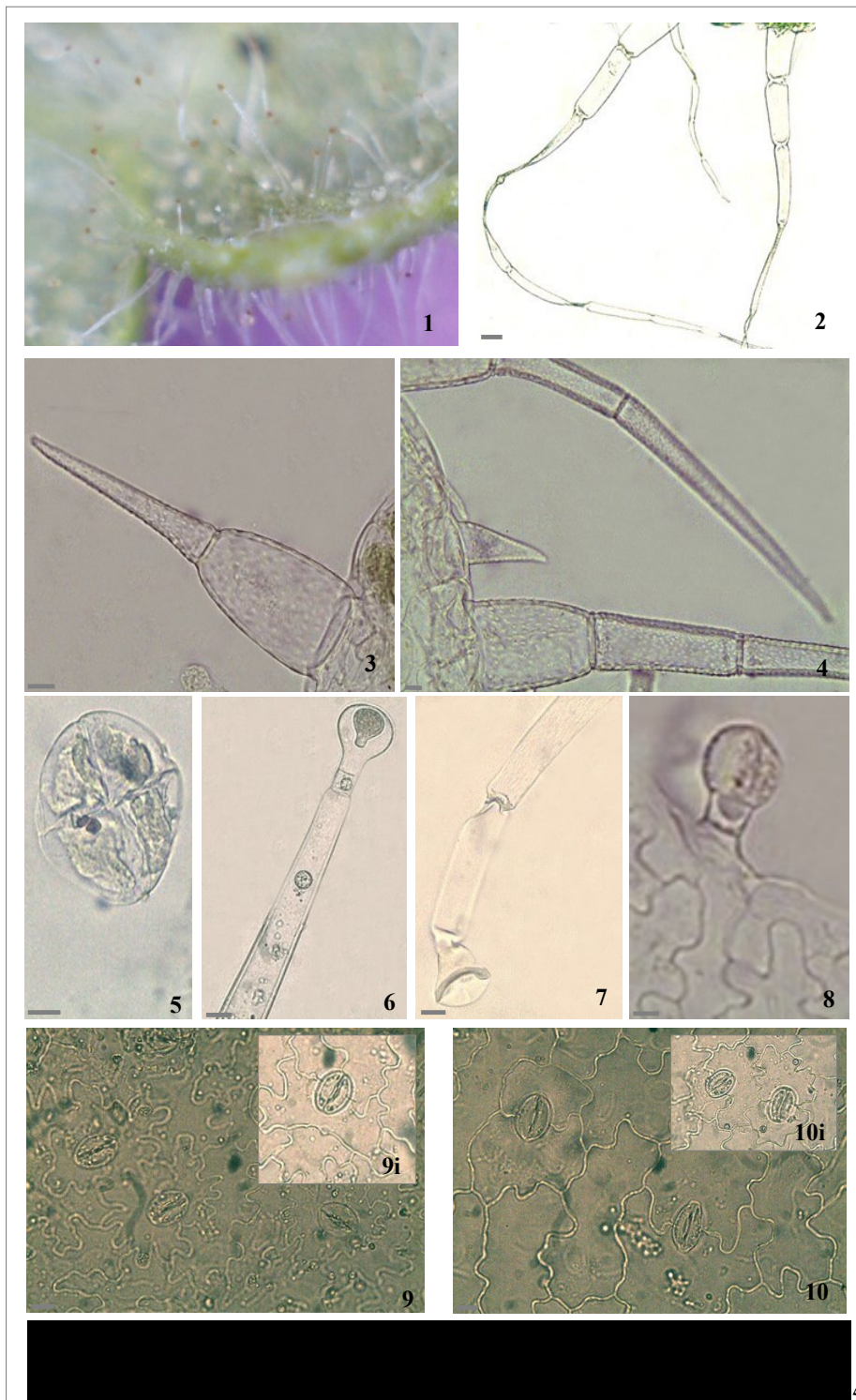
3.17.10.10i.- Detalle de estomas gemelos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

FIGURA 3.18.- Haz vascular en s.t.

Figura 3.18.1.- Nervio principal con un único de la hoja *in vitro*, en el que se observa las epidermis, parénquima y un único haz vascular.

Figura 3.18.2.- Haz vascular principal con organización colateral, floema abaxial respecto al xilema y cambium vascular.

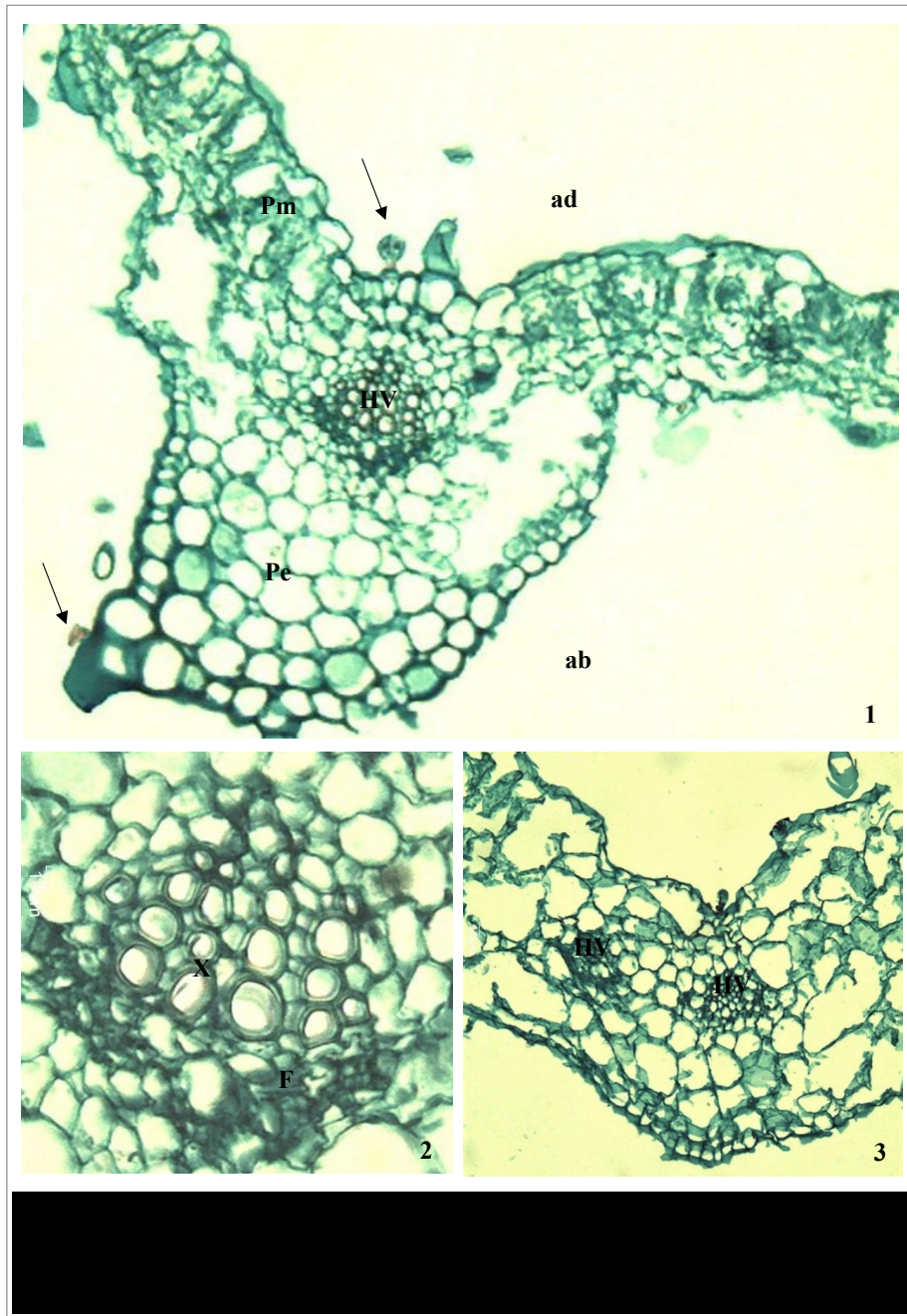
Figura 3.18.3.- Haces vasculares de un nervio secundario con organización colateral, floema respecto al xilema y cambium vascular.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

V.3.1.3. PLANTAS ACLIMATADAS

V.3.1.3.1. PLANTAS ACLIMATADAS EX VITRO CONTROL (pA)

La hoja en s.t. muestra un contorno con varias prominencias suaves hacia la superficie abaxial en la zona del nervio principal y de los nervios secundarios. Ambas epidermis simples, uniestratificadas con células isodiamétricas de diferentes tamaños, más grandes en la superficie abaxial (Figs. 3.19.1-2). Células epidérmicas con paredes celulares anticlinales sinuosas, protegidas por una cutícula delgada y lisa. Además, ambas superficies epidérmicas, presentan tricomas tanto glandulares como no glandulares (Fig. 3.20.1, 3.21.1). Los tricomas no glandulares son mayoritariamente pluricelulares simples alargados (Fig. 3.20.2), aunque también existen en menor medida tricomas unicelulares. En cuanto a los tricomas glandulares, podemos distinguir dos tipos: capitados y peltados. Los tricomas capitados pueden presentar una cabeza (esférica) y un cuello unicelular, o cabeza y cuello unicelulares, y un tallo pluricelular (Figs. 3.20.3-5). Los tricomas peltados, están constituidos por una cabeza pluricelular, formada por cuatro células. La región del nervio central y la superficie abaxial presentan mayor densidad de tricomas con respecto al resto de la superficie de la hoja.

La lámina de la hoja es anfiestomática, con estomas con forma ovoide, diacíticos, a nivel de las células epidérmica o levemente elevados (Fig.3.19.1). En el complejo estomático, destaca una de las células acompañantes por estar más desarrollada que la otra, y ambas poseen paredes celulares anticlinales levemente onduladas (Figs. 3.20.6-7).

Mesófilo dorsiventral, formado por un parénquima en empalizada (hacia el haz) bien organizado, constituido por 1 capa de células alargadas, con escaso espacio intercelular. (Fig. 3.19.1-2, 3.20.1). Parénquima esponjoso (hacia el envés), poco organizado, con células irregulares de tamaño variable, con paredes celulares más delgadas que las células del parénquima en empalizada y con numerosos espacios intercelulares (Fig. 3.19.1-2, 3.20.1).

Los haces vasculares principal y secundarios, presentan una organización colateral, con floema abaxial respecto al xilema (Fig. 3.21.2-3). Los haces vasculares se encuentran rodeados por abundante parénquima. Haz principal con un xilema cuyos elementos muestran paredes engrosadas; cambium vascular formado por 2-3 capas de

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

células alargadas (Fig. 3.21.2). Casquete de fibras floemáticas, de pequeño tamaño y paredes delgadas.

FIGURA 3.19.- Hoja

Figura 3.19.1- Visión panorámica de la región internervial de la hoja en la que se observa la epidermis con tricomas en ambas superficies, tricomas y el mesófilo.

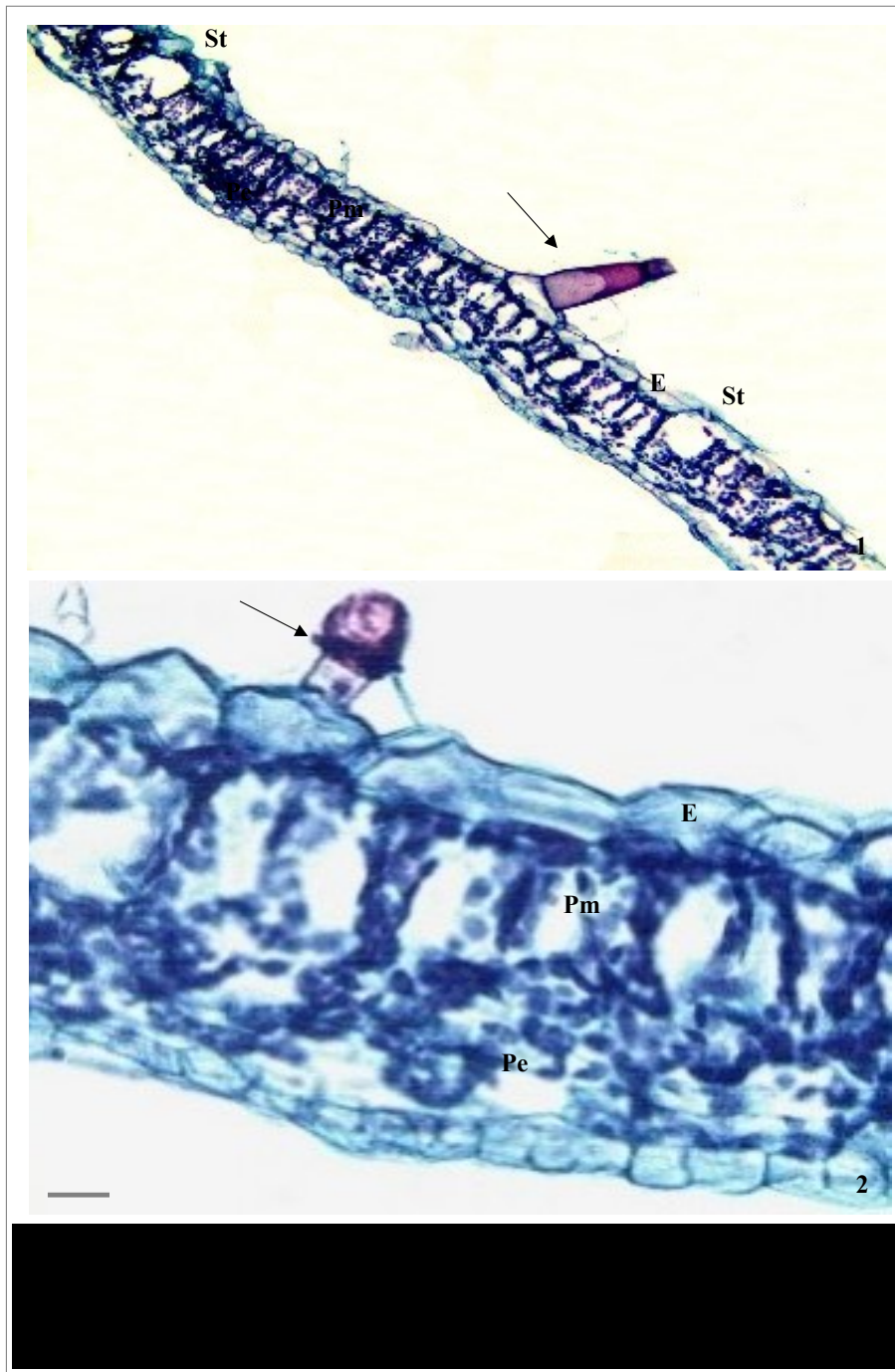
Figura 3.19.2.- Detalle de región internervial con epidermis con cutícula lisa en ambas superficies y tricomas; Parénquima en empalizada hacia la superficie adaxial y parénquima esponjoso hacia la superficie abaxial.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

FIGURA 3.20.- Hoja

Figura 3.20.1.- Fotomacrografía de microscopio estereoscópico de los tricomas en el margen de la hoja.

Figura 3.20.2-5.- Tricomas en visión paradermal presentes en ambas superficies.

Figura 3.20.2.- Tricomas no glandulares flageliforme pluricelular uniseriado. **Figura 3.20.3.-** Tricoma glandular de cabeza unicelular oblonga, cuello unicelular y tallo pluricelular. **Figura 3.20.4.-** Tricoma glandular capitado con cabeza esférica unicelular, con cuello unicelular y tallo unicelular. **Figura 3.20.5.-** Tricoma glandular capitado con cabeza globosa unicelular y tallo pluricelular.

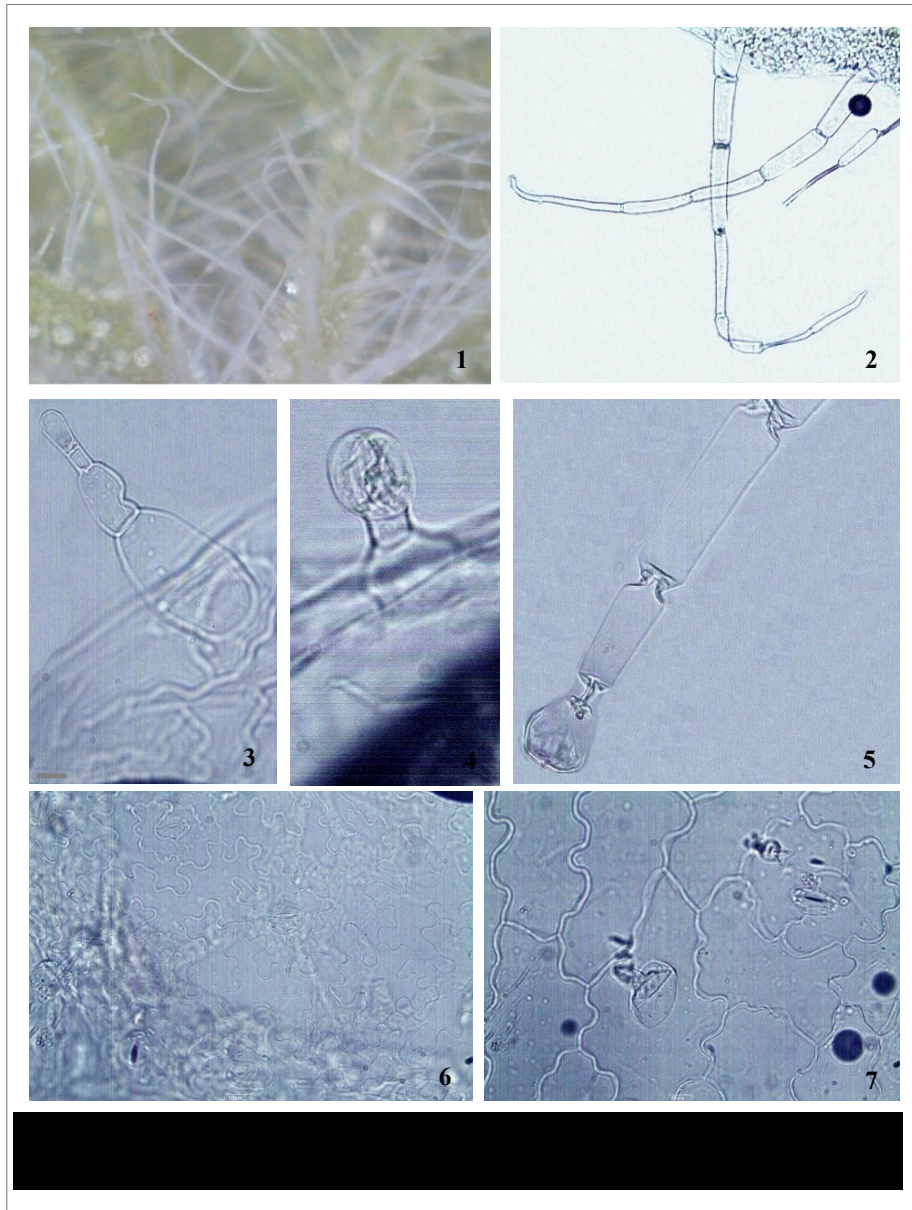
Figura 3.20.6-7.- Visión paradermal de la epidermis foliar al MO. **Figura 3.20.7.-** Epidermis foliar adaxial con estomas diacíticos. **Figura 3.20.8.-** Epidermis abaxial con estomas diacíticos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



7

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

FIGURA 3.21.- Haz vascular en s.t.

Figura 3.21.1.- Nervio principal con un único haz vascular.

Figura 3.21.2.- Haz vascular principal con organización colateral, floema abaxial respecto al xilema y cambium vascular.

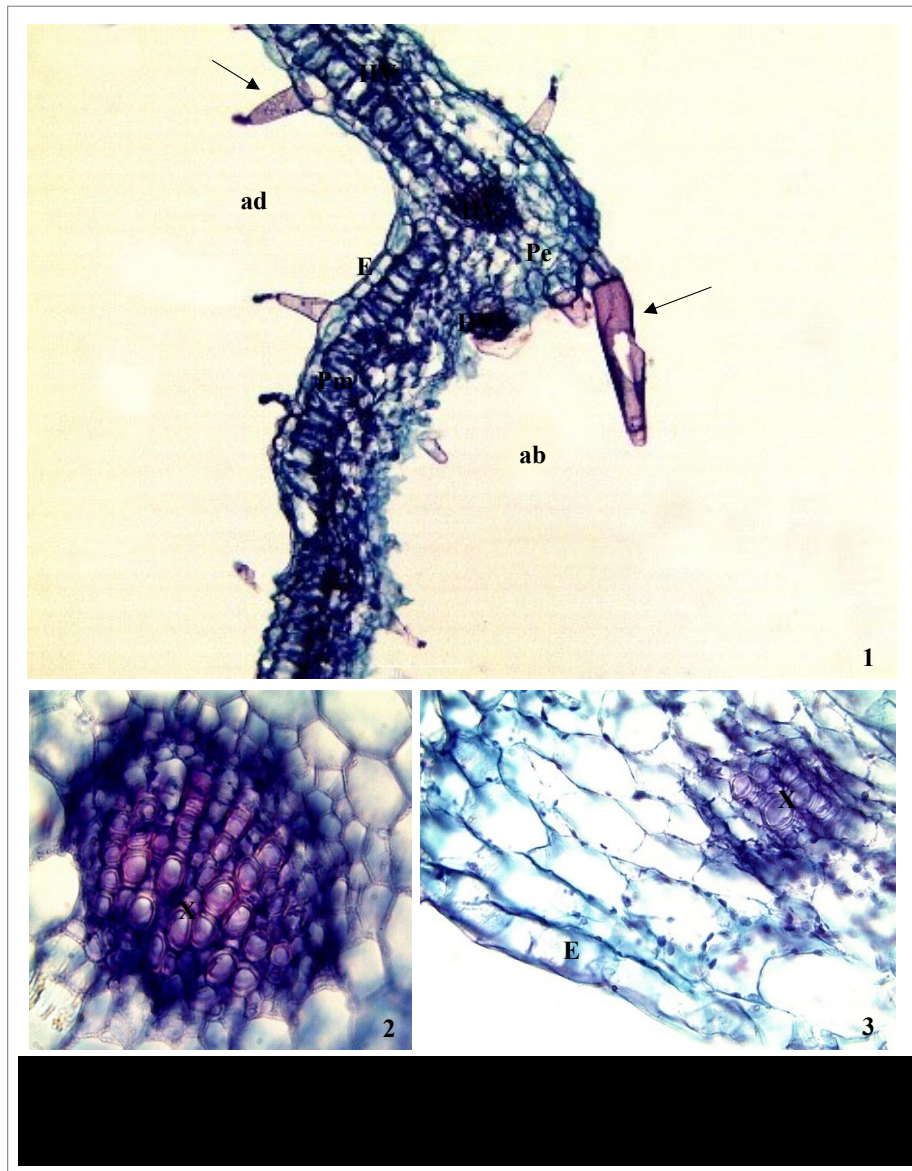
Figura 3.21.3.- Haz vascular de un nervio secundario con organización colateral, floema abaxial respecto al xilema y cambium vascular.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

V.3.1.3.2. PLANTAS ACLIMATADAS A CONDICIONES EX VITRO TRATADAS CON LUZ UV-B (pA-UV)

La hoja en s.t. muestra un contorno con varias prominencias hacia la superficie abaxial en la zona del nervio principal y de los nervios secundarios (Fig. 3.22.1). La epidermis abaxial es simple, uniestratificada, con células de morfología irregular de diferentes tamaños, más grandes en la superficie adaxial (Fig. 3.22.2). Células epidérmicas con paredes anticlinares sinuosas, protegidas por una delgada cutícula. Además, ambas superficies epidérmicas, presentan tricomas tanto glandulares como no glandulares (Figs. 3.22.2, 3.23.1). Los tricomas no glandulares son mayoritariamente pluricelulares simples alargados, aunque también existen en menor medida tricomas unicelulares. En cuanto a los tricomas glandulares, podemos distinguir dos tipos: capitados y peltados. Los tricomas capitados pueden presentar una cabeza esférica y un cuello unicelular, una cabeza esférica bicelular y un cuello unicelular, o una cabeza y cuello unicelulares, y un tallo pluricelular (Figs. 3.23.5-8). Los tricomas peltados están constituidos por una cabeza pluricelular formada por cuatro células (Fig. 3.23.4). La región del nervio central y la superficie abaxial presentan mayor densidad de tricomas con respecto al resto de la superficie de la hoja.

La lámina de la hoja es hipostomática, con presencia de estomas sólo en la cara abaxial (Figs. 3.23.9-10). Los estomas presentan forma ovoide, diacíticos, muchos de ellos elevados por encima del nivel de las células epidérmicas. En el complejo estomático, destaca una de las células acompañantes por estar más desarrollada que la otra, y ambas poseen paredes celulares anticlinales levemente onduladas.

Mesófilo dorsiventral, formado por un parénquima en empalizada (hacia el haz) poco organizado, con bastantes espacios intercelulares, constituido por 1 capa de células un poco alargadas. Parénquima esponjoso (hacia el envés), desorganizado, con células irregulares de tamaño variable, con paredes celulares más delgadas que las células del parénquima en empalizada y con numerosos espacios intercelulares (Fig. 3.22.2).

Los haces vasculares principal y secundarios, presentan una organización colateral, con floema abaxial respecto al xilema (Fig. 3.24.1-3). Los haces vasculares se encuentran rodeados por abundante parénquima. El Haz principal con xilema escaso, cuyos elementos muestran paredes engrosadas; cambium vascular formado por 2-3

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

capas de células alargadas. Casquete de fibras floemáticas, de tamaño medio y paredes delgadas (Fig. 3.24.2).

FIGURA 3.22.- Hoja en st.

Figura 3.22.1.- Visión panorámica de la hoja en sección transversal, en la que se observa la epidermis, el parénquima y el haz vascular principal.

Figura 3.22.2.- Detalle de la región internervial de la hoja, con tricomas en ambas superficies.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

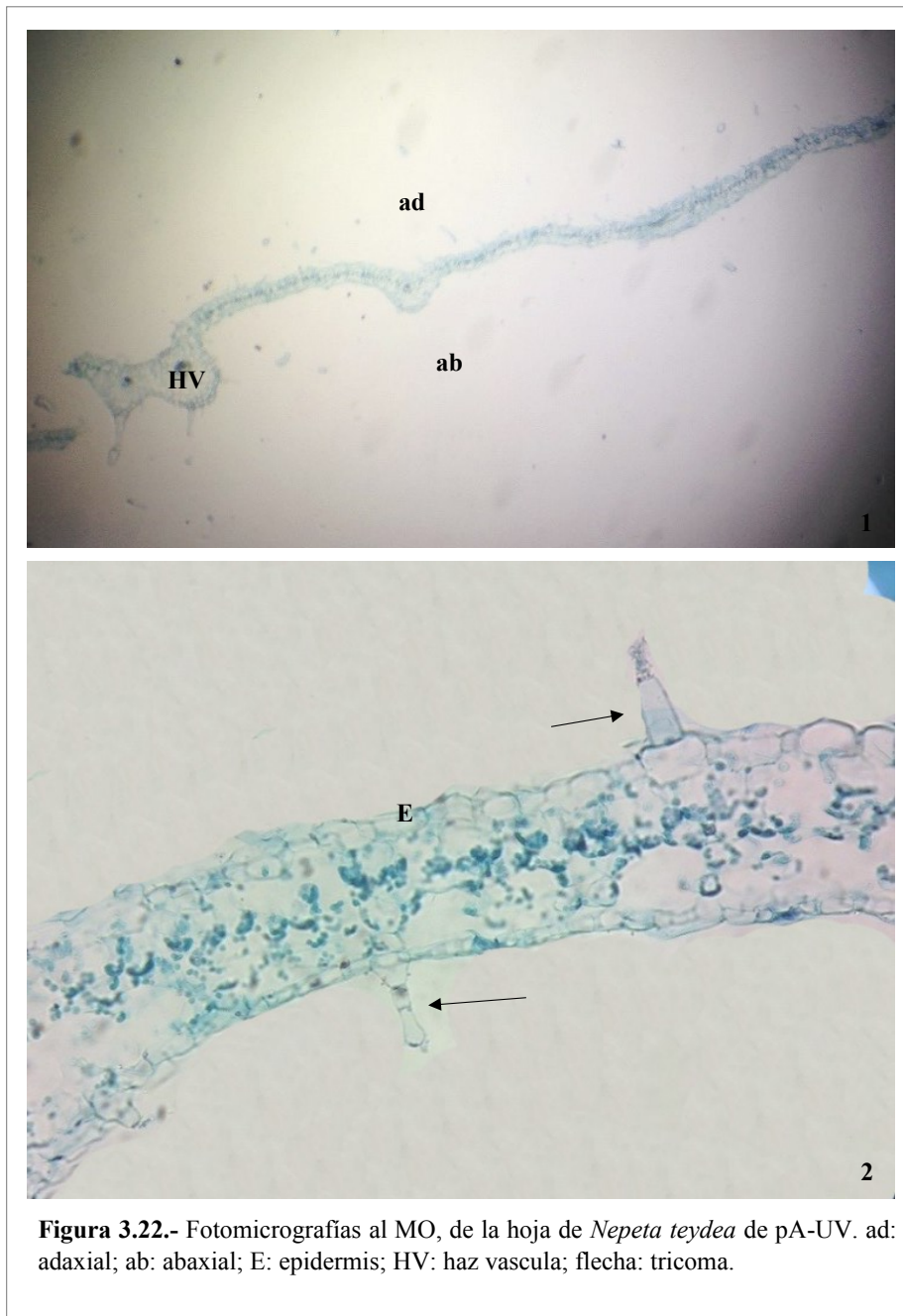


Figura 3.22.- Fotomicrografías al MO, de la hoja de *Nepeta teydea* de pA-UV. ad: adaxial; ab: abaxial; E: epidermis; HV: haz vascular; flecha: tricoma.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

FIGURA 3.23.- Visión paradermal de la epidermis foliar

Figura 3.23.1.- Fotomicrografía de microscopio estereoscópico de los tricomas en el margen de la hoja.

Figura 3.23.2-8.- Tricomas en visión paradermal presentes en ambas superficies.

Figura 3.23.2.- Tricomas no glandular flageliformes pluricelulares uniseriados, con crestas y nódulos marcados. **Figura 3.23.3.-** Tricoma no glandular uniseriado, formado por una célula basal ancha y una célula apical alargada y fina, en cuyas paredes están cubiertas por micropapilas. **Figura 3.23.4.-** Tricoma glandular capitado con cabeza globosa y cuello unicelular. **Figura 3.23.5.-** Tricoma glandular capitado de cabeza globosa bicelular y cuello unicelular. **Figura 3.23.6.-** Tricomas glandulares capitados con cabeza unicelular globosa o esférica, con cuello unicelular y tallo unicelular y pluricelular; **Figura 3.23.7.-** Tricomas glandulares capitados con cabeza con forma de copa unicelular, con cuello unicelular y tallo unicelular y pluricelular. **Figura 3.23.8.-** Tricoma glandular peltado de cabeza multicelular (formada por cuatro células) con aspecto globoso. **Figura 3.23.8i.-** Detalle de las cuatro células que componen la cabeza multicelular de un tricoma peltado.

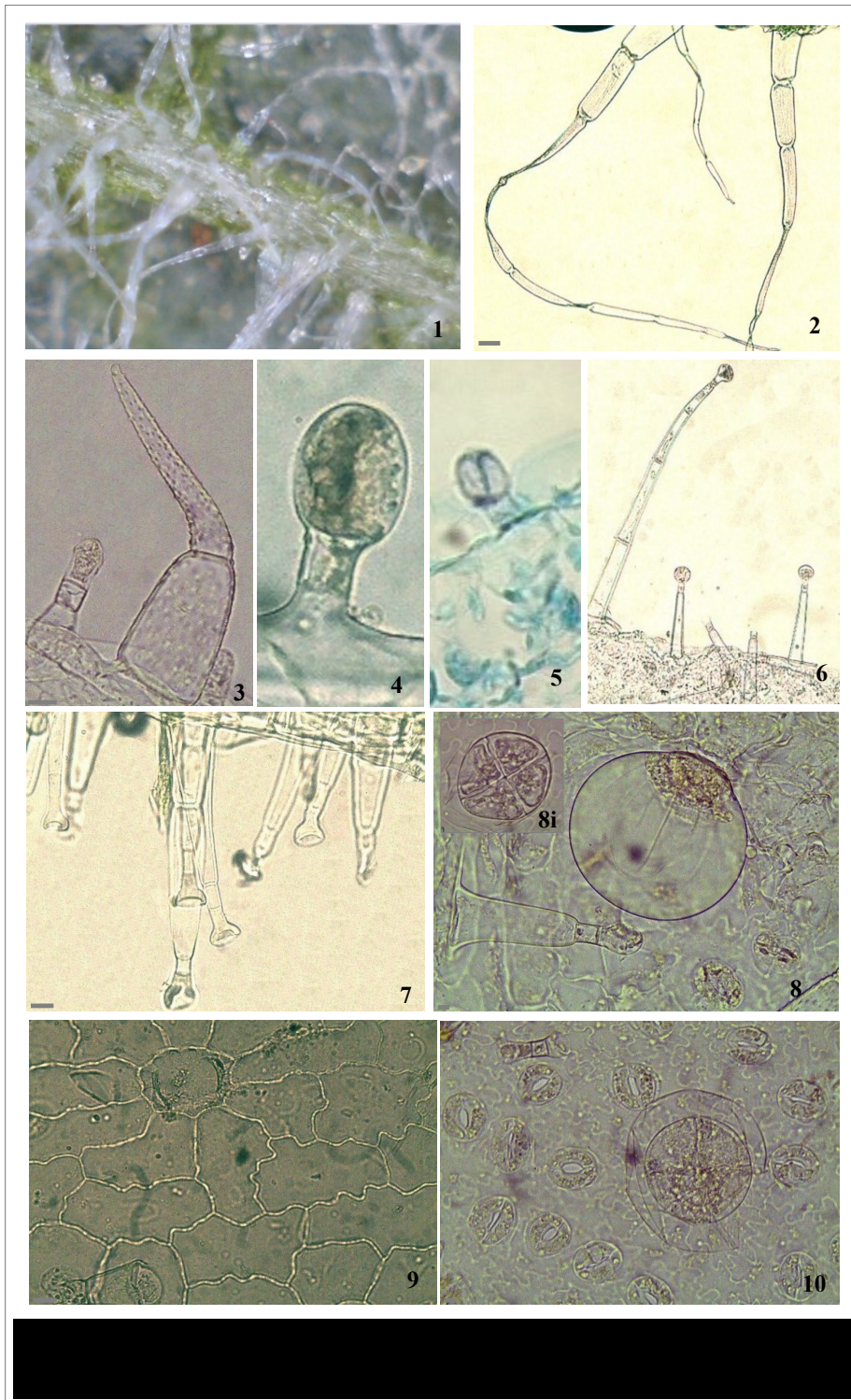
Figura 3.23.9-10.- Visión paradermal de la epidermis foliar al MO. **Figura 3.23.9.-** Epidermis foliar adaxial con estomas diaclíticos. **Figura 3.23.10.-** Epidermis abaxial con estomas diaclíticos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

FIGURA 3.24.- Haz vascular en s.t.

Figura 3.24.1.- Nervio principal en el que se observa la epidermis, parénquima y un único haz vascular. **Figura 3.24.1.1i.-** Panorámico de la hoja en el que muestra la distribución del haz vascular principal y secundarios.

Figura 3.24.2.- Haz vascular principal con organización colateral, floema abaxial respecto al xilema y cambium vascular.

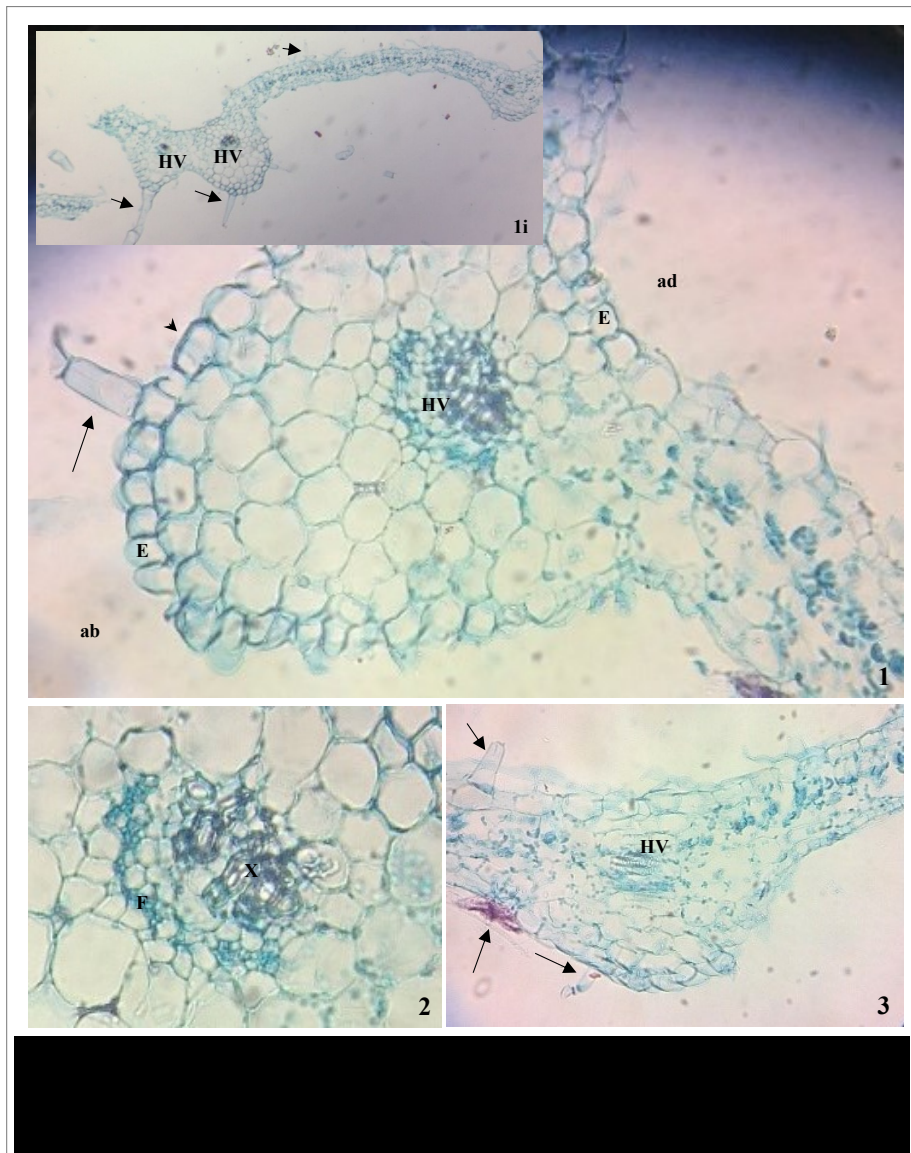
Figura 3.24.3.- Haz vascular de un nervio secundario. Nótese que el haz vascular del nervio secundario está en contacto directo con el parénquima esponjoso por los laterales.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

V.3.2. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL TALLO DE *NEPETA TEYDEA*.

V.3.2.1. PLANTAS DE CAMPO (pC)

La s.t. del tallo en crecimiento primario muestra un contorno cuadrangular con los vértices o esquinas un poco pronunciados, y los lados un poco deprimidos (Fig. 3.25.1). Presenta una epidermis simple, con células de rectangulares a isodiamétricas, protegidas por una cutícula delgada (Fig. 3.25.2-3). Abundante indumento, con tricomas no glandulares simples pluricelulares y unicelulares alargados (se podría poner: tricomas no glandulares uni o pluricelulares, simples y alargados), y tricomas glandulares capitados y peltados, que se hallan presentes en todo el contorno del tallo. Los capitados pueden ser de cabeza y cuello unicelulares y de cabeza y cuello unicelulares y tallo pluricelular (Figs. 3.25.1-3).

Colénquima angular subepidérmico, constituido por 8-10 capas de células en la zona de las esquinas (Fig. 3.25.2), que se reduce a 2-3 capas en la zona entre esquinas (Fig.3.25.3).

Parénquima cortical formado por 3 capas de células de mayor tamaño que las células del colénquima, y con paredes delgadas (Figs. 3.25.2-3).

Haces vasculares abiertos, 4 más grandes, ubicados en las esquinas, y 4 más pequeños, localizados en la zona entre-esquinas (Fig. 3.25.1 y 3.25.3). Xilema centripeto al cambium vascular, formado por vasos de diferentes tamaños con paredes engrosadas. Floema centrífugo al cambium vascular, formado por células de pequeño tamaño y paredes delgadas (Figs. 3.25.2-3). Amplia médula central formada por grandes células parenquimáticas isodiamétricas (Figs. 3.25.1).

La s.t. del tallo en crecimiento secundario muestra el indumento y la epidermis similares a la citada anteriormente para el tallo en crecimiento primario (Figs. 3.26.1-2). Tanto la epidermis como los tejidos corticales se presentan íntegros, aunque las células se disponen compactas y a menudo aplastadas por el crecimiento de los tejidos conductores secundarios, los que se disponen en una sifonostela ectofloica continua (Figs. 3.26.2-3). La médula, en este estadio de desarrollo, se torna fistulosa hacia el centro, quedando el tallo hueco (Fig. 3.26.4).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 3.25.- Tallo en crecimiento primario en s.t.

Figura 3.25.1.- Panorámica que muestra el contorno cuadrangular del tallo, y los tejidos: epidermis, córtex, esclerénquima, haces vasculares y médula.

Figura 3.25.2.- Detalle una esquina del tallo, en el que se observa: epidermis simple con cutícula delgada, colénquima angular subepidérmico, córtex parenquimático, y un haz vascular grande abierto.

Figura 3.25.3.- Detalle de la zona entre-esquina del tallo, en la que se observa: epidermis, colénquima angular subepidérmico, córtex parenquimático, fibras de esclerénquima perivasculares y tres haces vasculares abiertos: uno central de pequeño tamaño y dos haces grandes de los vértices.

Figura 3.25.4.- Detalle de uno de los haces vasculares de la esquina del tallo. Organización colateral, floema abaxial respecto al xilema y cambium vascular, acompañado de fibras de esclerénquima perivasculares.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

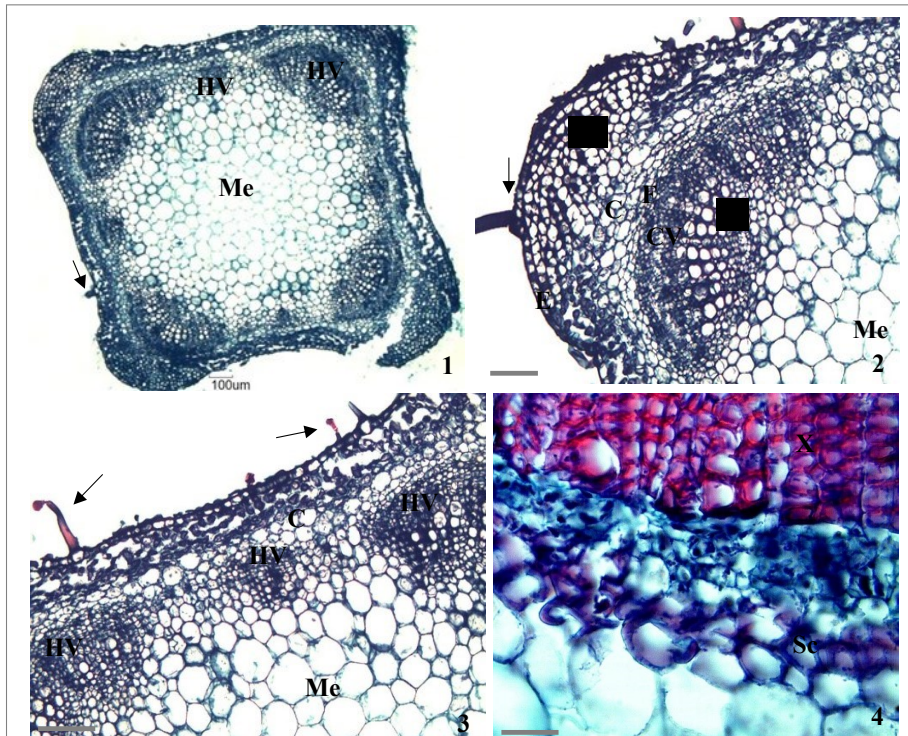


Figura 3.25.- Fotomicrografías al MO, de la hoja de *Nepeta teydea* de pC. C: córtex; Cq: colénquima; CV: cambium vascular; E: epidermis; F: floema; HV: haz vascular; Me: médula; Pe: parénquima esponjoso; Pm: parénquima en empalizada; Sc: esclerénquima; X: xilema; flecha: tricoma. Escala: 100 μ m: 1, 2, 3, 4.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 27/06/2017 09:46:14

JUAN IGNACIO FRIAS VIERA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 19:33:58

FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

29/06/2017 09:05:47

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

18/07/2017 14:28:34

Figura 3.26.- Tallo en crecimiento secundario en s.t.

Figura 3.26.1.- Panorámica que muestra el contorno cuadrangular de un tallo joven, y los tejidos: epidermis, córtex, esclerénquima, haces vasculares y médula parenquimática fistulosa.

Figura 3.26.2.- Panorámico que muestra el contorno casi circular de un tallo maduro, con distribución concéntrica de los tejidos y centro prácticamente hueco.

Figura 3.26.3.- Detalle de la zona de esquina del tallo, que muestra un haz vascular amplio con disposición colateral y fibras de esclerénquima perivasculares. Floema y xilema con engrosamiento de la pared celular.

Figura 3.26.4.- Detalle de la zona entre esquinas del tallo, que muestra: epidermis simple con tricomas, parénquima cortical, un pequeño haz vascular y médula parenquimática.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

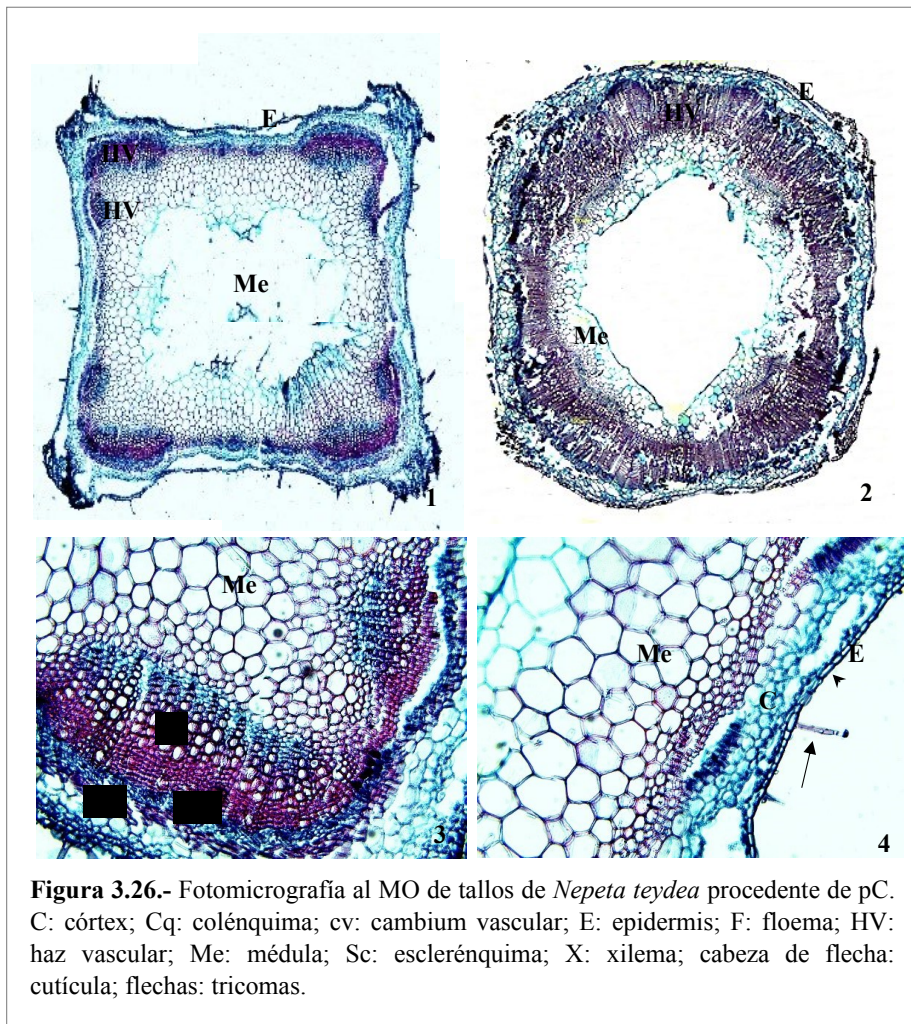


Figura 3.26.- Fotomicrografía al MO de tallos de *Nepeta teydea* procedente de pC. C: córtex; Cq: colénquima; cv: cambium vascular; E: epidermis; F: floema; HV: haz vascular; Me: médula; Sc: esclerénquima; X: xilema; cabeza de flecha: cutícula; flechas: tricomas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 965383		Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14	
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58	
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47	
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34	

V.3.2.2. PLANTAS *IN VITRO* (pIV)

El tallo en s.t. muestra un contorno cuadrangular con los vértices o esquinas poco pronunciados, y los lados no deprimidos (Fig. 3.27.1). Presenta una epidermis simple, uniestratificada con células de rectangulares a isodiamétricas, protegidas por una cutícula delgada (Fig. 3.27.2). Abundante indumento (Figs.3.27.1 y 3.27.3), con tricomas no glandulares simples pluricelulares y unicelulares alargados (se podría poner: tricomas no glandulares uni o pluricelulares, simples y alargados), y tricomas glandulares capitados y peltados, que se hallan presente en todo el contorno del tallo. Los capitados son de cabeza y cuello unicelulares y de cabeza y cuello unicelulares y tallo pluricelular.

Colénquima angular subepidérmico, constituido por 3-4 capas de células en la zona de las esquinas, que se vuelve uniestrato en la zona entre esquinas (Figs. 3.27.1-3).

Parénquima cortical constituido por 3-4 capas de células de mayor tamaño que las células del colénquima, y con paredes delgadas (Figs. 3.27.1-3).

Haces vasculares dispuestos formando en fascículos. Xilema centrípeto al cambium vascular, formado por vasos de diferentes tamaños con paredes engrosadas, más desarrollado en la zona hacia las esquinas (Fig. 3.27.4). Floema centrífugo al cambium vascular, formado por células de pequeño tamaño y paredes delgadas (Fig. 3.27.4). Escasa presencia de fibras de esclerénquima perivasculares con paredes engrosadas (Fig. 3.27.4) y presencia de abundante parénquima interfascicular (Fig. 3.27.5).

Reducida médula central formada por grandes células parenquimáticas de poliédricas (pentagonales y hexagonales) a isodiamétrica (Fig. 3.27.6).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 3.27.- Tallo en s.t.

Figura 3.27.1.- Panorámica que muestra la sección cuadrangular del tallo, y los tejidos: epidermis, colénquima subepidérmico, córtex parenquimático, haces vasculares y médula parenquimática.

Figura 3.27.2.- Detalle de la epidermis simple con cutícula lisa y tricoma. Colénquima subepidérmico y parénquima cortical.

Figura 3.27.3.- Detalle de la distribución de los haces vasculares en el tallo.

Figura 3.27.4.- Haz vascular de la zona de esquina con disposición colateral y fibras de esclerénquima perivasculares.

Figura 3.27.5.- Detalle de la zona entre-esquina, con dos haces vasculares, y parénquima interfascicular entre los haces.

Figura 3.27.6.- Médula parenquimática central con células de diferentes tamaños.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

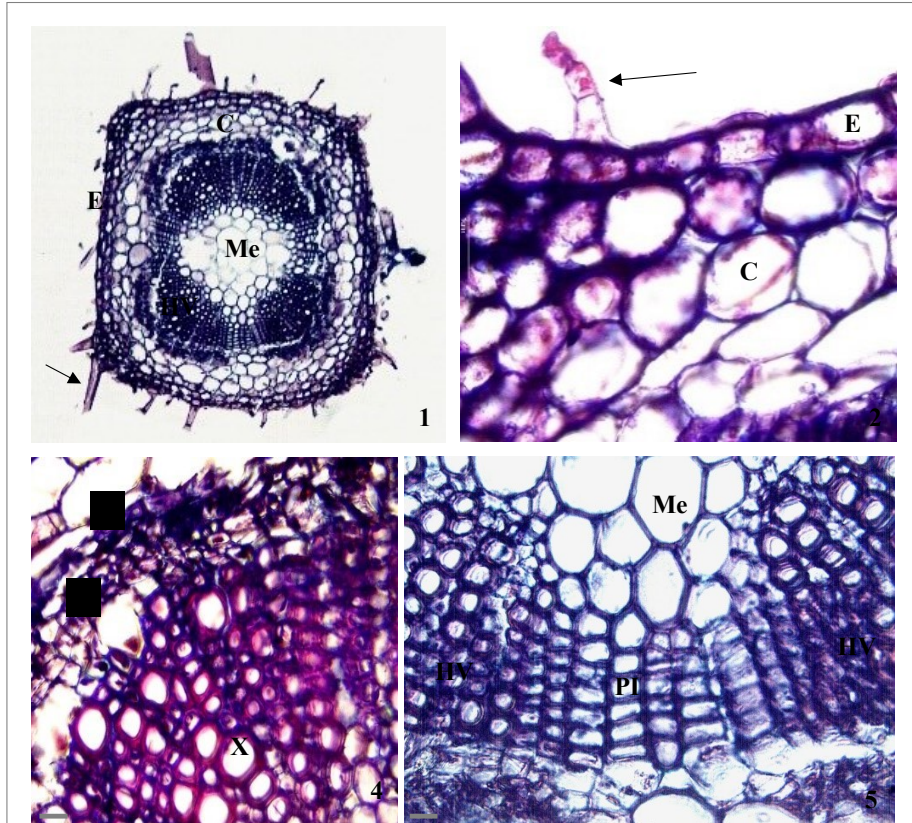


Figura 3.27.- Fotomicrografía al MO de tallos de *Nepeta teydea* procedente de pIV. C: córtex; Cq: colénquima; cv: cambium vascular; E: epidermis; HV: haz vascular; Me: médula; PI: parénquima interfascicular; Sc: esclerénquima; X: xilema; flecha: tricomas. Escala: 10 μ m: 4, 5.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

V.3.2.3. PLANTAS ACLIMATADAS

V.3.2.3.1. PLANTAS ACLIMATADAS A CONDICIONES *EX VITRO* CONTROL (pA)

El tallo en s.t. muestra un contorno cuadrangular con los vértices o esquinas un poco pronunciados (Fig. 3.28.1). Presenta una epidermis simple, uniestratificada con células de rectangulares a isodiamétricas, protegidas por una cutícula delgada (Fig. 3.28.2). Abundante indumento (Figs. 3.28.1-2), con tricomas no glandulares uni o pluricelulares, simples y alargados, y tricomas glandulares capitados y peltados, que se hallan presentes en todo el contorno del tallo. Los capitados pueden ser de cabeza y cuello unicelulares, y de cabeza unicelular y cuello pluricelular.

Colénquima angular subepidérmico (Figs. 3.28.1-2), constituido por 3-4 capas de células en la zona de las esquinas, que se reduce a 1 capa en la zona entre esquinas (Fig. 3.28.1).

Parénquima cortical formado por 5-6 capas de células de mayor tamaño que las células del colénquima, y con paredes delgadas (Fig. 3.28.2).

Haces vasculares pequeños (4) localizados en la zona de esquinas (Fig. 3.28.1). Xilema centripeto al cambium vascular, formado por vasos de diferentes tamaños con paredes engrosadas (Fig. 3.28.4). Floema centrífugo al cambium vascular, formado por células de pequeño tamaño y paredes delgadas. Escasa presencia de fibras de esclerénquima perivasculares con paredes engrosadas (Figs. 3.28.3-4). Parénquima interfascicular con células más pequeñas que las células parenquimáticas de la médula y del córtex, y con paredes engrosadas (Fig. 3.28.5).

Amplia médula central formada por grandes células parenquimáticas de poliédricas a isodiamétricas (Fig. 3.28.6).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 3.28.- Tallo en s.t.

Figura 3.28.1.- Panorámica que muestra la sección cuadrangular del corte, y los tejidos: epidermis, colénquima, córtex parenquimático, haces vasculares y médula parenquimática.

Figura 3.28.2.- Detalle de la zona de esquina. Epidermis simple, con cutícula delgada y tricomas. Colénquima subepidérmico y parénquima cortical.

Figura 3.28.3.- Detalle de la zona entre-esquinas. Parénquima interfascicular entre dos haces vasculares.

Figura 3.28.4.- Disposición colateral del haz vascular de la esquina del tallo. Elementos del xilema con paredes engrosadas, cambium vascular y floema. Presencia de fibras de esclerénquima perivascular.

Figura 3.28.5.- Parénquima interfascicular presente entre los haces vasculares del tallo.

Figura 3.28.6.- Médula central formada por células de diferentes tamaños.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

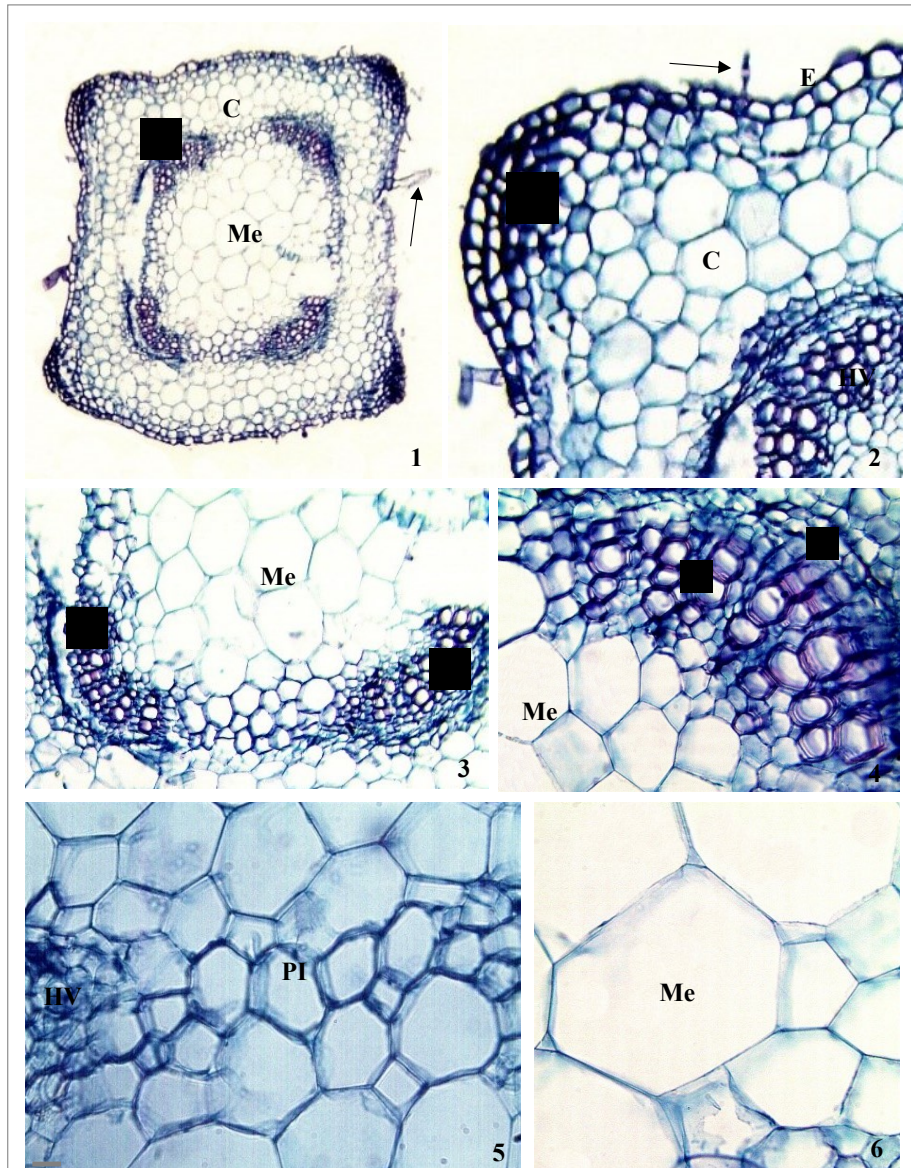


Figura 3.28.- Fotomicrografía al MO de tallos de *Nepeta teydea* procedente de pA. C: córtex; Cq: colénquima; cv: cambium vascular; E: epidermis; HV: haz vascular; Me: médula; PI: parénquima interfascicular; Sc: esclerénquima; X: xilema; flecha: tricomas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

V.3.2.3.2. PLANTAS ACLIMATADAS A CONDICIONES *EX VITRO* TRATADAS CON LUZ ULTRAVIOLETA (pA-UV)

El tallo en s.t. muestra un contorno cuadrangular con los vértices o esquinas un poco pronunciados, y los lados un poco deprimidos hacia el interior (Fig. 3.29.1). Presenta una epidermis simple, con células de rectangulares a isodiamétricas, protegidas por una cutícula delgada (Figs. 3.29.2-3). Abundante indumento (Fig. 3.29.1-3), con tricomas no glandulares uni o pluricelulares, simples y alargados, y tricomas glandulares capitados y peltados, que se hallan presente en todo el contorno del tallo. Existen dos tipos de tricomas glandulares capitados: de cabeza y cuello unicelulares, y de cabeza unicelular y cuello pluricelular.

En la zona cortical de los vértices, se observa colénquima angular subepidérmico (Fig. 3.29.2), constituido por 2-3 capas de células. En la zona entre vértices, no se detecta colénquima subepidérmico (Fig. 3.29.3).

Parénquima cortical formado por 5-6 capas de células de isodiamétricas a poliédricas, de mayor tamaño que las células del colénquima, y con paredes delgadas (Figs. 3.29.1-3).

Haces vasculares (4) de tamaño medio localizados en las esquinas, no acompañado de fibras de esclerénquima. Xilema centripeto al cambium vascular, formado por vasos de diferentes tamaños con paredes engrosadas (Fig. 3.29.4). Floema centrífugo al cambium vascular, formado por células de pequeño tamaño y paredes delgadas (Fig. 3.29.4). Parénquima interfascicular con células de tamaño medio y paredes engrosadas (Fig. 3.29.1).

Amplia médula central de grandes células parenquimáticas de formas variadas, de poliédricas a isodiamétricas (Fig. 3.29.4).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 3.29.- Tallo en s.t.

Figura 3.29.1.- Panorámica que muestra la sección cuadrangular del corte, y los tejidos: epidermis con tricomas, córtex parenquimático, haces vasculares y médula parenquimática.

Figura 3.29.2.- Detalle de la zona de la esquina del tallo. Epidermis simple con cutícula delgada y con tricomas. Colénquima subepidérmico y parénquima cortical.

Figura 3.29.3.- Detalle de la zona entre-esquina. Nótese la ausencia de colénquima subepidérmico.

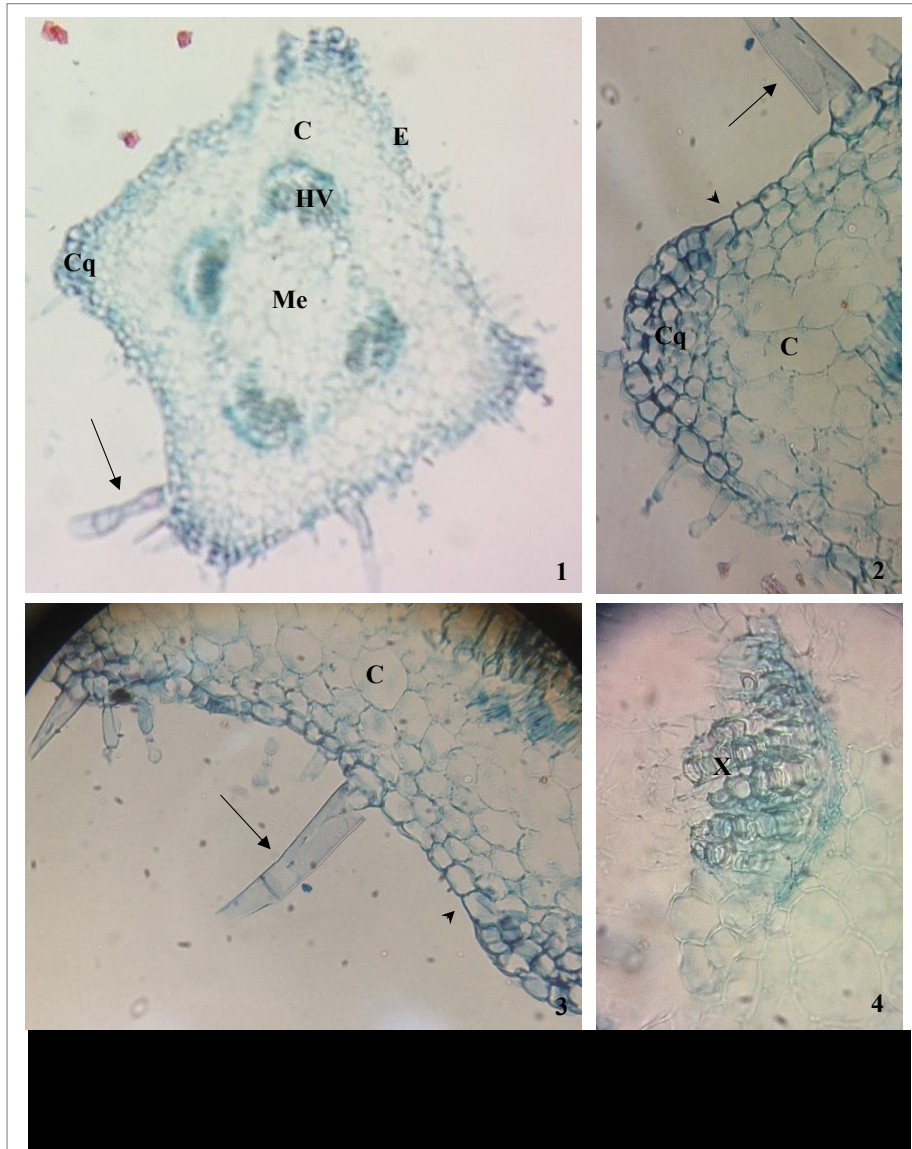
Figura 3.29.4.- Haz vascular con disposición colateral: floema, cambium vascular y xilema. Ausencia de fibras de esclerénquima perivascular.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

V.3.3. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA RAÍZ DE *NEPETA TEYDEA*.

V.3.3.1. PLANTAS DE CAMPO (pC)

La raíz en s.t. muestra una gruesa peridermis multiestratificada con células aplastadas (alargadas, muy apretadas entre sí, de paredes delgadas, de paredes suberizadas o lignificadas (Fig. 3.30.1).

Córtex amplio formado por múltiples capas de células parenquimáticas más o menos isodiamétricas, y escasos espacios intercelulares (Figs.3.30.1).

Cilindro vascular central formado por el tejido vascular y la médula parenquimática, delimitado centrifugamente por el periciclo. El tejido vascular presenta estructura tetraarca, organizado en forma radial, donde el xilema se dispone en cordones o radios separados (y alternos al floema) (actinostela) (Figs. 3.30.1-2). Protoxilema exarco, constituido por vasos de pequeño tamaño con paredes engrosadas y metaxilema interno abundante, formado por vasos de gran tamaño con paredes engrosadas que ocupan el centro del cilindro vascular.

El parénquima medular que se encuentra dentro del cilindro vascular, está formado por células de pequeño tamaño con paredes delgadas (Fig. 3.30.2).

FIGURA 3.30.- Raíz en s.t.

Figura 3.30.1.- Peridermis multiestratificada, ausencia de tricomas radiculares, córtex de células isodiamétricas, con escasos espacios intercelulares. Cilindro vascular rodeado por la endodermis.

Figura 3.30.2.- Detalle del cilindro vascular y la médula.

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

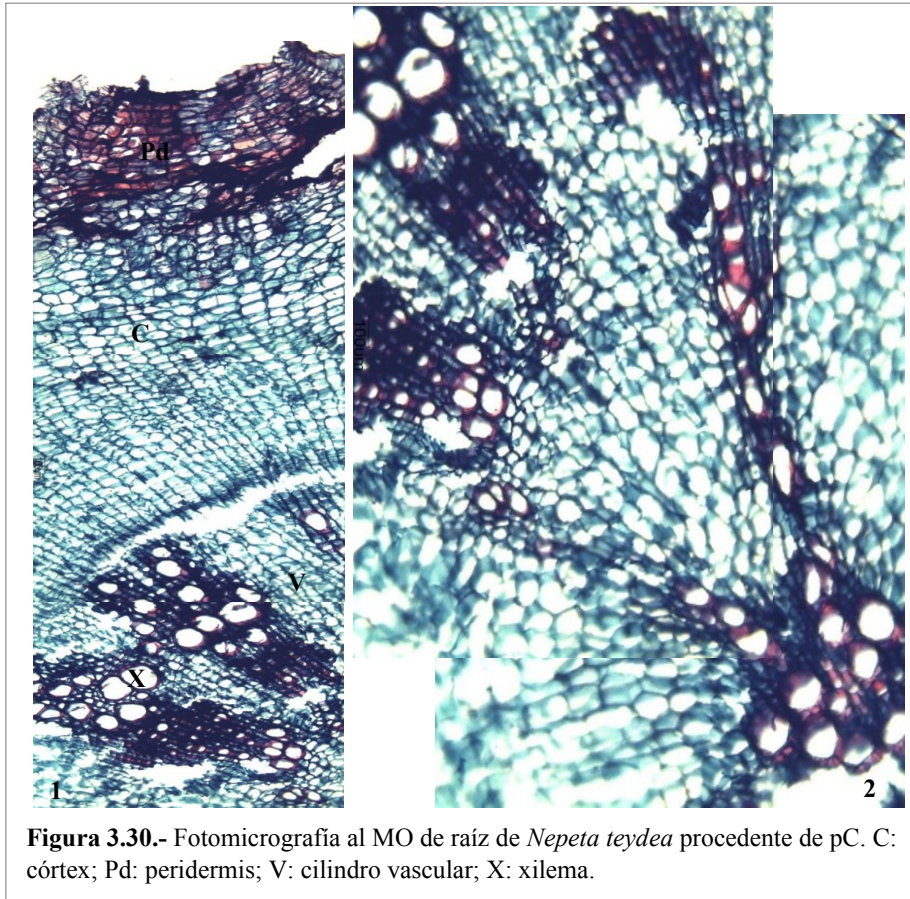


Figura 3.30.- Fotomicrografía al MO de raíz de *Nepeta teydea* procedente de pC. C: córtex; Pd: peridermis; V: cilindro vascular; X: xilema.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 27/06/2017 09:46:14

JUAN IGNACIO FRIAS VIERA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 19:33:58

FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

29/06/2017 09:05:47

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

18/07/2017 14:28:34

V.3.3.2. PLANTAS ACLIMATADA A CONDICIONES *EX VITRO* CONTROL (pA)

La raíz en s.t. muestra una gruesa peridermis multiestratificada con células aplastadas (alargadas, muy apretadas entre sí, de paredes delgadas, de paredes suberizadas o lignificadas (Figs. 3.31.1-2).

Córtex amplio formado por múltiples capas de células parenquimáticas más o menos isodiamétricas, y escasos espacios intercelulares (Figs. 3.31.1-2).

Cilindro vascular central formado por el tejido vascular y la médula parenquimática, delimitado centrífugamente por el periciclo (Figs. 3.31.1 y 3.31.3). El tejido vascular presenta estructura tetraarca, organizado en forma radial, donde el xilema y el floema, se disponen en cordones separados y alternos (actinostela) (Figs. 3.31.1 y 3.31.2-3). Protoxilema exarco constituido por vasos de pequeño tamaño con paredes engrosadas y metaxilema interno abundante, formado por vasos de gran tamaño con paredes engrosadas, que ocupan el centro del cilindro vascular.

El parénquima medular que se encuentra dentro del cilindro vascular, está formado por células de pequeño tamaño con paredes delgadas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

FIGURA 3.31.- Raíz en s.t.

Figura 3.31.1.- Panorámico. Peridermis multiestratificada, ausencia de tricomas radiculares, córtex de células isodiamétricas, con escasos espacios intercelulares.

Figura 3.31.2.- Detalle de la peridermis y el córtex parenquimático.

Figura 3.31.3.- Cilindro vascular rodeado por la endodermis. Periciclo exterior a los haces vasculares.

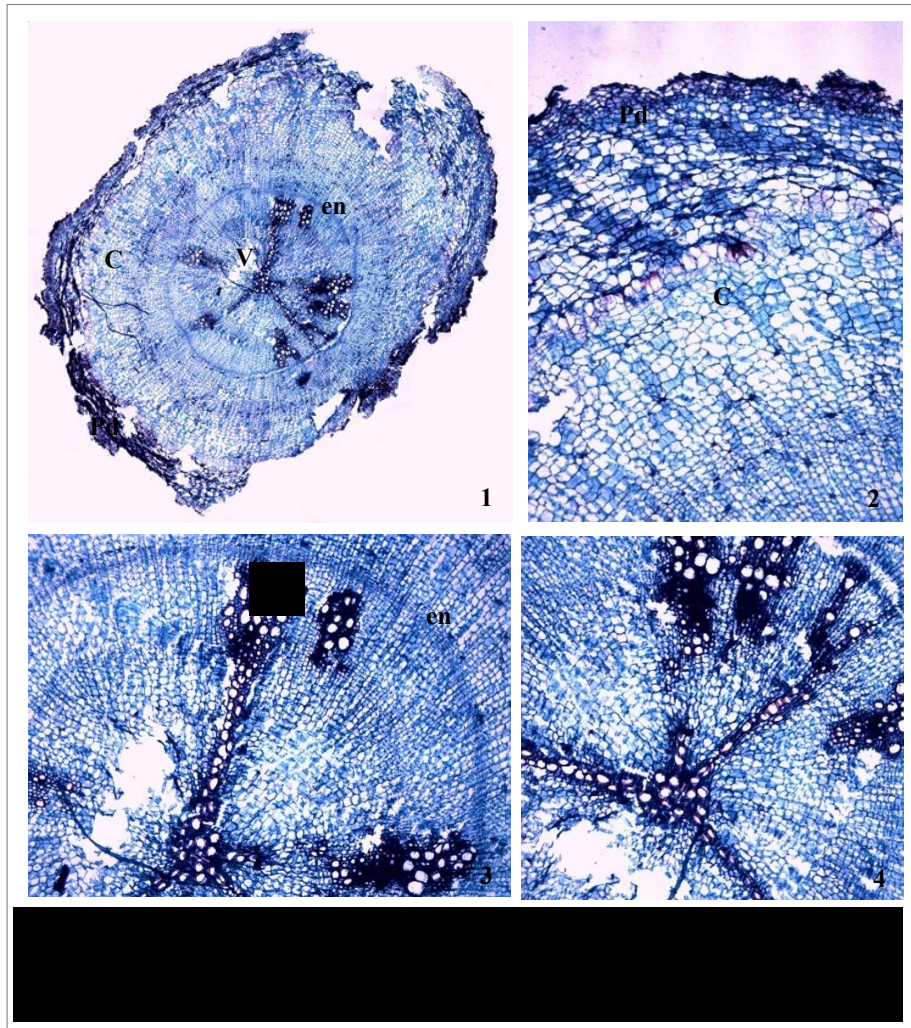
Figura 3.31.4.- Detalle del cilindro vascular y la médula.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

V.4. DISCUSIÓN ESTUDIO HISTOLÓGICO

V.4.1. DISCUSIÓN ESTUDIO HISTOLÓGICO DE PLANTAS DE CAMPO, PLANTAS CRECIDAS EN CONDICIONES *IN VITRO* Y PLANTAS ACLIMATADA A CONDICIONES *EX VITRO*.

Las plantas son organismos pluricelulares, cuyo crecimiento y desarrollo de tejidos y células, dependen tanto de las condiciones intrínsecas del vegetal como de los factores medioambientales del medio en el que viven. Así una planta que se ha desarrollado en condiciones naturales, se encuentra expuesta a las múltiples inclemencias del tiempo (temperaturas extremas, sequía, inundaciones, déficits nutricionales, salinidad y toxicidad por metales pesado del suelo, vientos, etc.), y al ataque de numerosos patógenos. Sin embargo, una planta cultivada en condiciones *in vitro* en un laboratorio, se encuentra sometida a un ambiente controlado, estéril (libre de cualquier microorganismo), donde las condiciones de humedad son altas, la temperatura y fotoperiodo son óptimos para su desarrollo, y en donde los requerimientos nutricionales, incluido la sacarosa, son suministrados a través del medio de cultivo en el que se han sembrado.

Todos estos posibles factores de estrés abióticos y bióticos que puede sufrir una planta en la naturaleza, y las condiciones artificiales que se le proporcionan a una planta *in vitro* para su desarrollo, conllevan una serie de adaptaciones en su fisiología, metabolismo y, por tanto, también en su morfología y anatomía.

V.4.1.1. ANATOMÍA DE LA HOJA

Las hojas de pC mostraron diferencias histológicas importantes con respecto a las de pIV, y de pA. También se detectó alguna variación leve entre las hojas de pIV y de pA.

Los diferentes tejidos de las hojas de las plantas de *Nepeta teydea* estudiadas en esta Tesis muestran un desarrollo y grado de esclerofilia que varía de unas a otras.

V.4.1.1.1. Epidermis

La epidermis de todas las plantas de *Nepeta teydea* estudiadas (pC, pIV y pA), estuvo constituida por células de revestimiento que muestran una morfología irregular, donde las células de la superficie adaxial eran de mayor tamaño que las de la superficie abaxial. Esta diferencia en el tamaño de las células epidérmicas en ambas superficies se

222

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

ha detectado también otras especies de *Nepeta*, como en *N. baytopii* y *N. sorfeare* (Acar et al., 2011).

Además, las células epidérmicas de todas las plantas de *Nepeta teydea*, presentaron paredes anticlinales onduladas. Este tipo de paredes frecuentemente aparecen en especies que están en ambientes xéricos, como es el caso de *Hedeoma ciliolata*, *Poliomntha glabrescens* y *Ziziphora clinopodioides* (Moon et al., 2009).

En todas las hojas estudiadas, las células epidérmicas produjeron una sustancia lipídica impermeable que se depositó en la parte externa de la pared celular para formar la cutícula. Se trata de una cutícula delgada al igual que se observó en otras especies de la familia, como es el caso de hojas de *Rosmarinus officinalis* (Marin et al., 2006).

En la epidermis, se encontraron unas células especializadas en el intercambio gaseoso, las células estomáticas. Todas las hojas de *Nepeta teydea* estudiadas en este trabajo, sin sometimiento a la radiación UV-b, fueron anfiestomáticas, como se ha visto en otras especies del mismo género (Padura, 2006). Además, en nuestro caso como en *Nepeta nuda* (Kofidis & Bosabalidis, 2008), la superficie abaxial mostró una mayor densidad de estomas que la adaxial, lo cual se ha relacionado con la presencia de estas plantas en condiciones xéricas.

En cuanto a la tipología estomática en *Nepeta teydea*, fueron mayoritariamente diacíticos y algunos anomocíticos, con disposición a nivel de las células epidérmicas o ligeramente elevados, siendo esta la misma tipología dada para otras especies de *Nepeta* (*N. cataria*; *N. nuda*; *N. parviflora* y *N. ucraniana*) (Padura, 2006).

Los estomas de las pIV y pA, mostraron morfológicamente características de cierta funcionalidad al presentar células de guarda con forma elíptica, que es la forma que presentan en la mayoría de las plantas desarrolladas en condiciones naturales, y que se ha asociado a un normal funcionamiento estomático (Suárez, 2015).

En todas las hojas de *Nepeta teydea* estudiadas en esta Tesis los estomas normalmente se encuentran separados entre sí por al menos una célula epidérmica, aunque se observó en las hojas de pC, la presencia de grupos de 2 estomas con contacto directo, unidos por las células acompañantes formado los denominados estomas en clúster (Suárez, 2015). Estos patrones atípicos de estomas, con dúo de estomas, también se han observado en otras especies del género, como es el caso de *N. cataria*; *N. nuda*;

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

N. parviflora y *N. ucraniana* (Padura, 2006). La presencia de estos clústeres, se produce cuando durante la formación de un estoma, la célula madre de las células guarda en vez de sufrir una división simétrica, sufre dos, originando dos estomas (Zhao et al., 2006).

Otro tipo de células presentes en la epidermis de las todas las hojas de *Nepeta teydea* estudiadas, fueron los tricomas. Este indumento se ha relacionado con la economía de agua de las plantas al prevenir la pérdida de agua a través de la transpiración, aunque también tiene influencia en otros procesos, como el incremento de la reflectancia de los rayos solares, evitando el calentamiento de la hoja (Vera, 2016) y protegiendo a los tejidos superficiales de la radiación UV.

Las hojas de las plantas de *Nepeta teydea* como la mayoría de las plantas de la familia Lamiaceae, presentaron tricomas glandulares y no glandulares en ambas superficies (Kaya et al., 2006; Marin et al., 2006). Los tricomas glandulares de *Nepeta teydea*, eran principalmente de dos tipos: capitados (con cabeza unicelular con morfología de copa y oblonga, y cabeza unicelular o bicelular esférica, con cuello unicelular y pie unicelular y pluricelular), y peltados (constituidos por una cabeza globosa pluricelular formada por cuatro células con un amplio espacio subcuticular y un cuello muy corto). La morfología de los tricomas glandulares, con algunas variantes en el número del pie y de la cabeza secretora, son comúnmente descritos para muchos géneros de la familia Lamiaceae, y podrían ser considerados como un carácter potencialmente taxonómico (Di Sapio et al., 2012).

Ambos tipos de tricomas también se han detectado en *Nepeta nuda* L. (Kofidis & Bosabalidis, 2008), mientras que en *Nepeta racemosa* y *Salvia aurea* sólo se observaron tricomas capitados con cabeza bicelular, considerándose en este caso una adaptación xeromórfica (Baran et al., 2010). La presencia de tricomas peltados se ha considerado como un sitio primario de la biosíntesis de los aceites esenciales en Lamiaceae (Di Sapio et al., 2012). En cuanto a los tricomas no glandulares, son de color blanco (para que reflejen la luz solar), uniseriados, unicelulares y pluricelulares, con morfología cónica o flageliformes. La presencia de estos tricomas no glandulares simples, es común en la familia Lamiaceae (Di Sapio et al., 2012).

V.4.1.1.2. Tejido fundamental

Las diferencias entre el mesófilo de las pC, pIV y pA son significativas. La organización histológica de las hojas de todas las plantas *Nepeta teydea*, mostró un

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

mesófilo constituido por un parénquima en empalizada hacia el haz y un parénquima esponjoso hacia el envés. El parénquima en empalizada de las pC, mostró dos capas de células parenquimáticas alargadas y escasos espacios intercelulares. Esta característica concuerda con las hojas de otras *Nepeta* de campo, como es el caso de *N. cataria*, (Sarkart et al., 1995), *N. baytopii* y *N. sorgerae* (Acar et al., 2011). Sin embargo, las hojas de pIV y pA, presentaron un parénquima en empalizada constituido por una única capa de células, con más espacios intercelulares.

El área que ocupa el parénquima en empalizada es bastante considerable respecto al esponjoso especialmente en los ejemplares de pC y en menor medida de pA. Mientras que en las hojas de pIV, la superficie que ocupa el parénquima en empalizada es prácticamente igual a la que presenta el esponjoso. Esta característica de las hojas de las pC puede estar relacionada con la existencia de mayor intensidad lumínica en el medio natural, lo que se traduce en una mayor actividad fotosintética (Fahn, 1982). El menor desarrollo del parénquima en empalizada en las pIV se explicaría, además de por la menor irradiancia en el interior de las cámaras de cultivo, por la presencia de sacarosa en el medio de cultivo, que convierte a las vitroplantas en organismos con poca actividad fotosintética (Hazarika, 2006).

Se han observado cambios anatómicos similares en hojas *in vitro* de otras plantas, como es el caso de plantas de *Dianthus caryophyllus* (Leshem, 1983), donde se redujo el número de estratos de parénquima en empalizada, con abundantes espacios intercelulares en el mesófilo o en plantas de *Fragaria* L. (Fabbri et al., 1986), donde se observó un escaso desarrollo del parénquima en empalizada, aumentando además los espacios intercelulares en el parénquima esponjoso.

El parénquima esponjoso de todas las plantas de *Nepeta teydea*, presentaron un parénquima esponjoso constituido por células parenquimáticas irregulares, que en el caso de las pC, eran alargadas, mientras que en las pIV y pA, eran más o menos redondeadas, de diferentes tamaños y con bastantes espacios intercelulares. Además, se detectó que el parénquima esponjoso estaba menos organizado y con más espacios intercelulares en las pIV y pA, que en las pC. Esta pobre diferenciación del mesófilo y la gran cantidad de espacios intercelulares son características que presentan las hojas de plantas cultivadas *in vitro* como consecuencia del microambiente que se crea dentro de los recipientes de cultivo (Suárez, 2015).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

En cuanto a la presencia de cloroplastos en las hojas, observamos que todas las plantas de *Nepeta teydea* presentaron cloroplastos tanto en las células del parénquima en empalizada como en el parénquima esponjoso. Sin embargo, la cantidad de cloroplastos fue mucho mayor en las pC que en las pIV y pA. Esta información coincide con los datos aportados en estudios con plantas *in vitro* e *in vivo* de *Jatropha curcas*, en donde se observó que, en el mesófilo de las hojas de plantas propagadas *in vitro*, se produjo una reducción de cloroplastos (Isah, 2005). Además, hay que tener en cuenta que las pIV se han desarrollado en un medio al que se ha adicionado una fuente de carbono, reduciéndose por tanto la necesidad de realizar la fotosíntesis, por lo que es normal que en estas plantas se observe una disminución del sistema fotosintético. En cuanto a las pA, el que no presente tanta cantidad de cloroplasto como las pC, puede ser debido a que estas plantas provienen de pIV, y a que aunque están sometidas a una intensidad de luz mayor que a las condiciones de la cámara de incubación, nunca equiparable a las condiciones lumínicas de las plantas en condiciones naturales.

V.4.1.1.3. Tejido de sostén

Con respecto a los tejidos de sostén, se aprecia una diferencia importante en las pC con respecto a las pIV y pA. Las pC muestran en la zona del nervio principal de la hoja, 1-2 capas de colénquima subepidérmico de tipo angular o lagunar, en ambas superficies. Sin embargo, en pIV y pA, no se observa este tejido.

La presencia de colénquima subepidérmico se ha descrito también en otros miembros de la familia Lamiaceae como *Salvia hispanica* L. (Di Sapio et al., 2012). El colénquima confiere a la hoja una notable resistencia mecánica (Vera, 2016), y quizás sea esa misma la razón por la cual, sólo aparece colénquima en las pC, que crecen en zonas expuestas al viento.

V.4.1.1.4. Tejido vascular

Todas las plantas *Nepeta teydea* estudiadas mostraron haces vasculares con organización colateral, con floema abaxial respecto al xilema. Además, los haces vasculares presentaron diferentes tamaños, siendo mayores en el nervio principal que en los nervios secundarios de la hoja.

El tejido vascular del nervio principal de la hoja de las pC, presentó un haz vascular de gran tamaño localizado en la zona central del nervio, que se encontró

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

flanqueado por los laterales, por dos haces vasculares de menor tamaño. Esto concuerda con el tejido vascular de *Nepeta cataria* (Sarkart et al., 1995).

En el caso de las pIV y en las pA, el nervio central de las hojas, presenta un único haz vascular centralizado, sin pequeños haces laterales que lo acompañen. La reducción del número de haces vasculares en el mesófilo también se ha observado en plantas de *Jatropha curcas* cultivadas en condiciones *in vitro* (Rodrigues et al., 2014).

En general, las células floemáticas de todas las plantas, fueron de pequeño tamaño, irregulares y con paredes delgadas. En cuanto a los elementos del xilema, eran vasos de diferentes diámetros con paredes engrosadas. El parénquima asociado a los haces vasculares destacó por estar constituido por células parenquimáticas de gran tamaño en todas las plantas estudiadas.

V.4.1.2. ANATOMÍA DEL TALLO

Los tallos primarios de todas las plantas de *Nepeta teydea* estudiadas, presentaron un contorno cuadrangular, característico de la familia Lamiaceae. Sin embargo, cuando el tallo de *Nepeta teydea* adquiere características de crecimiento secundario, el contorno del mismo se torna subcircular. (Di Sapio et al., 2012)

V.4.1.2.1. Epidermis

La epidermis de todos los tallos de las plantas de *Nepeta teydea* estudiados, no mostraron diferencias significativas. Se trata de una epidermis simple, uniestratificada, que exhibió células con morfología de rectangular a isodiamétricas, protegidas por una delgada cutícula, que tiene la misma función protectora que la cutícula foliar. La presencia de una cutícula delgada también se ha registrado en especies de la familia como es *Hyssopus officinalis* L. (Toma et al., 2004).

Los tallos de todas las plantas de *Nepeta teydea* estudiadas (pC, pIV y pA), no presentaron estomas a nivel de la superficie epidérmica, pero si se observó la presencia de indumento, presentando todos, el mismo tipo de tricomas glandulares y no glandulares que en las hojas. Su función al igual que ocurre con los tricomas foliares, es la prevención de la pérdida de agua y protección de los tejidos caulinares de la radiación solar (Vera, 2016).

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

La epidermis de los tallos en crecimiento secundario de *Nepeta teydea*, se presenta íntegra, estando además las células más compactas debido seguramente al crecimiento de los tejidos conductores.

V.4.1.2.2. Córtex

En todos los tallos de *Nepeta teydea*, se observó colénquima subepidérmico formando un tejido continuo bajo la epidermis. Éste mostró un número variable de capas celulares, de modo que, su distribución no es uniforme en todo el perímetro del tallo, siendo mayor el número de capas de colénquima en la zona de las esquinas que en la zona entre esquinas como ocurre en diversos miembros de la familia Lamiaceae (Di Sapia et al., 2012), aunque la diferencia en el número de capas de colénquima en las esquinas, es muy variable dentro de la familia. Así, por ejemplo, en *Thymus* se observa un número de 1-2 capas de colénquima, en *Ziziphora* presenta 4 capas, en *Nepeta fissa* y en *Nepeta leucostegia*, es de 1 única capa (Hatamneia, et al., 2008), y en las *Nepeta baytopii* y en *Nepeta Sorgerae*, es de 5-8 capas, mientras que otras especies estudiadas, mostraron de 9-12 capas (Acar et al., 2011).

El tejido colenquimático de las pC en la zona de las esquinas, estaba formado por 8-10 capas celulares y en la zona entre esquinas, se redujo a 2-3 capas. Sin embargo, en el tallo de las pIV y pA, en la zona de las esquinas fue de 3-4 capas celulares y en la zona entre vértices se redujo a una única capa. Esta diferencia en cuanto al número de capas de colénquima en pC, pIV y pA es la causante de que las esquinas sean más pronunciadas en las pC.

El colénquima, está constituido por células vivas que tienen la capacidad de engrosar sus paredes celulares, lo cual le confiere una gran resistencia mecánica. Todo esto lo convierte en el principal tejido de sostén en los órganos que se están creciendo, ya que puede adaptarse al crecimiento de cada una de las estructuras de las plantas en las que se encuentre durante su desarrollo.

La existencia de un mayor desarrollo de este tejido en los tallos de pC, con respecto a los tallos de las pIV y las pA, se puede explicar por las diferentes condiciones del medio en el que viven. Se sabe que las distintas especies vegetales responden de diferente manera a la perturbación mecánica, desarrollando distintas arquitecturas mecánicas (Victor & Rowe, 2011). Así los tallos de pC, afectados constantemente por fuertes rachas de vientos, han desarrollado más tejido colenquimático, para mantener

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

sus tallos autosostenibles y verticalmente estables. En cambio, las pIV y pA, que no han sufrido tantas perturbaciones mecánicas, han desarrollado menos capas de colénquima, presentando tallos muy flexibles y rastreros.

En el córtex, las células parenquimáticas de los tres tipos de plantas estudiadas (pC, pIV y pA) presentaron una morfología similar, con escasos espacios intercelulares. Aunque se observó leves diferencias en cuanto al número de capas de células que componen este tejido, variando de entre 3-6 capas. Estos datos se encuentran dentro de los límites establecidos para el género *Nepeta*, donde el número de capas de parénquima de los tallos varía desde 3 a 8 capas, dependiendo de la especie de *Nepeta* estudiada (Hatamneia, et al., 2008).

El córtex de los tallos en crecimiento secundario de *Nepeta teydea*, se presentó íntegro, aunque las células están más compactas y aplastadas, debido probablemente al crecimiento de los tejidos conductores.

V.4.1.2.3. Esclerénquima y tejido vascular

Los tallos de las pC presentaron fibras de esclerénquima perivasculares con paredes engrosadas, lo cual es característico de la familia Lamiaceae (Dinç & Doğu, 2012) y se relaciona con una adaptación al escleromorfismo/xeromorfismo (Fahn & Broide, 1963). El número de capas de esclerénquima varía dentro del género, de manera que en *N. baytopii* es de 1-2, y en *N. sorgerae* de 1-5 (Acar et al., 2011).

Sin embargo, en los tallos de las pIV y pA se observó una escasa presencia de estas fibras. De hecho, se ha confirmado de un menor desarrollo del esclerénquima en plantas crecidas en condiciones *in vitro* con respecto a las plantas de campo (Hazarika, 2006).

Los tres tipos de plantas presentaron haces vasculares abiertos con organización colateral, con floema abaxial respecto al xilema. Sin embargo, se observó diferencias en cuanto al número, tamaño y disposición de los haces vasculares. Así, en los tallos de las pC, observamos 4 grandes haces vasculares ubicados hacia las esquinas del tallo y 4 pequeños localizados en la zona media entre esquinas. El número de haces vasculares es muy variable dentro de la familia Lamiaceae, pudiendo encontrarse desde 17 haces en *Nepeta fissa* a 7 en *Thymus* (Hatamneia et al., 2008). En los tallos de las pIV, nos encontramos con un tejido vascular en el que el xilema se presentó altamente

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

desarrollado hacia las esquinas; y por último, en los tallos de las pA, se aprecian solo 4 haces vasculares de pequeño tamaño hacia las esquinas.

El que las pIV muestren vasos xilemáticos grandes y en mayor número en comparación con las pC y las pA, puede deberse a que las plantas en condiciones *in vitro*, crecen y se desarrollan en un medio que contiene una gran cantidad de agua, y por esta razón, el xilema se desarrolla en mayor cantidad. De hecho, la presencia de vasos del xilema de mayor calibre, se ha relacionado con una conductancia hidráulica superior (Rodríguez- Gamir et al., 2010), considerándose un xilema eficiente, aquel que presenta conductos anchos y vasos largos (Bresta et al., 2011).

En cuanto a las pC y las pA, el que presenten un menor desarrollo de los tejidos vasculares, se podría explicar, porque la disponibilidad de agua en estas condiciones es mucho menor que en el caso de las pIV, también se ha propuesto esta característica, como un mecanismo de seguridad que presentan estas plantas de crecimiento normal ante el estrés hídrico (Solla, 2000).

En todos los casos, el floema centrífugo al cambium vascular, presentó células irregulares de pequeño tamaño y paredes delgadas, y los elementos del xilema, de manera generalizada, mostraron vasos de diferentes tamaños o diámetros, con paredes engrosadas.

La presencia de parénquima interfascicular en los tres tipos de plantas se aprecia también en algunas especies de la familia Lamiaceae, como son *Lamium lycium* y *Salvia halophila* Hedge (Celep et al., 2011).

La médula central presentó en todos los casos, pocos espacios intercelulares. La presencia de una médula amplia, constituida por grandes células parenquimáticas de isodiamétricas a poliédricas en las pC y pA podría ser otra de las características xeromórficas de estas plantas (Suárez, 2005), debido a su función de almacenamiento de agua. Las pIV mostraron una médula reducida, debido posiblemente a que estas plantas se han desarrollado en un ambiente con mayor disponibilidad de agua que las plantas en condiciones naturales.

Durante el desarrollo secundario del tallo de *Nepeta teydea*, los haces vasculares dejan de estar localizados en fascículos, y se disponen en sifonostela ectofloica

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

continua, a la vez que la médula parenquimática se vuelve fistulosa, quedando finalmente, un tallo hueco (Di Sapio et al., 2012).

V.4.1.3. ANATOMÍA DE LA RAÍZ

Las raíces de *Nepeta teydea* procedentes de pC y de pA, no presentaron diferencias significativas en su anatomía radicular, por lo que suponemos han completado su proceso de aclimatación con éxito.

V.4.1.3.1. Epidermis

Las raíces de las pC y pA presentan un rizoma que muestra una gruesa peridermis multiestratificada, formada por células irregulares aplastadas con paredes muy lignificadas y sin espacios intercelulares como en *Salvia quezelli* (Celep et al., 2014).

V.4.1.3.2. Córtex

La raíz de ambos tipos de plantas, exhibió un parénquima cortical grueso, constituido por múltiples capas de células con morfología más o menos isodiamétricas y escasos espacios intercelulares, como en *Salvia quezelli* (Celep et al., 20014).

V.4.1.3.3. Cilindro vascular

El cilindro vascular de las raíces de ambos tipos de plantas, está delimitado por el periciclo y constituido por el tejido vascular y una médula meristemática.

La estructura del tejido vascular es tetrarca, organizada en forma radial, donde el xilema se dispone en cuatro cordones o radios separados (actinostela).

El parénquima medular que se encuentra dentro del cilindro vascular en forma de radios localizados entre los cordones xilemáticos. Presentó células de pequeño tamaño con paredes delgadas.

En la literatura, existe muy poca información acerca de la anatomía radicular de la familia Lamiaceae, destacándose el número de filas de células que componen los radios medulares en *Salvia tchihatcheffi* y *Salvia forskahlei* (Aktaş et al., 2009).

V.4.2. DISCUSIÓN ESTUDIO HISTOLÓGICO DE PLANTAS ACLIMATADAS A CONDICIONES *EX VITRO* SIN TRATAMIENTO CON LUZ

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

ULTRAVIOLETA-B Y PLANTAS ACLIMATADAS A CONDICIONES *EX VITRO* CON TRATAMIENTO CON LUZ ULTRAVIOLETA-B.

La influencia de la radiación UV-b en las plantas ha sido ampliamente estudiada debido a que un aumento de esta radiación, puede inducir importantes efectos negativos en diversos procesos de la planta, tales como la fotosíntesis, la transpiración, el crecimiento, desarrollo y morfogénesis (Chen et al., 2016).

V.4.2.1. ANATOMÍA DE LA HOJA

La estructura de la hoja es importante para la atenuación de la mayoría de las radiaciones solares incidentes en las plantas. Por ello, es habitual que se produzcan cambios en la anatomía de la hoja como resultado de la radiación UV-b (Kakani et al., 2003).

V.4.2.1.1. Epidermis

Las hojas de ambas plantas, pA y las pA-UV, presentan epidermis simple, formada por células epidérmicas isodiamétricas, con paredes anticlinales sinuosas u onduladas, protegidas por una cutícula delgada. Las células epidérmicas de la superficie adaxial son de mayor tamaño que las de la superficie abaxial. Además, ambas epidermis presentan tanto tricomas glandulares como los tricomas no glandulares, que no mostraron diferencias estructurales. Los tricomas como ya se comentó anteriormente, pueden jugar un papel importante en la adaptación al medioambiente con altos niveles de irradiancia, ayudando a la reflectancia de la luz.

La presencia de depósitos fenólicos en la epidermis en algunas plantas, como ya se ha mencionado anteriormente, confiere fotoprotección a los tejidos vegetales, al igual que lo hace, la presencia en algunos géneros de la familia Lamiaceaea, de una hipodermis colenquimática (que se introduce en el mesófilo alcanzando los haces vasculares) (Muñoz, 2002), que atenúa la radiación solar que llega al mesófilo al aumentar la cantidad de tejido que debe ésta atravesar (Suaréz, 2015). Sin embargo, ninguna de estas características se ha observado en las hojas de *Nepeta teydea* procedentes de pA y pA-UV, por lo que suponemos que su papel sería asumido por la existencia de otros mecanismos de protección de la planta.

En cuanto a la presencia de estomas, observamos que la lámina en pA fue anfiestomática, con estomas que se encuentran al mismo nivel o ligeramente elevados al

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

resto de las células epidérmicas. Mientras que en pA-UV, la lámina fue hipostomática, con gran cantidad de estomas que se encuentran a un nivel más elevado que el resto de las células epidérmicas. Este dato, está en contra posición, con los efectos de la radiación UV-b, llevados a cabo en las especies vegetales *Taxus chinensis* var. *mairei* (Zu et al., 2010) y *Gossypium hirsutum* L. (Kakani et al., 2003), donde se aprecia un aumento del índice estomático en la superficie adaxial con la aplicación de luz ultravioleta.

La explicación de esta diferencia pensamos que radica en la cutícula. En el caso de nuestras pA-UV, su delgada cutícula se sigue manteniendo igual que en las plantas no sometidas a tratamiento con luz ultravioleta, por lo que la planta se ha adaptado a este estrés, confinando sus estomas sólo en superficie abaxial, que está menos expuesta a la radiación UV-b. Sin embargo, en las plantas de *Gossypium hirsutum* L., la radiación UV-b indujo un aumento en el contenido de las ceras epicuticulares, que incrementan la reflectancia en la región del ultravioleta. (Kakani et al., 2003).

V.4.2.1.2. Tejido fundamental

El mesófilo es dorsiventral en ambas plantas. En las pA estaba formado por un una capa de parénquima en empalizada más o menos organizado, cuyas células era alargadas con espacios intercelulares y cloroplastos distribuidos homogéneamente por todo el lumen celular, y un parénquima esponjoso que estaba poco organizado. En las pA-UV el parénquima en empalizada se mostró poco organizado con numerosos espacios intercelulares, cuyas células eran menos largas que en las pA y los cloroplastos parece que se concentran hacia la zona más interna del mesófilo, y un parénquima esponjoso desorganizado y con numerosos espacios intercelulares.

El que las hojas de pA-UV muestren una pobre diferenciación del mesófilo, formado por células más redondeadas que alargadas, de diferentes tamaños y grandes espacios intercelulares, nos indica que su hoja se ha visto modificada por la acción de la radiación ultravioleta. Se ha observado que en plantas de *Gossypium hirsutum* L., y de *Laurelia sempervirens* sometidas a luz ultravioleta, presentan un tejido parenquimático en empalizada con numerosos espacios intercelulares (Kakani et al., 2003) que acumulan aire saturado de humedad, que afecta a la reflectancia (Kakani et al., 2003), y también actúan como un aislante térmico (Carvajal, 2005).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

El hecho de que en las pA-UV los cloroplastos de las células del parénquima en empalizada no se encuentren distribuidos homogéneamente sino concentrados hacia la zona más interna del mesófilo, puede considerarse una estrategia para protegerlos de la radiación UV-b.

Durante más de un siglo se ha reconocido que los cloroplastos alteran su distribución dentro de las células vegetales dependiendo de las condiciones de luz externa (Eckardt, 2003). El movimiento de los cloroplastos es importante para la supervivencia de la planta bajo luz intensa y también para realizar una fotosíntesis eficiente bajo condiciones de luz débil. Así los cloroplastos se mueven hacia el área irradiada con respuesta débil (conocida como respuesta de acumulación de los cloroplastos), para absorber más luz, permitiendo una fotosíntesis eficiente en el vegetal. Sin embargo, los cloroplastos reaccionan alejándose de la luz fuerte cuando se irradia directamente (conocida como respuesta de evitación de los cloroplastos), evitando de esta manera el daño causado por la absorción del exceso de luz (Wada, 2013).

De manera que el movimiento de los cloroplastos a áreas lejos de la incidencia de la intensa luz ofrece protección contra el daño fotooxidativo. Se demostró en un estudio con mutantes de *Arabidopsis thaliana* defectuosos en el movimiento de evitación de cloroplastos a luz fuerte, que estos mutantes eran más sensibles a la fotoinhibición que las plantas silvestres bajo condiciones de altas intensidades de luz, lo que confirma la importancia fisiológica de este fenómeno (Eckardt, 2003).

Por otro lado, la presencia de un parénquima desordenado con numerosos espacios intercelulares en las pA-UV, es el mismo efecto que produce la luz ultravioleta en otras plantas como *Morus alba* (Chen et al., 2016).

V.4.2.1.3. Tejido de sostén

Los nervios principales de las hojas de las pA y las pA-UV, no presentaron colénquima subepidérmico de tipo lagunar-angular en ninguna de las dos superficies epidérmicas, y tampoco mostraron fibras esclerenquimáticas perivasculares. Esto nos indica, que la radiación UV-b, no afectó a los tejidos de sostén de las plantas de *Nepeta teydea*.

V.4.2.1.4. Tejido vascular

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Los haces vasculares de ambas plantas, presentaron organización colateral (floema abaxial respecto al xilema), rodeados de abundante parénquima. Las pA y las pA-UV, presentan similitudes en el haz vascular principal en cuanto a que, muestran un cambium vascular formado por 2-3 capas de células alargadas y un casquete de fibras floemáticas de pequeño tamaño y paredes delgadas. Sin embargo, se observan diferencias con respecto a la cantidad de xilema, siendo el xilema de las pA-UV es más escaso que el de las pA.

V.4.2.2. ANATOMÍA DEL TALLO

En ambos tipos de plantas, los tallos presentaron contorno cuadrangular, con esquinas un poco pronunciadas, y en los que no se apreció diferencias importantes a nivel de los diferentes tejidos. Esto indica, que la radiación UV-b aplicada en nuestros ensayos no afectó a la macroestructura del tallo.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

V.5. BIBLIOGRAFÍA

- Acar M, Ozcan T, Satil F, Dirmenci T. 2011.** A comparative anatomical study on two endemic *Nepeta* L. especies (*N. baytopii* and *N. sorgerae*). *Biological Diversity and Conservation* 4/3: 58-70.
- Alemán GS, Fuentes L, Dominguez SA, Pérez HY. 2007.** Los estudios histológicos como base para la interpretación de las respuestas fisiológicas en las plantas. Universidad de Matanzas. Facultad de Agronomía. Matanzas, Cuba. <<http://monografias.umcc.cu/monos/2007/agronomia/m07119.pdf>> (Consultado: 25/06/2016).
- Aktaş K, Özdemir C, Özkan M, Akyol Y, Baran P. 2009.** Morphologica and anatomical characteristics of *Salvia tchihatcheffii* endemic to Turkey. *Afr J Biotechnol* 8 (18): 4519-4528.
- Baran P, Aktaş K, Özdemir C. 2010.** Structural investigation of the glandular trichomes of endemic *Salvia smyrnea* L. *South Afr J Bot* 76: 572-578.
- Bresta P, Nikolopoulos D, Economou G, Vahamidis P, Lyra D, Karamanos A, Karabourniotis, G. 2011.** Modification of water entry (xylem vessels) and water exit (stomata) orchestrates long term drought acclimation of wheat leaves. *Plant and Soil* 347: 179-193.
- Buvat R. 1989.** Ontogeny, cell differentiation and structure of vascular plants. Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. New York.
- Carvajal NMS. 2005.** Determinación de pigmentos foliares mediante técnica HPLC en *Laurelia sempervirens* tratadas con suplemento de radiación UV-b y su efecto en el crecimiento. Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al título de Químico farmacéutico. Director/es: Susan Hess F y Magdalena

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Romera A. Escuela de Química y Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile.

- Celep F, Kahraman A, Atalay Z, Doğan. 2011.** Morphology, anatomy and trichome properties of *Lamium truncatum* Boiss. (Lamiaceae) and their systematic implications. *Aust J Crop Sci* 5 (2):147-153.
- Celep F, Kahraman A, Atalay Z. 2014.** Morphology, anatomy, palynology, mericarp and trichome micromorphology of the rediscovered Turkish endemic *Salvia quezelii* (Lamiaceae) and their taxonomic implications. *Plant Syst Evol* 300: 1945-1958.
- Chen M, Huang Y, Liu G, Qin F, Yang S, Xu X. 2016.** Effects of enhanced UV-B radiation on morphology, physiology, biomass, leaf anatomy and ultrastructure in male and female mulberry (*Morus alba*) saplings. *Environ Exp Bot* 129:85-93.
- Cortés BF. 1986.** Cuadernos de Histología Vegetal. 2ª Ed. Marban S.A. Madrid.
- Cutler DF, Botha T, Stevenson DW. 2007.** Plant Anatomy. An applied approach. Blackwell Publishing.
- Esau K, Eichhorn SE. 2007.** Esau's Plant Anatomy: meristems, cells, and tissues of plant body: their structure, function and development. Eds. Hoboken. New Jersey.
- Di Sapia O, Bueno M, Busilacchi H, Quiroga M, Severin C. 2012.** Caracterización Morfoanatómica de Hoja, Tallo, Fruto y Semilla de *Salvia hispánica* L. (Lamiaceae). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 11(3): 249-268.
- Dickinson WC. 2000.** Integrative plant anatomy. Eds. Academic Press. U.S.A.
- Dinç M, Doğu S. 2012.** Anatomical and micromorphological studies on *Teucrium* sect. *Isotriodon* (Lamiaceae) in Turkey with a taxonomic note. *Biol* 67(4):663-672.
- Fabbri A, Sutter E, Dunston S. 1986.** Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. *Scientia Hort* 28: 331-337.
- Fahn A. 1982.** Plant Anatomy. 3^{er} Ed. Pergamon Press, Oxford.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Fahn A, Broico S. 1963.** The primary vascularization of the stem and leaves of the genera *Salsola* y *Suaeda* (Chenopodiaceae). *Phytomorphology* 13: 156-165.
- García AMI, García ROE, Borges ChME, Redondas MA, Rodríguez FJ, García CRD. 2011.** Análisis de la radiación solar ultravioleta en Tenerife como posible herramienta para el uso de Tratamientos Fotocatalíticos de Oxidación Avanzada en la depuración de aguas residuales. Nota técnica digital del: Proyecto Fin de Máster de Ingeniería Química “Intensificación en Investigación en Ingeniería Química, Ambiental y Alimentaria. ULL- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Edita: Agencia Estatal de Meteorología.
- Gokul H, Thejvalhi DH, Joshi S. 1996.** Differentiation of sclerenchyma fibers in stem cultures of *Cissampelos pareira* L. (Menispermaceae). *Current Sciences* 70: 263-264.
- Gritsch GS, Murphy RJ. 2005.** Ultrastructure of fiber and parenchyma cell Wall during early stages of culm development in *Dendrocalamus asper*. *Annals Botany* 95: 619-629.
- Hazarika BN. 2006.** Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Sci Hort* 108: 105-120.
- Hatamneua AA, Khayami M, Mahmudzadeh A, Sarghein SH, Mohamadaminzade B. 2008.** Anatomical Studies of Subfamily Nepetoideae Species (Lamiaceae) in West Azerbaijan in Iran. *Bot Res J* 1 (3): 68-70.
- Hill RS. 1998.** Fossil evidence for the onset of xeromorphic leaves of *Hakea suaveolens*. R. Br. IV. Ontogeny, structure function of the sclereids. *Aust J Bot* 38: 25-43.
- Johansen DA. 1940.** Plant microtechniques. New York: Mc Graw-Hill Book Co. Inc. 523p.
- Kadereit JW. 2004.** The Families and Genera of Vacular Plants. VII. Flowering Plant. Dicotyledons. Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae). (Eds: Kubitzki K). Springer, Berlin. pp: 167-275.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Kakani VG, Reddy KR, Zhao D, Mohammed AR. 2003.** Effects of Ultraviolet-B Radiation on Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Morphology and Anatomy. *Ann Bot* 91: 817-826.
- Kaya, A., Demirci, B., and Baser, C. H. K.2007.** Micromorpholgy of glandular trichomes of *Nepeta congesta* Fisch. & Mey, var. *congesta* (Lamiaceae) and chemical analysis of the essential oils. *South Afr J Bot* 73: 29-34.
- Knipling EB. 1970.** Physical and physiological basis for the reflectance of visible and near-infrared radiation from vegetation. *Remote Sensing of Environment* 1: 155-159.
- Kofidis G, Bosabalidis AM. 2008.** Effects of altitude and season on glandular hairs and leaf structural traits of *Nepeta nuda* L. *Botanical Studies* 49: 363-372.
- Lausi D, Nimis PL. 1986.** Leaf and canopy adaptations in a high-elevation desert on Tenerife, Canary Islands. *Vegetation* 68: 19-31
- Leshem B. 1983.** Growth of carnation meristems in vitro: anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation. *Ann Bot* 52: 413-415.
- Marin M, Koko V, Laušević DS, Marin PD, Rančić D, Stevanovic DZ. 2006.** Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and histochemistry. *South Afr J Bot* 72: 378-382.
- Megías M, Molist P, Pompal MA. 2016.** Atlas de histología vegetal y animal. Tinción. Universidad de Vigo. Facultad de Biología. Versión: Enero 2016. <<https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/tecnicas-tincion.pdf>>. (Consultado: 10/01/2016).
- Megías M, Molist P, Pompal MA. 2017.** Atlas de histología vegetal y animal. Tejidos vegetales. Meristemas. Universidad de Vigo. Facultad de Biología. Versión: Marzo 2017. <<http://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/v-meristemas.pdf>> (Consultado: 10/01/2017).
- Miesle JT, Proctor A, Lagrimini ML. 1991.** Peroxidase Activity, Isoenzymes, and Tissue Localization in Developing Highbush Blueberry Fruit. *J AMER Soc HORT SCI* 116 (5): 827-830.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Moon HK, Hong SP, Smets E, Huysmans S. 2009.** Phylogenetic significance of leaf micromorphology and anatomy in the tribe Mentha (Nepetoideae: Lamiaceae). *Bot J Linn Soc* 160: 211-231.
- Muñoz CLM^a. 2002.** Plantas medicinales españolas. *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) (Romero) Spanish medicinal plants. *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) (rosemary). *Stud Bot* 21: 105-118.
- Padure IM. 2006.** Nepeta (Lamiaceae) morphology and anatomy in Romania and their taxonomic significance. Conference Plant, Fungal and Habitat Diversity Investigation and Conservation. Proceeding of IV BBC- Sofia. pp. 34-38.
- Paiva EAS, Machado SR. 2003.** Collenchyma in *Panicum máximum* (Poaceae): localization and posible roll. *Aust J Bot* 51: 63-73.
- Rodrigues SP, Picoli EA de T, de Oliveria DC, Carneiro RG da S, Isaias RM AD dos S. 2014.** *Biosci J* 3 (6): 1933-1941.
- Rodríguez-Gamir J, Intrigliolo DS, Primo-Millo E, Forner-Giner MA. 2010.** Relationships between xylem anatomy, root hydraulic conductivity, leaf/root ratio and transpiration in citrus trees on different rootstocks. *Physiologia Plantarum* 139:159–169.
- Ross MH, Pawlina W, Todd A. 2012.** Atlas de Histología Descriptiva. Ed Panamericana. <<http://media.axon.es/pdf/96124.pdf>>. Consultado: 26/03/16.
- Ross MH, Pawlina W. 2007.** Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. 5ª Ed. Editorial medica panamericana S.A.
- Sarkart M, Rashmi R, Vikramaditya, Vsrma PN. 1995.** Pharmacognosy of *Nepeta cataria*. *Ancient Science of Life* 14: 225-234.
- Schimper AFW. 1903.** Plant geography upon a physiological basis. Claredron Press. Oxford.
- Solla A, Gil L. 2000.** Relationship between vessel diameter and Dutch elm disease in *Ulmus minor* Miller. *Forest Pathol.* Vol 33 (en prensa).
- Suárez TE. 2005.** Micropropagación de cultivares del género *Leucospermun* (Proteaceae). Tesis doctoral. Director/es: Juan Felipe Pérez Francés, María Del Carmen Alfayate Casañas y Juan Alberto Rodríguez Pérez. Departamento de

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Ecología, Botánica y Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias. Universidad de La Laguna.

Toma I, Toma C, Ghiorghita G. 2004. Histo-anatomy and in vitro morphogenesis in *Hyssopus officinalis* L. (Lamiaceae). Acta Bot Croat 63 (1): 59-68.

Vera BMC. 2016. Contribución al conocimiento de la propagación por estaca de algunas especies y cultivares de Proteas. Tesis doctoral. Director/es: Juan Alberto Rodríguez Pérez, María Del Carmen Alfayate Casañas e Juan Ignacio Frías Viera. Departamento de Ingeniería Agrícola, Náutica, Civil y Marítima. Escuela Politécnica Superior sección de Ingeniería Agraria. Universidad de La Laguna.

Victor CP, Rowe N. 2011. Effect of mechanical perturbation on the biomechanics, primary growth and secondary tissue development of inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana*. Ann Bot 107: 209-218.

Zhao Y, Zhou Y, Grout BWW. 2006. Variation in leaf structures of micropropagated rhubarb (*Rheum rhaponticum* L.) PC49. Plant Cell Tiss Org Cult 85(1): 115-121.

Zu Y, Pang HH, Yu JH, Li DW, Wei XX, Gao YX, Tong L. 2010. Responses in the morphology, physiology and biochemistry of *Taxus chinensis* var. *mairei* grown under supplementary UV-B radiation. J Photoch Photobi B: Biol 98: 152-158.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

ACTIVIDAD PEROXIDAS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

VI. ACTIVIDAD PEROXIDASA

VI.1. INTRODUCCIÓN

VI.1.1. PEROXIDASAS. GENERALIDADES

Las peroxidasas son hemoproteínas que se encuentran dentro del grupo de las enzimas oxidoreductasas, presenta el código enzimático EC.1.11.1.x. Actualmente, la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, ha catalogado 16 diferentes códigos enzimáticos (EC) para las peroxidasas (el código EC.1.11.1.4. fue eliminado) (Fig. 6.1) (Passardi et al., 2007).

Número EC	Nombre recomendado	Abreviación
EC 1.11.1.1	Peroxidasa NADH	NadPrx
EC 1.11.1.2	Peroxidasa NADPH	Secuencia no disponible
EC 1.11.1.3	Peroxidasa de ácidos grasos	Secuencia no disponible
EC 1.11.1.11 (antes EC 1.11.1.4)	Triptófano 2,3-dioxigenasa	Ya no se considera como una peroxidasa
EC 1.11.1.5	Citocromo-c Peroxidasa	CcP, DiHCcP
EC 1.11.1.6	Catalasa	CAT
EC 1.11.1.7	Peroxidasa	Hemo peroxidasas
EC 1.11.1.8	Yoduro peroxidasa	TPO
EC 1.11.1.9	Glutación peroxidasa	GPx
EC 1.11.1.10	Cloruro peroxidasa	HalPrx, HalNPrx, HalVPrx
EC 1.11.1.11	L-Ascorbato peroxidasa	APx
EC 1.11.1.12	Glutación hidroperóxido fosfolipídico peroxidasa	GPx
EC 1.11.1.13	Manganeso peroxidasa	MnP
EC 1.11.1.14	Lignina peroxidasa	LiP
EC 1.11.1.15	Peroxiredoxina	1CysPrx, 2CysPrx, PrxIIV/ PrxGrx, PrxQ/BCP
EC 1.11.1.16	Peroxidasa versátil	VP

Figura 6.1.- Clasificación de las peroxidasas según las Unión internacional de Bioquímica y Biología Molecular (Passardi et al., 2007).

Las peroxidasas (donadores: H_2O_2 oxidoreductasa; EC.1.11.1.7) son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, animales y microorganismos (Asada, 1992). Estas enzimas catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos diferentes a expensas del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) u otros peróxidos, que es usado por la enzima como uno de sus sustratos (Fig 6.2) , reduciéndose a agua, en un ciclo catalítico de tres pasos, que se conoce como mecanismo de Poulos-Kraut, y que implica diferentes formas intermedias de la enzima (Poulos & Kraut, 1980). Estas enzimas,

presentan una actividad catalítica en la que los productos resultantes suelen ser compuestos coloreados, y la reacción global que sigue es la siguiente:

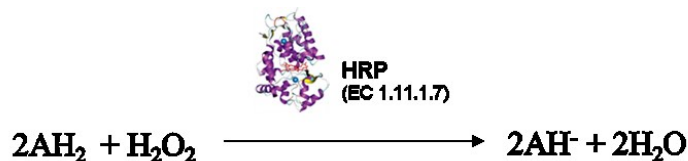


Figura 6.2.- Esquema global de la reacción llevada a cabo por las peroxidadas. En este proceso intervienen dos sustratos, un oxidante (H_2O_2) y un reductor (AH_2) (Chance, 1949).

VI.1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS PEROXIDASAS

Las peroxidadas se encuentran en una amplia gama de organismos, y se pueden clasificar en dos superfamilias en función de sus características estructurales (Welinder, 1992): la superfamilia de las peroxidadas animales (Kimura & Ikeda-Saito, 1988) y la superfamilia de las peroxidadas bacterianas, fúngicas y de plantas, cuyos componentes a pesar de mostrar en algunos casos una identidad de secuencia baja, presentan el mismo plegamiento y están evolutivamente relacionados (Welinder & Gajhede, 1993). Esta última superfamilia se puede dividir a su vez en tres clases bien diferenciadas, que se describen a continuación:

Clase I: Peroxidadas de procedencia procariota

Estas enzimas están implicadas en la detoxificación de la planta. Dentro de este grupo se incluye peroxidadas intracelulares, entre las que se encuentran la CcP de levaduras, una proteína soluble que participa en la cadena de transporte de electrones mitocondrial como oxidasa terminal cuando la citocromo c oxidasa respiratoria está inhibida (Erecinska et al., 1973); las peroxidadas-catalasas bacterianas (BCPX), que muestran los dos tipos de actividades enzimáticas y pueden estar implicadas en la protección de las células frente al estrés oxidativo (Welinder, 1991), y la ascorbato peroxidasa (APX), responsable de la eliminación del H_2O_2 en cloroplasto y citosol de plantas superiores (Dalton, 1991). Están localizadas en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y citosol. De forma generalizada, muestran una moderada especificidad de sustrato para el ácido ascórbico, y son consideradas enzimas muy termolábiles.

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Estas enzimas no poseen naturaleza glicoproteínas y no contienen puentes disulfuros, carbohidratos, iones calcio estructural, ni una secuencia peptídica señal que permita su secreción vía retículo endoplásmico (elementos característicos de las peroxidases de las clases II y III) (Welinder, 1992).

Clase II: Peroxidasas fúngicas o secretadas por hongos

Estas enzimas están implicadas en procesos de lignificación. Dentro de este grupo se encuentran proteínas de secreción como la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa (o peroxidasa dependiente de Mn^{2+}) (MnP) producidas por los hongos ligninolíticos (Hatakka, 1994). Las peroxidases fúngicas contienen en su dominio C-terminal 40-60 residuos más que los otros miembros de la superfamilia y, salvo alguna excepción como la MnP de *Phanerochaete chrysosporium* (Sundaramoorthy et al., 1994), presentan cuatro puentes disulfuros conservados, que presentan una disposición diferente a la de las peroxidases vegetales, y que le proporciona a su estructura un alto grado de rigidez. Además, tienen dos iones calcio de gran importancia en el mantenimiento de la estructura y están glicosiladas, con un contenido medio en carbohidratos del 5%. Además, en su presencia no aparece ningún residuo de tirosina (exceptuando una de las LiP de *P. chrysosporium*, que parece incluir un residuo de este tipo).

Clase III: Peroxidasas de secreción en plantas

Estas proteínas, al igual que las peroxidases de la clase II, son glicoproteínas monoméricas que presentan dos iones calcio estructurales y cuatro puentes disulfuros conservados. Además, presentan una señal peptídica en el extremo N-terminal para la secreción, y algunas de ellas tienen un propéptido en el extremo C-terminal que las dirige hacia las vacuolas. La mayoría de ellas están altamente glicosiladas, con un grado de glicosilación comprendido entre el 0 y el 25%. Dentro de este grupo se incluye la enzima más ampliamente estudiada, la isoenzima c de la peroxidasa de rábano (*A Armoracia rusticana*) (cHRP), pero también se han estudiado enzimas de otras especies como tomates, cebada, trigo, nabo, cacahuete y palmeras. Están localizadas en las vacuolas y en las paredes vegetales celulares, y muestran una baja especificidad de sustrato, pero presentan una notable afinidad por el alcohol coniderílico. Además, estas enzimas presentan una inusual estabilidad térmica (Passardi et al., 2007).

Tabla 6.1.- Características estructurales de la superfamilia de las peroxidases bacterianas, fúngicas y de plantas (modificado de Welinder, 1992).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Elementos	Clase I	Clase II	Clase III
Grupo hemo	Si	Si	Si
Carbohidratos	No	0-5%	0-25%
Iones metálicos	No	Ca ²⁺ (2)	Ca ²⁺ (2)
Puentes disulfuro	No	4	4
Señal peptídica de secreción	No	En el extremo N-terminal	En el extremo N-terminal
Propéptidos en el extremo C-terminal	No	No	Si
Hélices extra	B' entre B-C	B' entre B-C	D' entre D-E F' y F'' entre F-G
Ejemplos	APXs	LiP, MnP	HRP-C, CEP, RPTPT, AOPTP

La otra superfamilia comentada anteriormente, pertenece a las peroxidasas de origen animal. Dentro de éste grupo han sido caracterizado estructuralmente entre otras, la mieloperoxidasa (Zeng & Fenna, 1992), la eosinófilo peroxidasa (Bolscher et al., 1984) y la prostaglandina sintetasa H2 (Merlie et al., 1988; Picot et al., 1994). Todas ellas son enzimas que están formadas por varias subunidades que pueden ser iguales o no (Passardi et al., 2007).

VI.1.3. NATURALEZA Y ESTRUCTURA DE LAS PEROXIDASAS DE LA CLASE III

Las peroxidasas vegetales de secreción, son glicoproteínas con un peso molecular comprendido entre 28 y 60 KDa (Higara et al., 2001), que están codificadas por una gran familia multigénica (Higara et al., 2000).

Presentan una cadena polipeptídica de unos 300 aminoácidos, y como grupo prostético presenta un grupo hemo b (una molécula de protoporfirina IX) y dos iones de Ca⁺² estabilizadores. El estado nativo del átomo de Fe está en estado de oxidación +3 (FeIII) y se encuentra pentacoordinado con cuatro átomos de nitrógeno pirrólicos del grupo hemo, y con un átomo de nitrógeno de un residuo de histidina de la proteína que se ha conservado durante la evolución de la proteína (Fig. 6.3.1) y el sexto lugar de coordinación, que determina el estado de espín del hierro, se encuentra libre (Banci, 1997). Este grupo prostético que se encuentra situado entre los dos dominios que presenta la enzima (el dominio distal y proximal), es vital para la actividad enzimática, ya que es responsable de estabilizar las peroxidasas, como se ha comprobado en la peroxidasa de soja y de rábano (Kamal et al., 2008).

Estudios de modelos informáticos (Ros Barceló et al., 2007) y los análisis cristalográficos (Watanabe et al., 2010) revelan que las peroxidasa vegetales de clase III contienen normalmente entre 10-12 hélices- α , 2 láminas β cortas y 4 puentes disulfuro situados sobre los residuos cisteína, encargados de mantener la estructura rígida (Fig. 6.3.2).

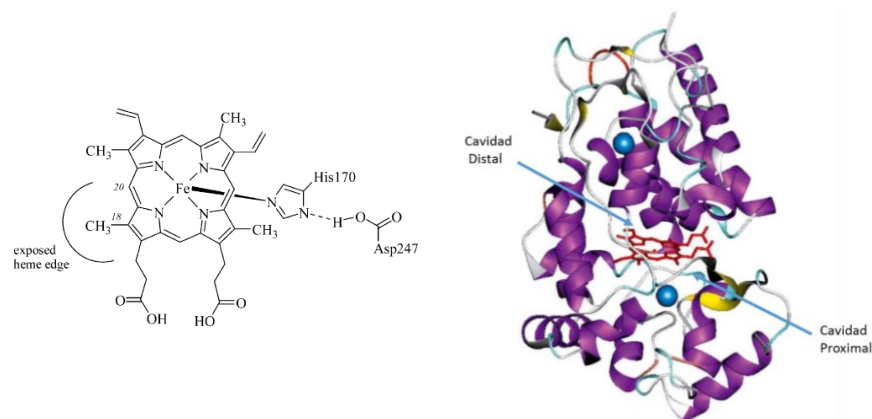


Figura 6.3.- 1) Grupo hemo de las peroxidasa de rábano. 1) Representación tridimensional de la estructura cristalina por rayos X de la isoenzima C peroxidasa de rábano picante (cHRP). El grupo hemo (se representa en rojo) está localizado entre los dominios distal y proximal que cada uno contienen un átomo de calcio (mostrado como esferas azules). Las regiones de hélice- α y las láminas- β se muestran en violeta y amarillo, respectivamente (Veitch et al., 2004).

Aunque esta estructura está muy conservada puede producirse variaciones debidas principalmente a la glicosilación de la enzima, que varía entre el 0 y el 25%, siendo los más importantes los glicanos, manosa, fucosa, xilosa, N- acetilglucosamina y galactosa, aunque esta última no está presente en todas las peroxidasa vegetales (Gray et al., 1996; Yang et al., 1996; McMannus & Ashford, 1997; Wilson, 2002). La glicosilación ocurre en la superficie de los giros que conectan las hélices, de manera que el glicano se muestra hacia el exterior de la molécula (Veitch, 2004). La glicosilación es uno de los principales factores responsables de la gran estabilidad térmica de las peroxidasa vegetales de secreción (Ryan & Ó Fágáin, 2007), y además se ha propuesto que existe una relación entre la glicosilación de la enzima y su papel en la fisiología celular (Helenius & Aebi, 2001).

VI.1.4. CICLO CATALÍTICO

Las peroxididasas catalizan un gran número de reacciones oxidativas (Li & Poulos, 1994). Las peroxididasas utilizan H_2O_2 como molécula aceptora de electrones para oxidar una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos (Fig. 6.4). La reacción catalizada por este tipo de enzimas sigue un comportamiento cinético bi-sustrato (Alberty, 1953), es decir, están implicados dos sustratos, y este mecanismo de reacción se le conoce con el nombre de mecanismo ping-pong (Cleland, 1970).

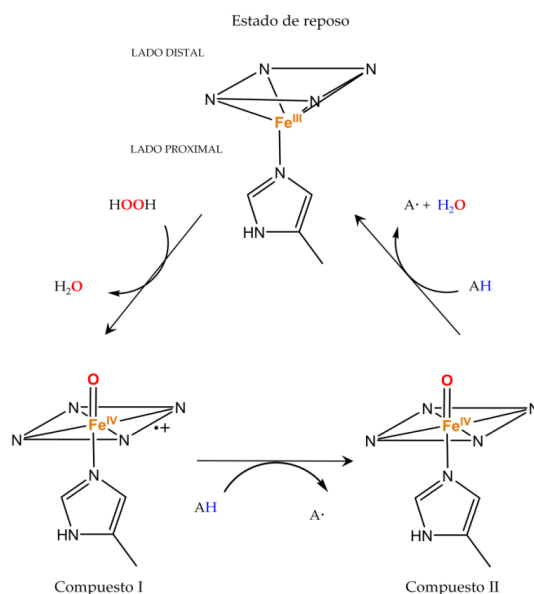


Figura 6.4.- Ciclo catalítico de las peroxididasas (Dawson, 1988). En el mecanismo de reacción de las peroxididasas, un equivalente de H_2O_2 reacciona con la enzima nativa para dar lugar al Compuesto I. Aquí lo que ha ocurrido es una reacción de óxido-reducción de dos electrones, en la que el H_2O_2 es reducido a H_2O y la peroxidasa es oxidada. Un equivalente de oxidación reside en el hierro en forma de un intermediario oxoferril ($\text{Fe}^{4+} = \text{O}$) y el otro, en la mayoría de las peroxididasas, reside en la porfirina (en forma de radical cationico de la porfirina, representado en la Fig. 20 como $\cdot+$). Posteriormente, el Compuesto I puede oxidar un sustrato mediante una reacción de transferencia electrónica, en la que se forma el radical del sustrato correspondiente ($\cdot\text{A}$). La enzima queda como Compuesto II con un centro $\text{Fe}^{4+} = \text{O}$ coordinado con la porfirina que ha recuperado su electrón. Finalmente, el centro $\text{Fe}^{3+} = \text{O}$ del Compuesto II es reducido a la forma férrica (Fe^{3+}) de la enzima nativa mediante la sustracción de un electrón de otra

molécula de sustrato. En ausencia de sustratos reductores adecuados, un exceso de H₂O₂ reacciona con el Compuesto II para formar el Compuesto III (Fe³⁺ O₂⁻) produciéndose la inactivación de la enzima y la pérdida del grupo hemo (Wariishi & Gold, 1990).

VI.1.5. FUNCIONES

Resulta complicado asignar una función específica a una peroxidasa en particular, debido a su baja especificidad de sustrato y a la existencia de muchas isoenzimas (Higara et al., 2001). A esto, hay que sumarle el hecho de que las peroxidases pueden ser consideradas como enzimas bifuncionales, debido a sus dos posibles ciclos catalíticos (peroxidativo y oxidativo), de manera que, a la vez que son capaces de oxidar varios sustratos en presencia de peróxido de hidrógeno, son también capaces de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) (Passardi et al., 2005).

Las peroxidases de la clase III, están implicadas en múltiples funciones fisiológicas a lo largo de toda la vida de la planta (Passardi et al., 2005). Muchas isoenzimas se expresan de forma constitutiva, de tal manera que tienen un papel importante en el desarrollo y estructura de las plantas, pero otras isoenzimas, se inducen sólo en respuesta a diferentes estreses. Las peroxidases participan en la germinación (Bellani et al., 2002) y el crecimiento celular (Cosgrove, 2001). También pueden participar en la oxidación de compuestos tóxicos como los fenoles (Lagrimini, 1991; Fry, 2004), en la respuesta defensiva frente a patógenos (Lehtonen et al., 2009; Kristensen et al., 1999; McLusky et al., 1999), en el metabolismo de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno (Almagro et al., 2009), en la elongación celular (Liszkay et al., 2004), en el metabolismo de fitohormonas (Cosio et al., 2009; Grambow & Langenbeck-Schwich, 1983; Normanly et al., 1995) como es el catabolismo del ácido 3-indolacético o la biosíntesis de etileno (Campa, 1991), y en la biosíntesis de la pared celular, debido a que participa en el entrecruzamiento de los componentes de las paredes celulares y en la formación de sustancias como la suberina y la lignina (Marjamaa et al., 2009; Arrieta-Baz & Stark, 2006; Mäder, 1992; Quiroga et al., 2000; Ikegawa et al., 1996). (Fig. 6.5).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

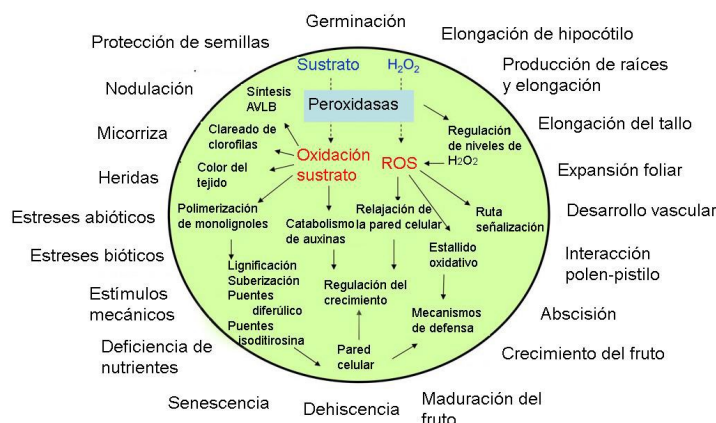


Figura 6.5.- Esquema de las funciones de las peroxidasas a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta. Modificado de Cosio & Dunand, (2009).

VI.1.6. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PEROXIDASAS E ISOENZIMAS

Las peroxidasas vegetales de la clase III se localizan a nivel subcelular en la pared celular, citoplasma, aparato de Golgi, vacuolas, tonoplasto, retículo endoplasmático, vesículas de transporte, apoplasto, nucléolo, cloroplastos, ribosomas, cromosomas, ect. Además, se ha demostrado otras ubicaciones celulares en donde se ha detectado la actividad de las peroxidasas como son las mitocondrias, núcleo y membrana plasmática (Gaspar et al., 1982; Jouili et al., 2011).

Los organismos sintetizan enzimas en múltiples formas, denominadas isoenzimas, que catalizan la misma reacción bioquímica, pero difieren en sus propiedades químicas, físicas y estructurales. Por lo tanto, las isoenzimas presentan diferencias en su estructura primaria (secuencia de aminoácidos), su carga eléctrica, en su estabilidad frente al calor, en su distribución en los compartimentos celulares, en su comportamiento catalítico y cinético, etc. (Jimenez et al., 1993; Schmiolt & Pennacchiotti, 1982).

Las peroxidasas vegetales de la clase III presentan un alto grado de polimorfismo que viene dado porque las peroxidasas vegetales están codificadas por una gran familia multigénica (Higara et al., 2000). El incremento del número de copias génicas de estas peroxidasas desde su aparición, parece estar relacionado con el

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 965383		Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14	
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58	
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47	
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34	

aumento de la complejidad de las propias plantas y con la diversificación de sus biotopos y patógenos (Passardi et al., 2004). De estudios llevados a cabo en varias especies, se han identificado en *Oryza sativa* 138 genes que codifican diferentes peroxidases (Passardi et al., 2004) y 73 genes en *Arabidopsis thaliana* (Tognolli et al., 2002).

Se han encontrado isoenzimas de peroxidases en una gran variedad de especies vegetales, pero el primero que aisló isoenzimas de la peroxidasa de rábano fue Theorell en 1942 (Theorell, 1942). Paul en 1958 (Paul, 1970) aisló cinco formas peroxidases del rábano llamadas A, B, C, D y E, y posteriormente, se separaron tres fracciones de la isoenzima A (A1, A2 y A3) (Shanon et al., 1966).

No obstante, en el rábano se han secuenciado 9 genes diferentes (que comparte entre un 50-95% de homología) que codifican peroxidases, pero el estudio de peroxidases de rábano por isoelectroenfoque revela la existencia de 42 isoenzimas (Hoyle, 1977). Esto indica que más de una de las posibles isoenzimas determinadas por isoelectroenfoque pueden originarse a partir de un mismo gen, de modo que su origen debe radicar en los diferentes patrones de glicosilación resultantes de las modificaciones post-traduccionales (Hoyle, 1977; Spoel et al., 2009). Otra fuente de polimorfismo y heterogeneidad puede provenir de las modificaciones covalentes o alteraciones conformacionales que se producen en las peroxidases para conferirles una mayor estabilidad (Kranz et al., 2009), y por alteraciones alostéricas con componentes de bajo peso molecular presentes en la célula vegetal, como los fenoles (Ros Barceló et al., 1987), que pueden modificar las propiedades catalíticas de las peroxidases (Ros Barceló & Muñoz, 1989), aumentando de esta manera sus funciones metabólicas. A esto, hay que sumarle el hecho de que, se ha identificado (observando las respuestas a varios estreses en las plantas) diversas isoperoxidases que presentan distintas funciones (Higara et al., 2000; Welinder et al., 2002; Cosio & Dunand, 2009).

El polimorfismo de las peroxidases puede ser estudiado mediante isoelectroenfoque. De acuerdo a su punto isoeléctrico (pI), las isoenzimas de peroxidases pueden ser clasificadas en tres grupos: isoenzimas ácidas o aniónicas ($pI < 7,0$) que muestran un alto contenido en carbohidratos; isoenzimas neutras o moderadamente básicas ($7,0 < pI < 9,0$); e isoenzimas fuertemente básicas o catiónicas ($pI > 9,0$), que presentan muy poco contenido en carbohidratos (Quiroga et al., 2000; Ros Barceló et al., 2004).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

En la célula existe una compartimentación isoenzimática, es decir, que las isoenzimas presentan una diferente localización subcelular, que está relacionada con su funcionalidad. De manera que, se les atribuye principalmente a las isoenzimas aniónicas (aunque también se encuentran isoenzimas catiónicas), un papel importante en el control de su crecimiento, participando en la biosíntesis de la lignina y en los entrecruzamientos de la extensiva y la pectina, es decir, en la biosíntesis de la pared celular (Schloss et al., 1987; Pedreño et al., 1993; Ros Barceló et al., 1997). Además, las isoenzimas aniónicas se encuentran normalmente solubles en el citoplasma, interviniendo en las reacciones enzimáticas que en él se desarrollan. Por último, en las vacuolas únicamente se encuentran las peroxididasas catiónicas (que tienen poca afinidad por los precursores de lignina), que están implicadas en la biosíntesis y recambio de metabolitos secundarios como es el caso de los fenoles y los alcaloides (Pedreño et al., 1993), y también se encuentran en los espacios extracelulares implicándose en el catabolismo de auxinas (Boyer et al., 1983; Hazell & Murray, 1982).

De manera que, en las paredes celulares se puede encontrar tanto isoenzimas aniónicas y catiónicas, que juegan un papel importante en el control de su crecimiento, participando en la biosíntesis de la lignina y en los entrecruzamientos de la extensiva y la pectina (Pedreño et al., 1993; Ros Barceló et al., 1997). Por otro lado, las isoenzimas aniónicas se encuentran normalmente solubles en el citoplasma, interviniendo en las reacciones enzimáticas que en él se desarrollan. Por último, en las vacuolas únicamente se encuentran las peroxididasas catiónicas, que están implicadas en la biosíntesis y recambio de metabolitos secundarios como es el caso de los fenoles y los alcaloides (Pedreño et al., 1993).

Estudios llevados a cabo en las 47 isoenzimas de la planta de tabaco, han confirmado esta distribución isoenzimática (*Nicotiana tabacum*) (Leonard & Yonetani, 1974; Schloss et al., 1987).

De todo lo comentado anteriormente, se entiende que, para lograr una comprensión completa del papel de las peroxididasas, es necesario realizar un análisis detallado de la expresión espacial y temporal de cada isoenzima de peroxidasa, y de su especificidad de sustrato (Christensen et al., 2001).

VI.1.7. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS PEROXIDASAS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Las peroxididasas pueden emplearse en un gran número de aplicaciones (Fig. 6.7), debido a que estas enzimas pueden catalizar cuatro tipos de reacciones diferentes (Fig. 6.6) (Colonna et al., 1999):



Figura 6.6.- Diferentes tipos de reacciones llevadas a cabo por las peroxididasas (Colonna et al., 1999).

Las peroxididasas se utilizan ampliamente como marcadores en bioquímica clínica y ensayos inmunohistoquímicos (Ngo, 2010). En ensayos inmunológicos, la HRP es probablemente la enzima más común en ensayos ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) debido a su escasa especificidad frente al sustrato, junto con su alta estabilidad térmica. En los kits de diagnóstico en medicina, destaca la utilización de las peroxididasas para la determinación y la identificación de un gran número de compuestos como: glucosa, colesterol y ácido úrico (Agostini et al., 2002), galactosa, etanol, lactosa, oxalato, piruvato, aminoácidos, etc. (Azevedo, et al., 2003; May, 1999; Regalado et al., 2004; Ruzgas et al., 1996), o en la detección de 8-hidroxidesoxiguanosina y sus análogos en orina, para identificar el riesgo de padecer cáncer de próstata o vejiga (Chiou et al., 2003).

Además, estas enzimas son utilizadas como marcadores en investigación, ya que las peroxididasas unidas con proteínas, anticuerpos y otras moléculas, se utilizan en los

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

inmunoensayos, en la detección de ácido nucleicos y en histo- y citoquímica (Azevedo et al., 2003).

Por otro lado, los biosensores son cada vez más importantes en diferentes campos (control de calidad alimentaria, monitorización medioambiental y en investigación), y en especial, los biosensores basados en peroxididasas, se emplean para monitorizar peróxidos en industria farmacéutica, en el blanqueo de telas y pasta de papel, en procesos de ozonización de aire y agua, y en productos alimentarios. También se puede utilizar para controlar la concentración de sustratos incluyendo compuestos fenólicos (Ruzgas et al., 1996)

Además, las peroxididasas tienen potencial para disminuir la contaminación medioambiental mediante biorremediación de vertidos industriales (Bansal & Kanwar, 2013), y ello es posible gracias a la capacidad de estas enzimas de biodegradar compuestos fenólicos. Especialmente, la HRP se está utilizando en el tratamiento de contaminantes aromáticos acuosos presentes en aguas de desechos de diferentes industrias (refinerías de petróleo, fábricas textiles, de polímeros, papel, etc.) (Aboul-Gheit et al., 2011). Resulta interesante, que sobre el 10-15% de los tintes sintéticos usados en distintas industrias, constituyen un grupo de contaminantes muy problemáticos (causantes de problemas medioambientales), al mostrar una complicada degradación (Ong et al., 2011). Pero se ha visto que las peroxididasas son capaces de modificar estos tintes, dando lugar a compuestos con una baja o nula toxicidad (se trata de una degradación biológica, que constituye una alternativa más barata y menos agresiva) (de Souza et al., 2007).

Además, en la industria papelera, las peroxididasas ligninolíticas constituyen una de las opciones más respetuosas con el medio ambiente para la producción de pasta de papel (especialmente en el proceso de deslignificación, en el que se generan residuos altamente tóxicos como los organoclorados) (Kondo *et al.*, 1994; Marques *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2003). En la industria textil, las peroxididasas (la reacción de oxidación de las peroxididasas con determinados compuestos fenólicos da lugar a productos coloreados) se han utilizado, para proporcionar a la lana diferentes tonos de color (Shin *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que las peroxididasas se pueden emplear para la producción de detergentes enzimáticos (por ejemplo, para eliminar el colorante que se libera de la ropa durante el lavado) (Damhus *et al.*, 1991).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Otras aplicaciones de las peroxididasas de gran relevancia, es la síntesis de nuevos polímeros y resinas fenólicas. Por ejemplo, la síntesis de cardanol (polímero utilizado para la producción de resinas y revestimientos) (Kim et al., 2003), acrilamida (Iwahara, K et al., 2000), poliestireno (Singh et al., 2000) o en la producción de polianilina (polímeros conductores) (Alva et al., 1997).

Finalmente, se ha visto que las peroxididasas podrían utilizarse en la síntesis de medicamentos con alto rendimiento (ej. en la síntesis de anticancerígenos como la vinblastina y vincristina (Sottomayor et al., 1998), y en la eliminación de peróxido de hidrógeno de productos alimentarios (Hamid & Khalil ur, 2009).

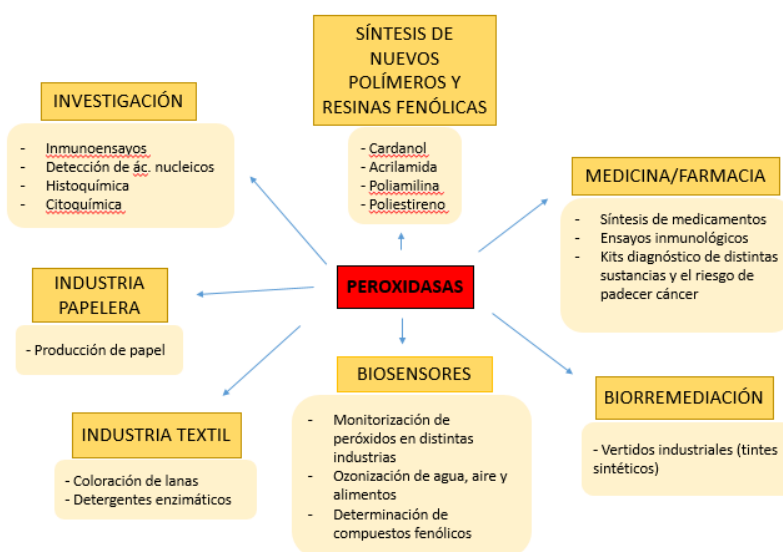


Figura 6.7.- Aplicaciones biotecnológicas de las enzimas peroxididasas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

VI.2. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.2.1. INDUCCIÓN DE ESTRÉS LUMÍNICO EN PLANTAS DE *NEPETA TEYDEA*. TRATAMIENTOS CON RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

VI.2.1.1 MATERIAL

El material vegetal utilizado para los ensayos de luz ultravioleta, fueron plantas enteras de *Nepeta teydea* cultivadas y crecidas *in vitro* (16 h luz con luz fluorescente blanca ($175\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) a $25/20^\circ\text{C}$) que se aclimataron a condiciones *ex vitro* (Fig. 6.8.1) y callos de *Nepeta teydea* inducidos *in vitro* con los reguladores de crecimiento 2,4-D (Fig. 6.8.2) y ANA (Fig. 6.8.3).

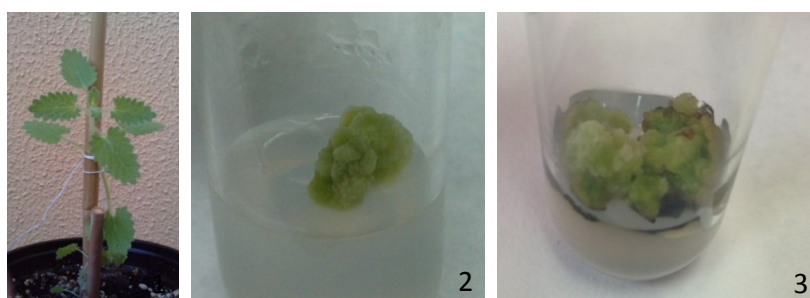


Figura 6.8.- Material vegetal utilizado para los ensayos de estrés ultravioleta: 1) Planta de *Nepeta teydea* crecidas *in vitro* y aclimatada *ex vitro* en el laboratorio; 2) callos *in vitro* inducidos con el regulador hormonal 2,4-D; 3) callos *in vitro* inducidos con la fitohormona ANA.

Para llevar a cabo los ensayos de ultravioleta, se usó varias fuentes de luz ultravioleta, que se describen en la tabla 6.2.

Tabla 6.2.- Fuentes de luz ultravioleta utilizados para realizar los tratamientos para la inducción de estrés lumínico por luz ultravioleta de callos y plantas enteras de *Nepeta teydea*.

FUENTES DE LUZ ULTRAVIOLETA-B UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS DE ESTRÉS LUMÍNICO
Lámpara de luz fluorescente blanca solar (Silvania T-Reference, con espectro solar

limitado con un máximo a 500nm y baja emisión de UV-B (UVB <2%) acoplada a una lámpara de luz UV (Philips TL-D 18W BLB 1SL) (Fig. 6.9.1).
Transiluminador modelo White/UV.TLW-20. 220V/240V, 50Hz, 0.6mps (UVP, San Gabriel, CA 91778. U.S.A), emite luz ultravioleta a longitud de onda: $\lambda = 365$ nm, y luz blanca (Fig. 6.9.2).
Transiluminador modelo UVATON, emite luz ultravioleta a longitud de onda 360nm y luz blanca (Fig. 6.9.3).
Transiluminador modelo UVATON, emite luz ultravioleta a longitud de onda 254 nm y luz blanca (Fig. 6.9.3).



Figura 6.9.- Fuentes de luz ultravioleta de los ensayos utilizados: 1) Lámpara de luz blanca acoplada a una lámpara de luz UV (Philips TL-D 18W BLB 1SL); 2) Transiluminador White/UV.TLW-20; 3) Transiluminador UVATON.

VI.2.1.2. METODOLOGÍA

Los experimentos de estrés lumínico se realizaron dentro de una cámara de incubación en condiciones de oscuridad, donde la temperatura foliar se mantuvo por debajo de los 22°C en todos los ensayos llevados a cabo.

PROTOCOLO 1: ensayos de luz ultravioleta con las diferentes lámparas UV de los dos transiluminadores empleados.

Los callos y plantas de *Nepeta teydea* fueron colocados en placas de Petri (sin la tapa), sobre una plataforma lisa a una distancia de aproximadamente 13cm, de la lámpara del transiluminador modelo White/UV.TLW-20, con el fin de obtener una dosis de luz UV de 20kj/m² a nivel de las muestras vegetales. Para el modelo de transiluminador modelo UVATON, las muestras se situaron a una distancia de 11cm

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

aproximadamente, de la lámpara con el fin de obtener una dosis de luz UV-a de 100kj/m² o de 19 kj/m² para la UV-b, medidas ambas a nivel de las muestras vegetales.

Para ello todas las muestras se expusieron a 60 minutos a radiación UV-b o UV-b (Fig. 6.13).

Después de los ensayos de irradiación, parte de los callos se recogieron inmediatamente (muestras sin recuperación), y otra parte de los callos se dejaron recuperar durante 60 min en condiciones de luz blanca.

Para los ensayos control, los callos de *Nepeta teydea* se sometieron a condiciones de luz blanca durante 120 minutos, sin la aplicación de luz ultravioleta (Fig. 6.12).

En la tabla 6.3, se resumen todos los tratamientos con luz ultravioleta realizados en las muestras vegetales ensayadas.

Tabla 6.3.- Tratamientos a los que fueron sometidas las muestras vegetales (callos y plantas enteras de *Nepeta teydea*) para la inducción de estrés lumínico por luz ultravioleta.

MUESTRAS VEGETALES ENSAYADAS EN EL PROTOCOLO 1 CON LUZ ULTRAVIOLETA
Callo ANA control (sin luz UV, 120minutos de luz blanca)
Callo ANA sin recuperación (sólo luz UV (60minutos), sin luz blanca)
Callo ANA con recuperación (luz UV (60minutos) y luz blanca (60minutos))
Callo 2,4-D control (sin luz UV, 120minutos de luz blanca)
Callo 2,4-D sin recuperación (sólo luz UV (60minutos), sin luz blanca)
Callo 2,4-D con recuperación (luz UV (60minutos) y luz blanca (60minutos))
Hoja control (sin luz UV, 120minutos de luz blanca)
Hoja sin recuperación (sólo luz UV (60minutos), sin luz blanca)
Hoja con recuperación (luz UV (60minutos) y luz blanca (60minutos))

PROTOCOLO 2: ensayos de luz ultravioleta con una lámpara de luz fluorescente blanca solar acoplada a una lámpara de luz UV.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Los callos y las plantas de *Nepeta teydea* fueron colocados sobre una plataforma lisa a una distancia de 30cm de la fuente de luz, con el fin de obtener una dosis de luz UV de 12kj/m², con una irradiancia de 200W/m² a nivel de las muestras vegetales (Fig. 6.10).

Los callos cultivados *in vitro*, se colocaron sobre la plataforma dentro del recipiente de cristal con el medio de cultivo en el que crecieron, pero sin la tapa, para que pudiera llegar a las muestras vegetales la luz ultravioleta. Por otro lado, las plantas enteras de *Nepeta teydea* sembradas en sustrato en bandejas de semilleros, se extrajeron individualmente con sus correspondientes alveolos de las bandejas, y se colocaron sobre la plataforma horizontalmente, para que la luz incidiera por igual a toda la planta.

$$\text{Dosis UV (Kj/m}^2\text{)} = \text{Intensidad Irradiada (W/M}^2\text{)} \times \text{Tiempo (s).}$$

$$\text{Intensidad irradiada} = \text{Potencia lámpara/Distancia}^2.$$

Figura 6.10.- Ecuaciones empleadas para la realización de los cálculos de exposición e intensidad de la luz ultravioleta.

Para los ensayos control, tanto las plantas enteras de *Nepeta teydea* como los callos, se mantuvieron en condiciones de luz blanca constante durante los 60 minutos de duración del tratamiento, sin la aplicación de luz UV.

Los tratamientos con luz UV al que fueron sometidas todas las muestras vegetales consistieron en:

- Tratamiento 1: Las muestras vegetales se sometieron a condiciones constantes de luz blanca durante 60 minutos, mientras que la luz UV se aplicó en ciclos de 10 minutos (Fig. 6.12).
- Tratamiento 2: Las muestras vegetales se sometieron a condiciones constantes de luz ultravioleta durante 60 minutos (sin la aplicación de luz blanca) (Fig. 6.13)

Finalizado ambos tratamientos de luz ultravioleta, se procedió a la recogida de las muestras vegetales, de la siguiente manera:

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Al finalizar inmediatamente cada uno de los tratamientos de luz UV, se recogieron y almacenaron parte de las muestras vegetales. A estas muestras vegetales, las denominamos muestras vegetales sin recuperación.
- Al finalizar los ensayos de luz UV, una parte de las muestras vegetales, se sometieron a condiciones de luz blanca durante 60 minutos, y otra parte de las muestras vegetales, permanecieron en condiciones de luz blanca durante 24 horas. A estas muestras vegetales, las denominamos muestras vegetales con recuperación.

En la tabla 6.4, se resumen todos los tratamientos con luz ultravioleta realizados en las muestras vegetales ensayadas.

Tabla 6.4.- Tratamientos a los que fueron sometidas las muestras vegetales (callos y plantas enteras de *Nepeta teydea*) para la inducción de estrés lumínico por luz ultravioleta.

MUESTRAS VEGETALES ENSAYADAS EN EL PROTOCOLO 2 CON LUZ ULTRAVIOLETA
Callo ANA control (sin luz UV, 120 minutos de luz blanca)
Callo ANA sin recuperación (Luz blanca (60 minutos) + luz UV (3 ciclos de 10 minutos), sin luz blanca)
Callo ANA con recuperación (Luz blanca (60 minutos) + luz UV (3 ciclos de 10 minutos), con luz blanca (60 minutos))
Hoja control (sin luz UV, 120 minutos de luz blanca)
Hoja sin recuperación (Luz blanca (60 minutos) + luz UV (3 ciclos de 10 minutos), sin luz blanca)
Hoja con recuperación (Luz blanca (60 minutos) + luz UV (3 ciclos de 10 minutos), con luz blanca (60 minutos))

Al final los dos protocolos realizados, todas las muestras vegetales (con recuperación y sin recuperación) (Tabla 6.11 y 6.12), se colocaron en recipientes debidamente etiquetados y se almacenaron a -30°C en condiciones de oscuridad, hasta el momento de su utilización.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Figura 6.12.- Cámara de incubación con el sistema de inducción de estrés lumínico montado. Tratamiento lumínico de las muestras vegetales de *Nepeta teydea* en condiciones control (lámpara de luz blanca encendida).

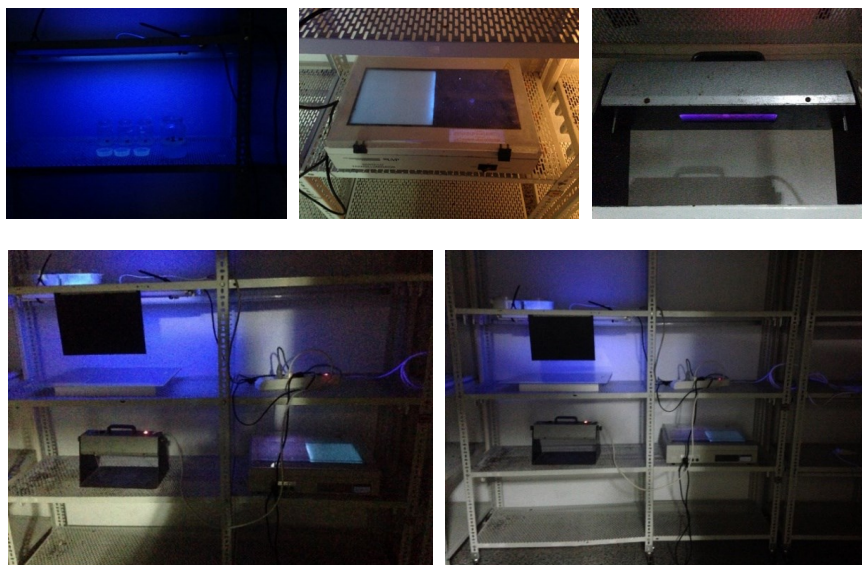


Figura 6.13.- Cámara de incubación con el sistema de inducción de estrés lumínico montado. Tratamiento lumínico de las muestras vegetales de *Nepeta teydea* en condiciones de estrés lumínico (lámpara de luz ultravioleta encendida).

VI.2.2. ENSAYOS BIOQUÍMICOS

Los distintos ensayos bioquímicos realizados en este trabajo, se llevaron a cabo entre abril de 2011 y julio de 2016 en el laboratorio del área de Fisiología Vegetal del Departamento Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal de La Laguna.

VI.2.2.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE NEPETA TEYDEA

VI.2.2.1.1. MATERIAL

259

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Los extractos vegetales se obtuvieron a partir de hojas jóvenes de *Nepeta teydea*, procedentes de plantas cultivadas en nuestro laboratorio en condiciones *in vitro*, y que habían sido aclimatadas a condiciones *ex vitro*. Por otro lado, se ha utilizado también como material vegetal, callos *in vitro* de *Nepeta teydea* de 30 días de edad. Tanto de las plantas de *Nepeta teydea* crecidas en condiciones de laboratorio como de los callos, tenemos las muestras vegetales control (sin tratamiento con luz ultravioleta), como las muestras sometidas a los diferentes tratamientos con luz ultravioleta realizados (Fig. 6.14).

Durante todos los ensayos bioquímicos, incluyendo el procedimiento de extracción, se utilizó diferentes aparatos, entre los que se incluyen: balanza analítica electrónica (Sartorius. CP64), un pH-metro (Microprocessor pH Meter pH 537, WTW, Weilheim, Germany), para ajustar los valores de pH de cada uno de los tampones que vamos a fabricar, un rotor magnético (Agimatic-N. P. Selects), y micropipetas electrónicas p20, p200 y p1000 (Pipetman. Gilson).

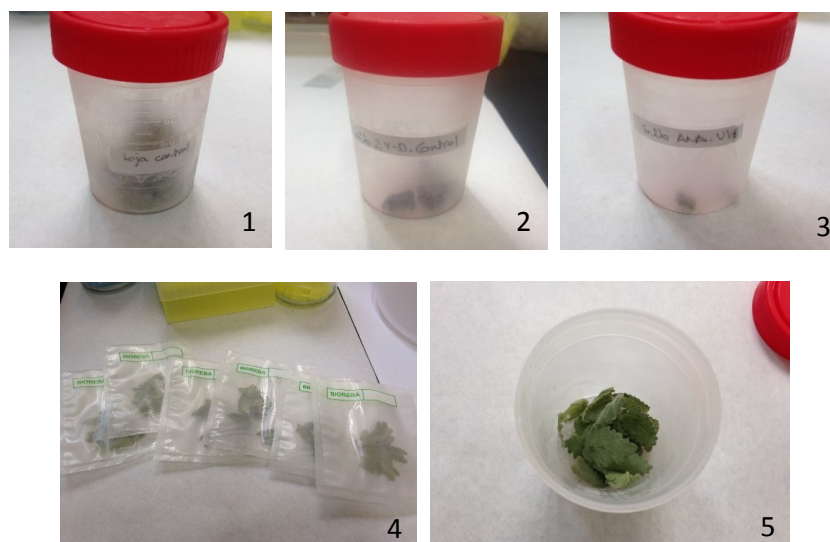


Figura 6.14.- Muestras vegetales sometidos a los diferentes ensayos de luz ultravioleta y almacenados a -30°C: 1-3) Callos de *Nepeta teydea*; 4-5) Hojas jóvenes de plantas de *Nepeta teydea*.

VI.2.2.1.2. METODOLOGÍA

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Para la obtención de extractos crudos de *Nepeta teydea*, fue necesario llevar a cabo una serie de pasos (Fig. 6.18), que implicó la preparación de un tampón fosfato de extracción denominado PBe. Para ello, primero se realizó un tampón fosfato, que denominamos PBS, y a partir de éste tampón, se fabricó el tampón de extracción PBe (Fig.6.15).

<p>Tampón fosfato (PBS): Tampón Fosfato sódico 50 mM, ajustado a pH 6,9 NaCl 10 mM EDTA 1mM</p>
<p>Tampón fosfato de extracción (PBe) PBS NaCl 200 mM PMFS 10 µM (phenazina methosulfato)</p>

Figura 6.15.- Composición del tampón fosfato (PBS) y del tampón de extracción (PBe) utilizado para la preparación del extracto vegetal.

El tampón de extracción que utilizamos, es un tampón que nos permite preservar la integridad de las peroxidasas, obtener la mayor parte de la actividad soluble presente en los tejidos vegetales, y facilita la liberación de la enzima unida débilmente a las fracciones insolubles de los extractos.

Posteriormente, se seleccionaron todas las muestras vegetales a ensayar (callos y hojas de *Nepeta teydea* de los diferentes tratamientos con luz ultravioleta y control).

Los tejidos vegetales a analizar deben estar limpios y libres de sustancias extrañas como partículas de polvos, por ello, todas las muestras vegetales, se lavaron con agua fría estéril y se secaron con papel absorbente.

A continuación, las muestras vegetales se pesaron y se mezclaron con PBe 1:2 (p/v), y se sometieron a rotura mecánica dentro de bolsas de extracción de la casa comercial BIOREBA (Extraction bags “Universal” 12x15cm) (Fig. 6.16). Este sistema

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

de homogenizado es ideal para la extracción de tejidos, y permite una óptima filtración, debido a que estas bolsas contienen un filtro intermedio inerte no absorbente.



Figura 6.16.- Extraction bags “Universal” 12x15cm de la casa comercial BIOREBA, utilizadas para la homogeneización de las muestras vegetales

Todo el proceso de rotura de las muestras vegetales dentro de la bolsa de extracción, se realizó sobre una placa fría. El homogenizado líquido obtenido, se transfirió (con ayuda de una micropipeta) a tubos de polipropileno de fondo redondo y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min en una Centrifuga Superspeed Sorvall RC-5B (todo el proceso de centrifugación se lleva a cabo a una temperatura por entre 2-4°C) (Fig.6.17). La fracción sobrenadante (conteniendo la actividad peroxidasa soluble), se transfirió mediante una pipeta Pasteur desechable a tubos Eppendorf para su ensayo o congelación.



Figura 6.17.- Centrifuga Superspeed Sorvall RC-5B, utilizada para la centrifugación de los homogeneizados de las muestras vegetales.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Estos sobrenadantes fueron empleados inmediatamente en los ensayos cinéticos (4°C) (Fig. 6.19.1), o fueron congelados a -30°C hasta el momento de utilizarlos y realizar los ensayos (Fig. 6.19.2).

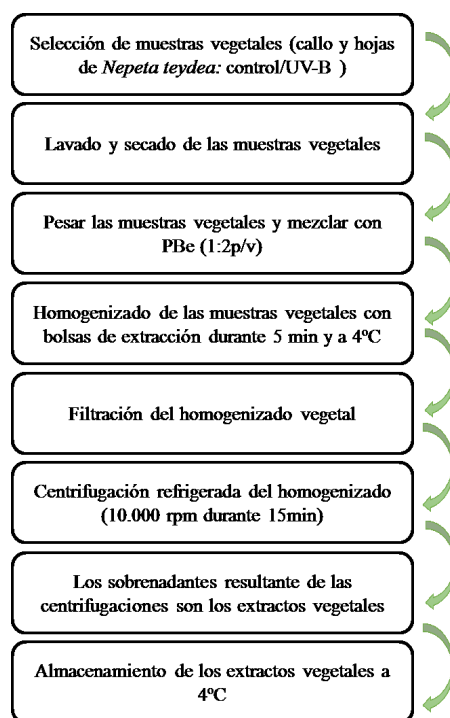


Figura 6.18.- Procedimiento realizado para la obtención de los extractos vegetales de *Nepeta teydea*.

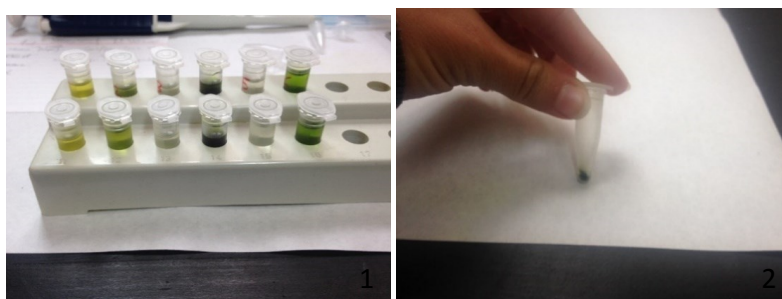


Figura 6.19.- 1) Extractos vegetales obtenidos al final del procedimiento de extracción; 2) Alícuota de extracto vegetal almacenado en un tubo de eppendorf a -30°C.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

VI.2.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN LAS MUESTRAS VEGETALES

Existen varios métodos para determinar la concentración de una proteína en solución (Stoscheck, 1990). Los más empleados son el método de Bradford y de Lowry, en los cuales se observan cambios en las propiedades colorimétricas de una sustancia (Bradford et al., 1976; Lowry et al., 1951). Estas metodologías implican realizar experimentos con tiempos de incubación determinados, curvas patrones, y consumo de la proteína, siguiéndose espectrofotométricamente en la zona visible.

En el presente estudio, se ha determinado la concentración de proteínas en los extractos vegetales, utilizando el método Bradford (1976), que se basa en la medición espectrofotométrica del cambio de absorbancia, debido a la formación de un complejo coloreado entre residuos aromáticos y restos de arginina de las proteínas y el Coomassie Brilliant Blue G (componente principal del reactivo Bradford). La intensidad de la coloración de la solución es proporcional a la cantidad de proteínas presentes en los extractos vegetales.

A diferencia de muchos otros ensayos (incluyendo el método de Lowry), el método de Bradford es un método muy utilizado en el laboratorio, por ser una técnica que además de tener una alta sensibilidad y especificidad, no sufre interferencias con otras moléculas y compuestos presentes en muestras biológicas.

VI.2.2.2.1. MATERIAL

Los materiales necesarios para realizar el método de Bradford incluyen: el reactivo de Bradford (que fabricamos en el laboratorio, como se indica en la siguiente figura), la albúmina de suero bovino (proteína estándar para obtener la recta patrón), obtenida de la casa comercial Sigma, y nuestras muestras (extractos vegetales de *Nepeta teydea*).

1. El reactivo de Bradford. Se puede utilizar el reactivo de Bradford de la casa comercial de Sigma-Aldrich (Bradford Reagent B6919), que se vende ya listo para su uso y que se puede almacenar a 4°C. Alternativamente, el reactivo de Bradford puede ser preparado en el laboratorio (Tabla 6.3) (Fig. 6.20.1).

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Tabla 6.5.- Componentes necesarios para la preparación del Reactivo de Bradford. Estos componentes se mezclan en el orden indicado, se disuelven mediante agitación, y finalmente se procede al filtrado de la disolución (Bradford, 1976).

Componentes	Cantidades
Azul de Coomassie Blue G-250	100mg
Etanol 95%	50ml
Ácido fosfórico 85% (w/v)	100ml
Agua	Hasta 1 litro

2. La albumina de suero bovino (BSA) (1mg/ml). Se disuelve BSA en solución salina y se mantienen congelados en alícuotas de 1ml de volumen para su uso inmediato (Fig. 6.20.2).
3. Muestras problemas. Se trata de los extractos crudos de *Nepeta teydea* obtenidos a partir de callos y hojas jóvenes de esta especie vegetal (Fig. 6.20.3).

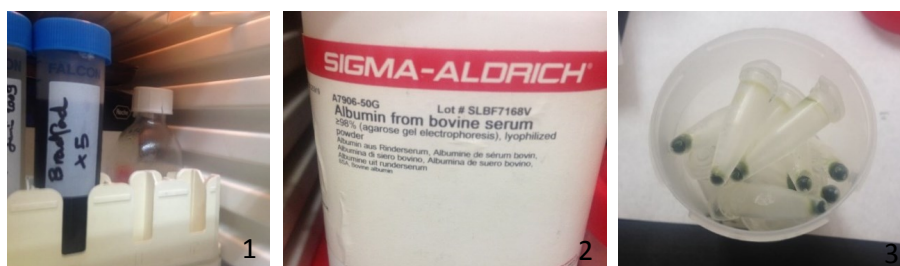


Figura 6.20.- 1) Reactivo de Bradford preparado en nuestro laboratorio; 2) Albúmina de suero bovino obtenida comercialmente de la casa Sigma; 3) Extractos vegetales obtenidos de callos y hojas jóvenes de plantas de *Nepeta teydea* control y sometidos a los diferentes tratamientos de luz ultravioleta.

VI.2.2.2. METODOLOGÍA

Experimentalmente, en primer lugar, se construye una curva de calibrado a partir de una disolución madre de BSA 1 mg ml^{-1} ($M=66\text{ kDa}$; $\epsilon_{280}= 43824\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), con cantidades que oscilan entre 0 y $40\mu\text{g}$ ($0\text{-}40\ \mu\text{l}$) de la proteína BSA, rango lineal para el reactivo. Para ello, se mezcla el volumen determinado de albumina bovina, el reactivo de Bradford (su volumen se mantiene constante en todos los tubos) complementando con agua MiliQ, de acuerdo con la tabla 6.4.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Tabla 6.6.- Tabla con los volúmenes de los reactivos de cada tubo, con la muestra proteica estándar (BSA), para la fabricación de la curva de calibrado.

Albumina	0 µl	4 µl	8 µl	12 µl	20 µl	30 µl	40 µl
Agua	320 µl	316 µl	312 µl	308 µl	300 µl	290 µl	280 µl
Bradford	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl
Volumen total	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl

La reacción colorimétrica se dejó desarrollar durante 5 min en los tubos. Posteriormente, cada una de las muestras de BSA se pasaron a cubetas semi-micro de polipropileno (VWR Cuvettes PS semi-micro) (Fig. 6.21.1), y se procedió a la lectura de la absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV-160A UV-Visible Recording Spectrophotometer) (Fig. 6.21.2).



Figura 6.21.- 1) Cubetas semi-micro de polipropileno (VWR Cuvettes) utilizadas para hacer las mediciones espectrofotométricas; 2) Espectrofotometro UV-Vis. Shimadzu UV-160 A, empleado en los ensayos.

Con los valores de absorbancia obtenidos con cada concentración de albumina bovina ensayada (Tabla 6.5), se construye la curva de calibrado.

Tabla 6.7.- Tabla con los datos de absorbancia de la proteína de referencia (BSA) para la fabricación de la curva de calibrado.

Volumen de albumina usado (µl)	Valor de absorbancia obtenido (nm)
0,00	0,00

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

4,00	0,10
8,00	0,26
12,00	0,35
20,00	0,50
30,00	0,63
40,00	0,66

Simultáneamente a la realización de la curva de calibrado, se determina el contenido proteico en las distintas muestras vegetales por triplicado. Para ello, a cada muestra proteica vegetal se le adiciona 80 μ l del reactivo Bradford, y se lleva a un volumen final de 400 μ l con agua MiliQ, tal y como se muestra en la tabla 6.6.

Tabla 6.8.- Tabla con los volúmenes de los reactivos de cada tubo, con las muestras vegetales problema (diferentes extractos vegetales de *Nepeta teydea*), para la determinación de concentración de proteína de las mismas.

Muestras	10 μ l	20 μ l	50 μ l
Agua	310 μ l	300 μ l	270 μ l
Bradford 5x	80 μ l	80 μ l	80 μ l
Volumen final	400 μ l	400 μ l	400 μ l

Una vez preparados todos los tubos de las muestras vegetales, se pasaron a cubetas y se procedió a la lectura de la absorbancia a 595nm en el espectrofotómetro (Tabla 6.7).

Tabla 6.9.- Tabla con los datos de absorbancia obtenido con los diferentes volúmenes y extractos vegetales ensayados.

Volumen de extracto utilizado (μ l)	Valor de absorbancia (nm)
10	0.283
20	0.361
30	0.444

Para realizar el cálculo de la concentración de proteínas en nuestras muestras vegetales, una vez obtenidos los valores de absorbancia de los extractos vegetales a

595nm, estos datos se interpolan en la curva de calibrado realizada con la proteína BSA, para determinar la concentración de proteínas (mg/ml) de estas muestras vegetales problemas (Fig. 6.22).

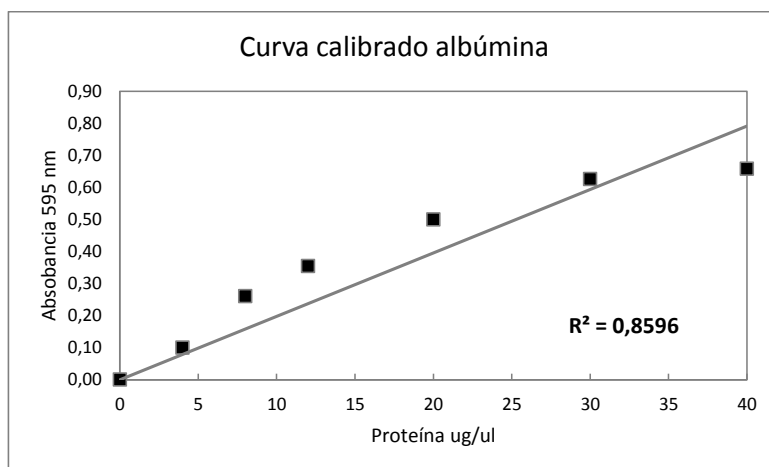


Figura 6.22.- Ejemplo de la curva calibrado de albúmina obtenida en nuestro ensayo, utilizando el método de Bradford.

VI.2.2.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA

La peroxidasa es una enzima oxidoreductasa que cataliza la oxidación de ciertos compuestos como fenoles (ácido ferúlico, ácido cafeico, guaiacol, pirogalol y catecol) y aminas aromáticas (o-dianisidina y o-fenilendiamina) por medio de peróxidos (H₂O₂). El H₂O₂, actúa como sustrato oxidante, mientras que el otro sustrato, actúa como reductor (sustrato oxidable).

Dentro de los sustratos oxidables, los más utilizados son: guaiacol (2-metoxifenol), o-dianisidina (4-(4-amino-3-methoxyphenyl)-2-methoxyaniline) y ABTS (ácido 2,2'-Azino-bis-[3-Etilbenzotiozol6-Sulfónico]). En el caso concreto del guaiacol, cuando este sustrato es oxidado en presencia de peroxidasa, se produce un producto coloreado (rojo ladrillo), el tetraguaiacol (Santiago et al., 2009; Whitaker, 1972) (Fig.6.23).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

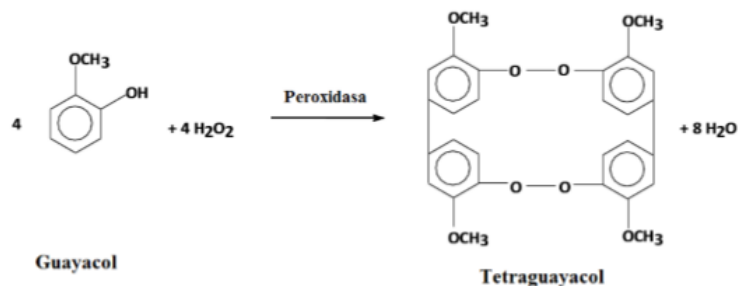


Figura 6.23.- Reacción de la Peroxidasa: oxidación del guaiacol (fenol) hasta la formación del tetraguaiacol, y reducción del H_2O_2 a H_2O (Santiago et al., 2009).

La velocidad de formación del color a su longitud de onda de absorción máxima (formación del producto oxidado) puede ser utilizado como medida de la actividad enzimática por lecturas espectrofotométricas de las absorbancias en relación con el tiempo, a una longitud de onda de 470 nm (Schmidt & Pennacchiotti, 2011). La relación de absorbancia, para disoluciones diluidas y con baja

El color de aspecto pardusco, obtenido del producto de la oxidación en la reacción mencionada, sirve como base para la estimación colorimétrica de la actividad enzimática de las peroxidasas (Zambrano et al., 2011).

VI.2.2.3.1. MATERIAL

El material vegetal utilizado para llevar a cabo la determinación de la actividad peroxidasa fueron extractos vegetales obtenidos a partir de callos *in vitro* y hojas de plantas de *Nepeta teydea*, que fueron sometidos a los diferentes ensayos de luz ultravioleta, descritos en el apartado 2.1.2. de materiales y métodos.

Para determinar la actividad peroxidasa se utilizaron reactivos grado análisis de Sigma C.O. (guaiacol, ácido ferúlico y o-dianisidina).

Para llevar a cabo la mezcla de reacción dentro de cada cubeta, vamos a necesitar un tampón de reacción, con un valor de pH determinado. Para la fabricación del tampón fosfato potásico, vamos a necesitar una base, el difosfato de potasio (PO_4HK_2) y un ácido, el monofosfato de potasio ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$), ambos de la casa comercial Sigma- Aldrich. El valor del pH del tampón se determinó utilizando un pH-metro (WTW. pH537).

Además, utilizamos un baño termostático (Büchi. Switzerland. Volt. 220. 1200 Vatios), para que las mezclas de reacción, se encuentren a una temperatura óptima, a la hora de realizar los ensayos espectrofotométricos. Así como un baño con hielo para las muestras que contiene los extractos.

Por otro lado, se utilizó como sustrato oxidante, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30%, de grado análisis, suministrado comercialmente por PANREAC Química S.A.U. Este producto se mantuvo a 4°C, hasta el momento de ser empleado en los ensayos.

Otro producto empleado, como diluyente de los sustratos ensayados en este proceso, es el etanol al 99%, de grado análisis, de Merck (MSD). Y el agua empleada durante todo el protocolo, fue H_2O grado mili-Q.

VI.2.2.3.2. METODOLOGÍA

El método usado para la determinación de la actividad peroxidasa se basa en la estimación espectrofotométrica directa de la variación de la absorbancia que se produce en el medio de ensayo, al catalizar el enzima la reacción de oxidación de un sustrato en presencia de peróxido de hidrógeno.

Para ello, lo primero es preparar el stock de cada uno de los sustratos a ensayar, el tampón de incubación y de los reactivos a utilizar en este proceso, como se describe a continuación:

- El stock de guaiacol se realizó diluyendo 49µl de guaiacol (stock líquido, comercial) en 500µl de etanol absoluto y posteriormente, se completa con 1500 µl de agua. Este stock, debe de ser empleado inmediatamente en los ensayos, o se puede almacenar en alícuotas a -20°C y las fracciones necesarias se llevan a temperatura ambiente antes de ensayar.
- El stock de ácido férulico se obtuvo mezclando 3.1mg de ácido férulico con 500µl de etanol absoluto, y una vez disuelto, se le añade 500µl de H_2O_2 d. Esta solución debe ser utilizada inmediatamente.
- El stock de o-dianisidina se preparó mezclando 3.1mg de o-dianisidina con 500 µl de etanol absoluto (con agitación durante 5 min), y se completa con 500 µl de agua. Este stock, se puede mantener en alícuotas a -20°C y las fracciones necesarias se llevan a temperatura ambiente antes de ensayar.

270

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

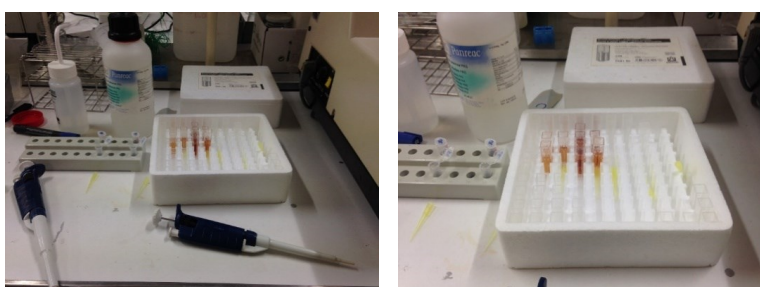
Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- El Tampón utilizado para determinar la actividad peroxidasa, fue el tampón fosfato potásico 100mM, pH 6.5. Para su preparación necesitamos realizar 250ml de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 100mM (ácido relativamente fuerte) al que le vamos añadiendo poco a poco una solución de PO_4HK_2 100mM (base débil), hasta conseguir el valor de pH 6.5, un valor próximo a su valor de pK o de máximo tamponamiento.
- El stock de peróxido de hidrógeno se realizó mezclando 100µl del H_2O_2 (comercial, estabilizado al 30%) con 900µl de agua.

Los ensayos espectrofotométricos, realizados para obtener las medidas de absorbancia, se llevaron a cabo a las λ donde se exhibía sus valores de absortividad (A) máximos, aquí expresados como ϵ máximos. De esta forma se ensayó a $\lambda=460\text{nm}$ para el sustrato reductor guaiacol (ϵ tetraguaiacol = $26.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), $\lambda=465\text{nm}$ para el sustrato reductor o-dianisidina (ϵ bis (3,3'-dimetoxi-4-amino) azo-bifenilo = $11.3\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), y $\lambda=348\text{nm}$ para el sustrato reductor ferúlico (ϵ bis-ferúlico = $18.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

La mezcla de reacción se llevó a cabo en cubetas semi-micro de polipropileno resistentes a los fenoles como el guaiacol y con un volumen máximo de 1.5ml, a las que se le añadió secuencialmente tampón fosfato potásico 100mM, pH 6.5, suficiente para obtener un volumen final de 1000 µl, una alícuota del sustrato reductor (guaiacol, o-dianisidina y ácido ferúlico) que osciló entre 0.5 y 20 µl, 10 µl del sobrenadante conteniendo la actividad de peroxidasa y finalmente 10 µl de H_2O_2 (iniciador de la reacción). Éste medio de reacción se agitó por succión y se ensayó en el espectrofotómetro empleando un tiempo máximo desde la mezcla hasta obtener el primer dato, de 5 segundos (Fig. 6.24).

El registro de la reacción se efectuó midiendo frente a un blanco, cuya cubeta únicamente contenía el tampón de reacción, el tampón fosfato potásico 100mM, pH 6.5.



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 6.24.- Cubetas semi-micro de polipropileno utilizadas en los ensayos espectrofotométricos para medir la actividad peroxidasa, en el que se puede apreciar el color de las mezclas de reacción para la lectura de absorbancias.

Los cambios en la absorptividad del ensayo debido al producto de oxidación de cada sustrato reductor empleado, se registraron espectrofotométricamente durante 120 segundos y a una temperatura de 25°C (Fig. 6.25).

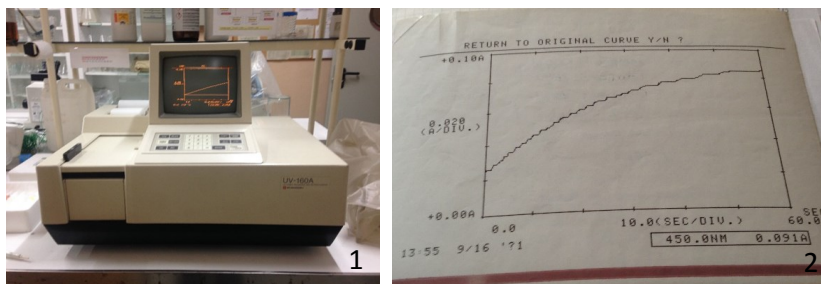


Figura 6.25.- 1) Todas las determinaciones enzimáticas se realizaron con un espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu. UV-160A) como en el que se observa en la imagen; 2) Gráficas resultantes de uno de los registros espectrofotométricos, impresa por el espectrofotómetro UV-Vis, que muestra los cambios de absorbancia de un sustrato reductor (ácido ferúlico) empleado a lo largo de los 2 minutos de lectura.

La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción (V_0). Esto es posible, debido a que la medida de actividad está directamente relacionada con la pendiente de la recta del incremento de Absorbancia (ΔAb) en función del tiempo (t) (Fig 6.26). Así que, para calcular la actividad enzimática de nuestras muestras vegetales, de cada una de las gráficas obtenidas espectrofotométricamente, calculamos el valor de la velocidad inicial de la reacción V_0 , obteniendo la pendiente máxima de la recta ΔAbs de cada uno de los sustratos empleados con respecto al tiempo (t), durante los primeros 30 segundos lineales del ensayo. Los valores obtenidos de V_0 , se expresaron como unidades de Absorbancia por segundo ($UAb \times s^{-1}$)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

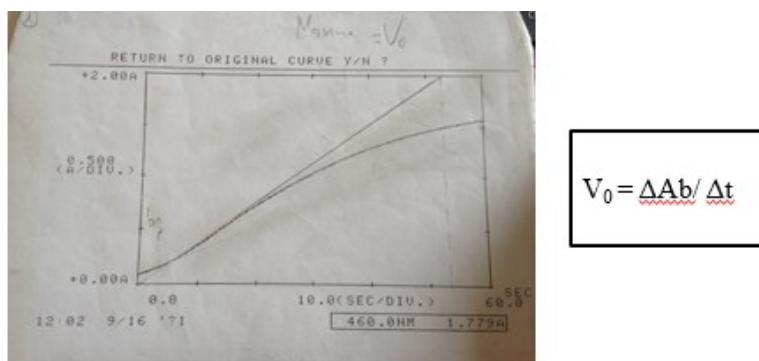


Figura 6.26.- Grafica registrada espectrofotométricamente, en la que se ha obtenido la pendiente máxima de la recta ΔAb frente al tiempo empleado, es decir, la velocidad inicial de reacción (V_0).

Previamente a los ensayos cinéticos, se llevó a cabo la optimización de las condiciones de medida para ajustar los valores de concentración de sustrato a concentraciones equivalentes a $10 \times K_m$ para los sustratos reductores, y a concentraciones equivalentes a $5 \times K_m$ (concentraciones inferiores a la correspondiente a V_{max}) para el caso del sustrato oxidante (como valor de compromiso entre velocidad máxima y estabilidad). Por ello, cuando referimos los valores de V_0 a $1 \mu l$ de preparado enzimático, lo denominamos como actividad enzimática aparente.

La actividad enzimática aparente, se expresó como Unidades de Absorbancia por segundos y por μl de preparado enzimático ($UAb \times s^{-1} \times \mu l$ de enzima).

Posteriormente, cada uno de los valores de actividad enzimática aparente se promediaron respecto a la concentración de proteínas presentes en los sobrenadantes ensayados, para obtener la actividad enzimática específica. La actividad enzimática específica, se expresó como unidades de Absorbancia por segundos y por mg de proteínas presentes en el preparado enzimático ($UAb \times s^{-1} \times mg$ de proteínas).

VI.2.2.4. ESTUDIO CINÉTICO DE LA ESPECIFICIDAD POR SUSTRATOS

Las peroxidasas son enzimas muy inespecíficas (debido a los altos potenciales de oxidación de sus intermediarios (Compuesto I y II)), que los convierte en adecuados agentes oxidantes, pudiendo oxidar una gran variedad de compuestos (Fig. 6.27).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

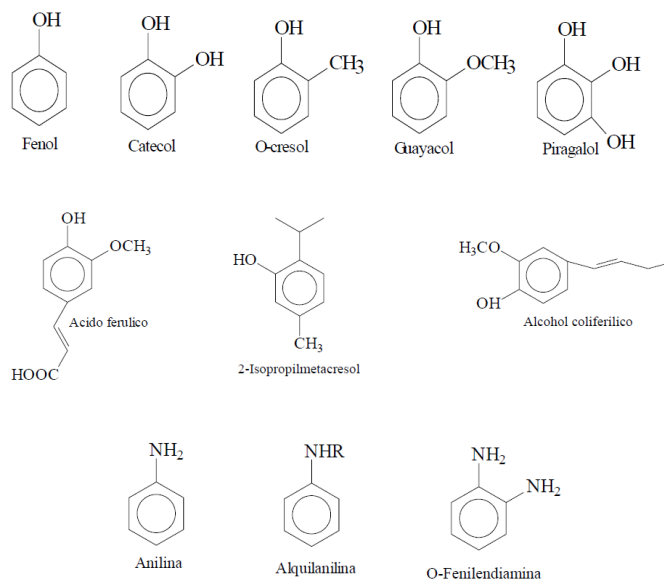


Figura 6.27.- Estructura química de los sustratos donadores de electrones en las reacciones catalizadas por las peroxidasa (Carey, 2000).

VI.2.2.4.1. MATERIAL

En este trabajo, se utilizó el espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu.UV-160A) y el baño termostático (Büchi) para el estudio cinético de la especificidad de la peroxidasa de *Nepeta teydea*, y se emplearon varios sustratos reductores: dos de naturaleza fenólica (guaiacol y el ácido ferúlico), y uno de naturaleza no fenólica (o-dianisidina) (Fig. 6.28).

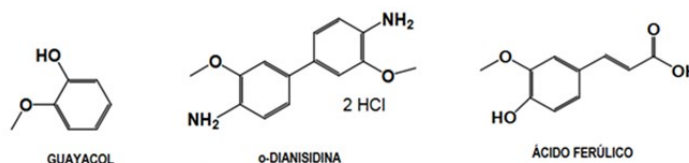


Figura 6.28.- Estructura química de los sustratos que se utilizó para hacer nuestros estudios de cinética enzimática: guaiacol, o-dianisidina y el ácido ferúlico.

Los extractos vegetales enzimáticos se obtuvieron como se describió en el apartado 2.2.1.2 de materiales y métodos, y se utilizó como tampón de reacción el Tampón fosfato potásico 100mM, pH 6.5.

VI.2.2.4.2. METODOLOGÍA

Para identificar las reacciones de peroxidasa empleando diferentes sustratos reductores se realizó el mismo protocolo de ensayo descrito más arriba y a las concentraciones que se indican en los resultados. En general para los ensayos espectrofotométricos de cálculo de la absorbancia, se empleó un volumen de reacción de 1000 μl que contenía el H_2O_2 y el sustrato a ensayar, en un tampón fosfato pH 6,5. Para los ensayos de capa fina se utilizó un volumen de 5 ml que contenía los mismos componentes que para la reacción espectrofotométricamente. En este caso, se paró la reacción por inmersión a 0°C y posterior se llevo a cabo la extracción de los productos de reacción con 500 μl de acetato de etilo que se concentraban a 100 μl . Volúmenes de 10 μl de este concentrado se emplearon para el desarrollo de las cromatografías sobre cromatofolios dotados de enhancer a 254 nm. Las muestras se identificaron bajo luz UV y se determinó sus valores de R_F (La constante R_F = Ratio of Front = se define como distancia de la muestra desde el origen/ distancia del eluyente desde el origen)

Las longitudes de onda de medida de cada sustrato, los coeficientes de extinción molar de sus productos de oxidación y la temperatura de medida se citan en la tabla 6.8.

Tabla 6.10.- Características de los tres sustratos utilizados para el estudio cinético

Sustrato	λ (nm)	ϵ ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	T ($^\circ\text{C}$)
Guaiacol	460	26.6	25
Ácido ferúlico	348	18.6	25
o- Dianisidina	465	11.3	25

VI.2.2.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL PH SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA

La estabilidad y actividad enzimática está relacionada con la propia estructura del enzima, la cual a su vez depende de factores fisicoquímicos como la temperatura, pH, la presencia de iones y la fuerza iónica (Adams, 1991). De estos, la temperatura y el pH, son los más importantes para identificar tipos diferentes o variaciones en el comportamiento de los enzimas.

VI.2.2.5.1. MATERIAL

275

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Para el estudio del efecto del pH y de la temperatura sobre la actividad de la peroxidasa, se realizaron ensayos espectrofotométricos utilizaron como sustratos oxidables, los sustratos descritos como sustratos naturales ácido ferúlico y el ácido cafeico, a fin de obtener una visión más ajustada al entorno químico normal de la célula (Fig. 6.29).

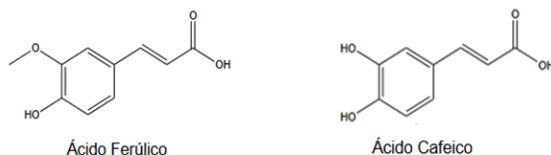


Figura 6.29.- Estructura química del ácido ferúlico y el ácido cafeico.

Se emplearon un pH-metro de la casa comercial WTW. Serie 537 (Fig.6.30.1), y un baño termostático de la marca Büchi. Switzerland (Fig. 6.30.2), para los ensayos de pH y temperatura respectivamente.



Figura 6.30.- 1) pH-metro empleado en los ensayos bioquímicos (WTW. Serie 537); 2) Baño termostático (Büchi. Switzerland. Volt: 220. Vatios: 1200)

VI.2.2.5.2. METODOLOGÍA.

Antes de realizar los ensayos espectrofotométricos, se procedió a la preparación del stock del ácido cafeico (el nuevo sustrato oxidable a ensayar), y a la fabricación del tampón de reacción (tampón fosfato potásico 100mM) con diferentes valores de pH, como se describe a continuación:

- El stock de ácido cafeico y ácido cafeico se obtiene como se ha descrito más arriba.

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Los tampones fosfato potásico 100mM, se ajustaron a los siguientes valores de pH: 5.56, 6.06, 6.28, 6.6, 6.78, 7.04, 7.27, 7.53, 7.76 y 8.01.
- El resto de los componentes de la mezcla de reacción (extracto enzimático y el peróxido de hidrógeno) se prepararon igual que se comentó anteriormente en el apartado de la actividad peroxidasa.

Para la determinación de la temperatura óptima de la reacción de la peroxidasa, los diferentes componentes de la mezcla de reacción (500µl), se preincubaron a la temperatura de ensayo a valores +/- 0,5 °C en cubetas de ensayo. La muestra de sobrenadante procedente del extracto enzimático de *Nepeta teydea*, se preincubó con el tampón de reacción (500µl) durante 5 minutos a la misma temperatura que los sustratos, y posteriormente, se adicionó a la cubeta, esta se secó exteriormente y se midió inmediatamente a la temperatura indicada durante 30 segundos.

Para los ensayos de pH, la actividad peroxidasa se midió en cubetas semi-micro, adicionándose concentraciones constantes de uno de los dos sustratos reductores (20µl de ácido cafeico o ácido ferúlico) y H₂O₂ (2µl), del extracto vegetal enzimático (20µl) y del tampón de reacción (1000µl). El único parámetro variable, fue el valor de pH del tampón fosfato potásico 100Mm, que osciló entre 5.56 y 8.01.

Los ensayos de pH se llevaron a cabo a una temperatura de 25°C. Se determinó el valor de estabilidad, midiendo el tiempo (en minutos) en que la actividad de la peroxidasa era lineal (V₀).

VI.2.2.6. DETERMINACIÓN DE SUS PARÁMETROS CINÉTICOS (K_M y V_{max})

Al igual que los parámetros temperatura y pH representan valores importantes fisicoquímicos, los parámetros cinéticos **K_M** y **V_{max}**, representan los parámetros bioquímicos más importantes de un enzima, siendo, además, característicos de cada enzima.

La velocidad máxima **V_{max}**, se obtiene cuando la velocidad de reacción se hace independiente de la concentración de sustrato, cuando esto ocurre la velocidad alcanza un valor máximo. El valor depende únicamente de la cantidad de enzima que tengamos. (Nos da información sobre la cantidad de enzima presente, ya que la **V_{max}** es directamente proporcional a la concentración de enzima).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Mientras que la constante de Michaelis (K_M), nos indica la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. Este parámetro es independiente de la concentración de enzima, y es característico de cada enzima según el sustrato utilizado. La K_M (es independiente de la concentración de enzima y de la concentración de sustrato) también nos indica la afinidad que posee el enzima por el sustrato. Cuanto menor es el valor de K_M , mayor es la afinidad del enzima por el sustrato. El cálculo de la K_M se usa, para comparar la afinidad de una enzima por sustratos diferentes o de enzimas diferentes por un mismo sustrato (Fig. 6.31).

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

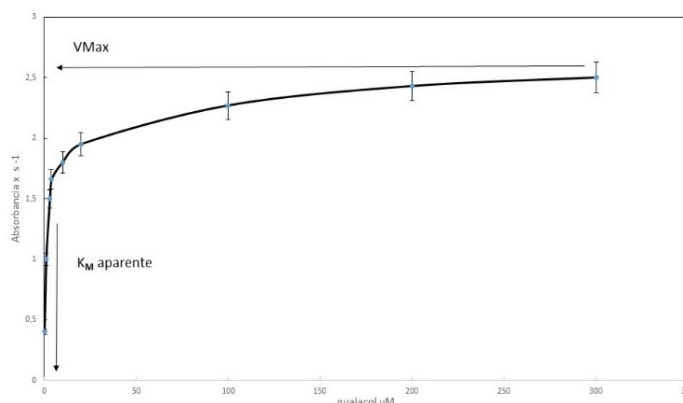


Figura 6.31.- Representación de Michaelis-Menten para un ensayo de *Nepeta teydea* con guaiaacol, y modelo de Michaelis-Menten. En la figura observamos que a bajas concentraciones de sustrato (S), la velocidad de reacción (V_0) es directamente proporcional a la concentración del sustrato (orden 0). Este comportamiento es característico de la mayoría de los enzimas. A concentraciones mayores de sustrato, los incrementos de velocidad inicial en respuesta a los incrementos de la concentración de sustrato son cada vez menores. Finalmente alcanzamos un punto de saturación del centro activo del enzima a partir del cual, la velocidad tiende a ser constante (V máxima).

La afinidad (K_M) del enzima es característico de cada isoenzima que forman la actividad enzimática de estudio y en nuestro modelo intentaremos detectar a “grosso

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

modo” la predominancia de un tipo de isoenzima sobre otro en diferentes extractos sometidos a diferentes estímulos. El valor de V_{max} nos indica, por otro lado, la cantidad total de enzima presente en diferentes extractos conteniendo la misma cantidad de proteína total.

VI.2.2.6.1. MATERIAL

Para la determinación de los parámetros cinético K_M y V_{max} de la peroxidasa de *Nepeta teydea*, se ensayó espectrofotométricamente concentraciones variables de dos sustratos oxidables: el guaiacol y o-dianisidina.

Además, se empleó extractos obtenidos a partir de callos y hojas de *Nepeta teydea* (ambos sometidos a experimentos de luz ultravioleta), en las condiciones de ensayo general descritas más arriba.

VI.2.2.6.2. METODOLOGÍA

Para determinar los parámetros cinéticos de la peroxidasa de *Nepeta teydea*, lo primero que hay que preparar es, cada uno de los sustratos a ensayar, los reactantes, y el tampón de reacción que se va a utilizar en este proceso. Y ello, se realizó como se describió en el apartado de determinación de la actividad peroxidasa.

Una vez preparados todos los reactantes y sustratos del ensayo, se llevaron a cabo varios experimentos para identificar los valores aproximados de K_M (K_M ap) y V_{max} para la actividad de la peroxidasa (mezcla de enzimas) en hoja y callos de la especie *Nepeta teydea*, a fin de establecer los valores óptimos para los ensayos.

Para ello, se prepararon diferentes mezclas de reacción (Tabla 6.9). Se emplearon diferentes concentraciones de los sustratos guaiacol y o-dianisidina a partir del stock mM tal y como se describe más arriba. El resto de los componentes del medio de reacción se mantuvieron constante durante todos los ensayos realizados, es decir, 10 μ extracto crudo vegetal y 10 μ de peróxido de hidrógeno en un volumen final de 1000 μ l conteniendo tampón de incubación fosfato potásico 100mM, a pH 6.5 y °C.

Tabla 6.11.- Componentes de la mezcla de reacción ensayados para determinar los parámetros cinéticos de la peroxidasa de *Nepeta teydea*: K_M y V_{max} .

Componentes	Volúmenes (μ l)
Tampón fosfato potásico, 100mM,	1000

279

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 27/06/2017 09:46:14

JUAN IGNACIO FRIAS VIERA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 19:33:58

FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

29/06/2017 09:05:47

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

18/07/2017 14:28:34

pH 6.5	
Sobrenadante (diferentes experimentos)	10
Sustrato:	
- Guaiacol	Volumen variable: 20, 15, 7, 3, 1 y 0.5
- O-dianisidina	Volumen variable: 20, 15, 7, 3, 1 y 0.5
H₂O₂	10

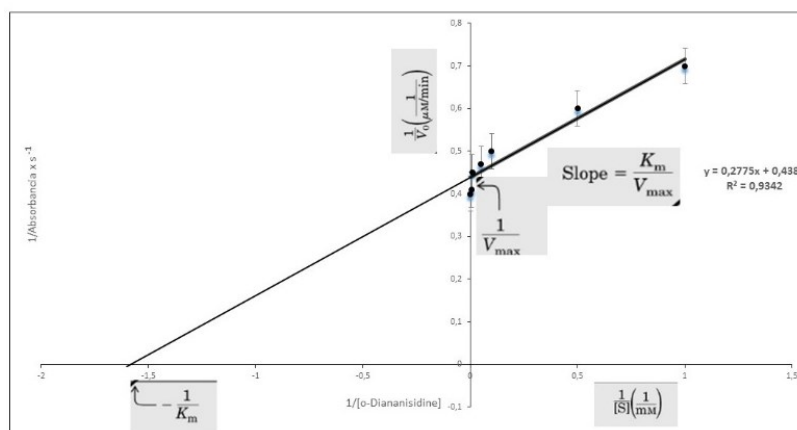
Previamente a la realizaron del medio de reacción, se procedió a equilibrar el tampón de reacción a 25°C, antes de ser empleados en los ensayos.

Tras añadir todos los componentes de la mezcla de reacción (en el orden indicado), se mezcló por succión, y se procedió a registrar espectrofotométricamente el incremento de absorbancia durante 120 segundos.

Los valores de **K_M** y **V_{max}** se determinaron con la ecuación de Lineweaver-Burk, una transformación lineal de la ecuación de Michaelis Menten.

En la representación de Lineweaver-Burk (Fig. 6.32), se representa 1/V₀ frente a 1/S, esto es la inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración de sustrato (dobles inversas), y así se obtiene una recta cuya intersección con el eje X es -1/ **K_M** y con el eje Y es 1/**V_{max}**, siendo la pendiente **K_M /V_{max}**.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Figura 6.32.- Representación de Lineweaver-Burk de un experimento de *Nepeta teydea* con o-dianisidina, indicando los componentes principales de la ecuación en el gráfico.

A partir de la ecuación de la recta se puede extrapolar los valores directamente de K_M y V_{max} llevando respectivamente los correspondientes términos de abscisas y ordenadas al valor 0 y despejando la ecuación.

VI.2.2.7. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

El término electroforesis fue descrito, para definir el fenómeno por el cual una molécula cargada se desplaza en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico constante. La velocidad de migración o movilidad de estas moléculas bajo la influencia de una diferencia de potencial y sometidas a una resistencia, es directamente proporcional a la intensidad del campo aplicado, a las características propias de las moléculas (su carga neta, tamaño y forma), y a las características de la matriz (resistencia) en el cual se están desplazando o moviendo las moléculas (su fuerza iónica, viscosidad y temperatura).

En el estudio de las proteínas la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en sus múltiples variantes es la técnica de referencia. Este tipo de electroforesis se caracterizan por presentar una buena resolución y una gran versatilidad, se puede realizar en condiciones nativas (nativa-PAGE) o en condiciones desnaturizantes empleando sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE)

En la nativa-PAGE la estructura tridimensional y conformación de las proteínas permanecen inalteradas. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Sin embargo, en el caso de las SDS-PAGE, la presencia del detergente y desnaturizante SDS, produce la desnaturalización de las proteínas, de manera que, la migración de las proteínas solo depende de su carga y de su tamaño, pero no de otras características físicas de la proteína como su forma.

La SDS-PAGE fue originalmente descrita por Laemmli en 1970 (Laemmli, 1970), y es la electroforesis de proteínas más utilizada. Bajo estas condiciones, las moléculas de SDS cargadas negativamente se unen a las proteínas, de manera que, la carga propia de la molécula de proteína queda completamente bloqueada o enmascarada por SDS, confiriéndole carga neta negativa. Además, es habitual, emplear otros agentes

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

desnaturalizantes como es el agente reductor, el β -mercaptoetanol, que permite, tras calentar la muestra, reducir los puentes disulfuros (enlaces de cistina) intra e intercadena y facilita la separación de las diferentes cadenas polipeptídicas que conforman la estructura cuaternaria de algunas proteínas.

La SDS-PAGE, se utiliza frecuentemente para determinar el peso molecular de proteínas desconocidas, comparando su movilidad electroforética con la de una serie conocida de proteínas estándar. Sin embargo, debido a que las proteínas se desnaturalizan, es imposible detectar la actividad enzimática, como ocurre en el caso de las nativa- PAGE, en las que por otro lado no puede determinarse el PM.

Las SDS-PAGE requieren un sistema de tampones y geles que conforman un sistema de electroforesis discontinuo formado por dos geles: un gel concentrador con baja resistencia a la movilidad y a un pH ácido, y un gel de separación con mayor resistencia a la movilidad y mayor valor de pH (que es donde se produce la verdadera separación).

En el caso de las nativa-PAGE se emplea un sistema de tampón único, aunque pueden establecerse 2 geles con diferente resistencia a la movilidad e idéntica función. En nuestro trabajo, se ha empleado electroforesis PAGE y SDS-PAGE, en sistema tampón discontinuo.

El revelado o tinción de las bandas de proteínas separadas por SDS-PAGE emplea frecuentemente azul de Coomassie, mientras que en las nativa-PAGE la conservación de la integridad estructural de las proteínas permite su identificación empleando sustratos que producen color (Hames, 1998)

VI.2.2.7.1. MATERIAL

Se emplearon callos de *Nepeta teydea* inducidos en condiciones *in vitro* con dos reguladores hormonales: ANA y 2,4-D (Material y métodos 2.2.1.2). El sobrenadante obtenido a partir de los extractos de callo (4mg/ml) se utilizó directamente en las electroforesis.

Para la realización de este ensayo, se utilizó como equipo electroforético, el sistema Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell (BIO-RAD. USA), y se emplearon geles de poli(acrilamida) (acrilamida y bis-acrilamida) que fueron preparados en el laboratorio. Los geles de poli(acrilamida) (que son químicamente inertes, y estables en un

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica), se forman por la polimerización de la acrilamida al 99% (monómero) por acción de un agente entrecruzador (“cross-linking”), la bis-acrilamida (N, N’-metilen-bis-acrilamida), en presencia de un iniciador, TEMED al 99% (N, N, N’, N’-tetrametilnediamina), y de un catalizador, el ión persulfato ($S_2O_8^-$) que se añade en forma de persulfato amónico al 98%. Todos estos productos necesarios para la fabricación de los geles, se obtuvieron de la casa comercial Sigma.

Los geles de poliacrilamida, actúan como un tamiz, retardando el desplazamiento de las macromoléculas y permitiendo el libre movimiento de las moléculas más pequeñas, potenciando de esta manera la separación de las moléculas. No obstante, el tamaño del poro de los geles, se puede modificar en función del porcentaje de acrilamida utilizado para su fabricación. Así, los geles que presentan un porcentaje de acrilamida alto, son óptimos para llevar a cabo la separación de pequeñas proteínas, y lo inverso para proteínas grandes.

Además, es necesario la fabricación de varios tampones de diferente composición química, y distintos valores de pH. Para la preparación de todas estas soluciones, vamos a necesitar los siguientes productos químicos de la casa Sigma: Tris-base (Tris (hidroximetil) aminometano), Ácido clorhídrico al 35% (HCl) y Glicina al 99% (Gly).

Para la preparación del tampón de carga de las muestras vegetales que vamos a someter a la electroforesis, vamos a necesitar, Glicerol al 99% (Sigma) y azul de bromofenol (indicador de pH 3.0-4.6) de Merck). Además, en los casos en los que se realizó electroforesis en condiciones desnaturizante, fue necesario, añadir al tampón de muestras, el β -mercaptoetanol (Sigma) y SDS (SERVA).

Se emplearon marcadores de PM de rango amplio (14-200 kDalton, Sigma-C.O.) para las SDS-PAGE.

Para llevar a cabo la tinción y el revelado de los geles, se utilizó los siguientes compuestos químicos: ácido acético (ácido acético glacial purísimo de Panreac), metanol al 99.8%, agua destilada, azul de Coomassie R-250 (Coomassie Brilliantblau R-250, de la casa comercial Merck), tampón fosfato pH 6.5, y como sustratos reductores, se usó el guaiacol y la o-dianisidina, todos ellos, de la casa comercial Sigma.

VI.2.2.7.2. METODOLOGÍA

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Para la realización de electroforesis en geles de poliacrilamida, necesitamos preparar una serie de disoluciones, que se describen a continuación:

- Disolución de Acrilamida/Bis-acrilamida: se mezcla 30.6g de acrilamida y 0.8g de bis-acrilamida en 100ml de H₂O destilada.
- El polimerizador, persulfato amónico, se prepara al 10%. Para ello, se pesa 100mg de persulfato y se disuelve en 1ml de H₂O destilada.
- Tampón STAKING, el Tampón Tris/HCl, a pH 6.8 (utilizado para la fabricación del gel superior), se fabrica mezclando 6g de Tri-base en 100ml de H₂O destilada, y con la adición de HCl se ajusta el pH a 6.8. Se almacena a 4°C, hasta el momento de su uso.
- Tampón RESOLVING, el Tampón Tris/HCl, a pH 8.8 (empleado para la preparación del gel inferior), se realizó disolviendo 31.6g de Tris-base en 100ml de H₂O destilada, y con el HCl se ajusta el pH a 8.8. Se almacena a 4°C, hasta el momento de la realización del ensayo.
- Tampón RUNNING (2X), o también denominado el tampón de electroforesis, se preparó mezclando como máximo 3 g de Tris-base con 14.4g de glicina en H₂O destilada hasta un volumen final de 1 litro, con un valor de pH de 8.3. Posteriormente, se mantiene a 4°C, hasta su utilización.

Las proteínas se separaron por electroforesis usando minigeles de poliacrilamida de 1,5 mm x 12 x 12cm de espesor, y un sistema de geles discontinuos, desarrollándose la electroforesis en una cubeta vertical Mini-Protean®3 (Bio-Rad, USA) (Fig. 6.33), siguiendo las indicaciones del fabricante.

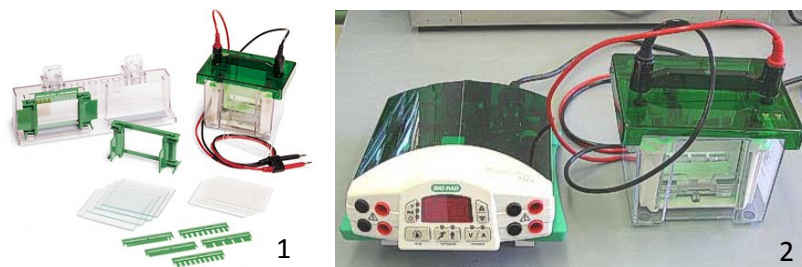


Figura 6.33.- 1) Componentes del equipo electroforético utilizados para la realización de la electroforesis en gel de poliacrilamida. Se trata del sistema electroforético Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell (BIO-RAD. USA); 2) Sistema electroforético

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 965383		Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14	
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58	
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47	
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34	

montado con la fuente de alimentación utilizado para llevar a cabo nuestros ensayos (Modelo No. Power Pac Basic. 041 BR 21177. Max Power:150VA).

Estos minigeles discontinuos, se elaboran entre dos placas de cristal en un soporte vertical, a partir de la disolución de Acrilamida/Bis-acrilamida (30.6% de monómero; 0.8% agente de entrecruzamiento), de manera, que cada gel está formado por una fase inferior (gel de separación o gel Resolving) y una fase superior (gel de concentración o gel Staking) (Fig.6.34.1-2).

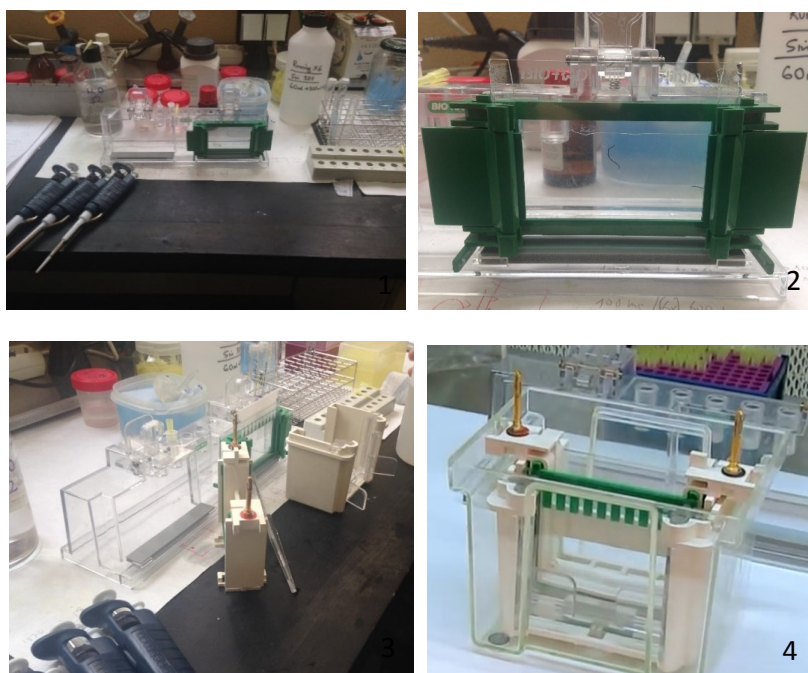


Figura 6.34.- 1-2) Preparación en nuestro laboratorio, de minigeles verticales de poliacrilamida en el soporte del sistema Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell (BIO-RAD. USA); 3-4) Preparación del resto de componentes del sistema electroforético, para incorporar el gel polimerizado dentro del minitanque.

El gel de separación, o Resolving, se preparó al 7.5% de acrilamida/bis-acrilamida. Para ello, se necesita los siguientes productos: H₂O destilada, tampón Resolving (tampón Tris-HCl, pH 8.8), disolución de acrilamida/bis-acrilamida, persulfato amónico al 10% y finalmente TEMED.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 965383		Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14	
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58	
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47	
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34	

Una vez se ha mezclado todos los componentes del gel de separación, hay que introducirlo rápidamente con ayuda de una micropipeta, entre los moldes de cristal para formar el gel del equipo electroforético, y se le añade H₂O, para que se produzca la polimerización del gel inferior (el oxígeno del aire impide la polimerización del gel). Posteriormente, cuando ya ha polimerizado el gel de separación, se elimina el H₂O, y se procede a introducir el gel de concentración, por encima del gel de separación ya polimerizado.

El gel de concentración, o Staking, de unos 2cm de largo, se preparó al 4% de acrilamida/bis-acrilamida. Su composición incluye: H₂O destilada, tampón Staking (tampón Tris-HCl pH 6.8), disolución de acrilamida/bis-acrilamida, persulfato amónico al 10% y, por último, TEMED.

La composición y las cantidades de cada uno de los componentes de los dos geles que constituyen el minigel de la electroforesis, se resumen en la siguiente tabla 6.11.

Tabla 6.12.- Composición de los mini-geles nativos de la electroforesis de poliacrilamida (PAGE).

Reactivos	Gel Resolving 7.5% (gel inferior)	Gel Staking 4% (gel superior)
Agua destilada	1980 µl	1240 µl
Tampón Tris-HCl pH 8.8	1000 µl	-
Tampón Tris-HCl pH 6.8	-	500 µl
SDS	-	-
Acrilamida/Bis-acrilamida (30%)	1600 µl	260 µl
Persulfato amónico al 10%	30 µl	20 µl
TEMED	3 µl	3 µl
Volumen total	4000 µl	2000 µl

Una vez introducido gran parte del gel de concentración entre los moldes de cristal, se introduce el peine que va a formar los pocillos del gel, en los que se va a

cargar las muestras, y se termina de rellenar con el gel de empaquetamiento. Tras la solidificación de este gel, a temperatura ambiente, se saca el peine, y se bañan los pocillos con H₂O destilada, y finalmente se elimina los restos de agua.

Finalizada la preparación del gel discontinuo de la electroforesis, se sacó del soporte en el que se fabricó, y se procedió a insertar las placas de cristal con el gel polimerizado en su interior, en el soporte y este en la cubeta del equipo electroforético, con el tampón de desarrollo, formando un sistema electroforético conectado a los polos eléctricos (Fig. 6.36).

Las muestras se prepararon diluyendo 60µl de extracto vegetal de *Nepeta teydea* (4mg/ml) en 20 µl de tampón muestra 4x (Tampón de incubación 4x), independientemente de que la electroforesis se realizara en condiciones no desnaturizantes (PAGE) o en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Tabla 6.13).

Tabla 6.13.- Composición del tampón de carga en condiciones no desnaturizante, también denominado Tampón incubación Nativo (4x), y la composición del tampón de carga en condiciones desnaturizantes, Tampón incubación Desnaturizante (4x).

Reactivos	Tampón incubación NATIVO (4x)	Tampón incubación DESNATURIZANTE (4x)
Agua	6200 µl	4000 µl
Tampón Tris-HCl pH 6.8	1000 µl	1000 µl
Glicerol	800 µl	800 µl
SDS 10%	-	1600 µl
Beta-mercaptoetanol	-	400 µl
Azul de bromofenol	4 mg	4mg
Volumen total	8000 µl	8000 µl

Con el gel y las muestras preparadas para la electroforesis (diluidas en tampón Sample) (Fig.6.35), se procedió a cargar las muestras en el gel. Para ello, previamente se estableció un orden determinado, en el que se iba a realizar las cargas de las diferentes muestras vegetales y el marcador de peso molecular en los pocillos del gel.

La carga de las muestras en los geles, dependiendo de su concentración en proteínas, variaba de 2 a 50 μ l/pocillo a fin de aplicar muestras equivalentes en controles y ensayos.

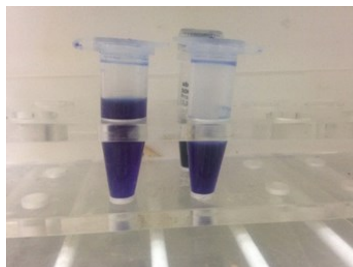


Figura 6.35.- Muestras vegetales preparadas para aplicarlas en la técnica de electroforesis. Extractos vegetales de *Nepeta teydea* diluidas en Tampón incubación (4x) y Tampón incubación desnaturalizante (4x).

Tras la carga de todas las muestras a ensayar en los pocillos del gel de poliacrilamida, se pone la tapa al minitanque, quedando conectado los electrodos de la electroforesis (Fig. 6.36.1). Finalmente, se conectó la fuente de alimentación del sistema electrofórico (Modelo No. Power Pac Basic. 041 BR 21177. Max Power:150VA) (Fig. 6.36.2). El potencial aplicado para el desarrollo de la electroforesis fue de 80V durante 60 minutos.

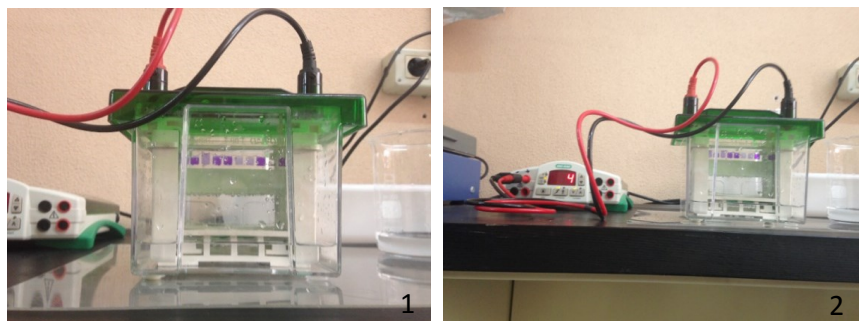


Figura 6.36.- 1) Cubeta electrofórica ya montada, en el que se observan las muestras vegetales cargadas en los pocillos del gel de poliacrilamida; 2) Sistema electrofórico conectado a la fuente eléctrica, para la aplicación del voltaje necesario para realizar la electroforesis.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Finalizada la electroforesis, cuando el frente de Azul de bromofenol alcanzó la parte inferior del gel discontinuo de poliacrilimida, se desconectó la fuente de alimentación, y el gel de poliacrilamida se extrajo de la cubeta o minitanque del sistema electroforético, siendo teñido o revelado con sustratos de peroxidasa, mediante la inmersión del gel en 100ml de tampón fosfato a pH 6.5 (4°C), durante 15 minutos (para equilibrar el pH del gel) seguido de la incubación del gel durante otros 15 minutos, en 20 ml tampón fosfato a pH 6.5 que contenía los diferentes sustratos de la peroxidasa: diaminobencidina o guaiacol a 10 mM y H₂O₂ a 0,5 mM.

También, se realizó la tinción de los geles de poliacrilamida con una solución de Azul de Coomassie. Para ello, se transfirió el gel a un recipiente que contenía la solución de tinción de Coomassie (Tabla 6.14), y se deja el gel totalmente sumergido (Fig. 6.37.1) durante 1 hora, a temperatura ambiente y en condiciones de agitación suave (para ello se utiliza un Vortex Shaker, Orbit 300, Labnet) (Fig. 6.37.2).

Tabla 6.14.- Composición de la solución de tinción Azul de Coomassie, en el que se incubaron los geles de poliacrilamida.

Reactivos	Cantidades
Azul de Coomassie R-250	1g
Ácido acético	100ml
Metanol	400ml
H₂O destilada	Hasta 1litro

Por último, se elimina la solución de tinción Azul de Coomassie (que se puede conservar para futuras tinciones), y se destiñó el gel, utilizando una solución decolorante (Tabla 6.15).

Tabla 6.15.- Composición de la Solución decolorante de geles de poliacrilamida teñidos previamente con la solución de tinción Azul de Coomassie.

Reactivos	Cantidades
Ácido acético	100ml
Metanol	400ml
H₂O destilada	Hasta 1litro

Los geles teñidos, se lavaron sucesivas veces con la solución decolorante, para eliminar el exceso de coloración del gel (eliminando el colorante no fijado a las proteínas). Después, los geles se mantuvieron sumergidos en esta misma solución decolorante toda la noche (Fig. 6.37.3), obteniéndose geles en los que sólo quedaron teñidas de azul las proteínas.

Después de todo este procedimiento, los geles de poliacrilamida teñidos o revelados, se colocaron sobre un plástico transparente, y se escanearon en un escáner Epson perfection V500 para su cuantificación empleando el programa ImageJ de análisis de imágenes (Fig.6.37.4).

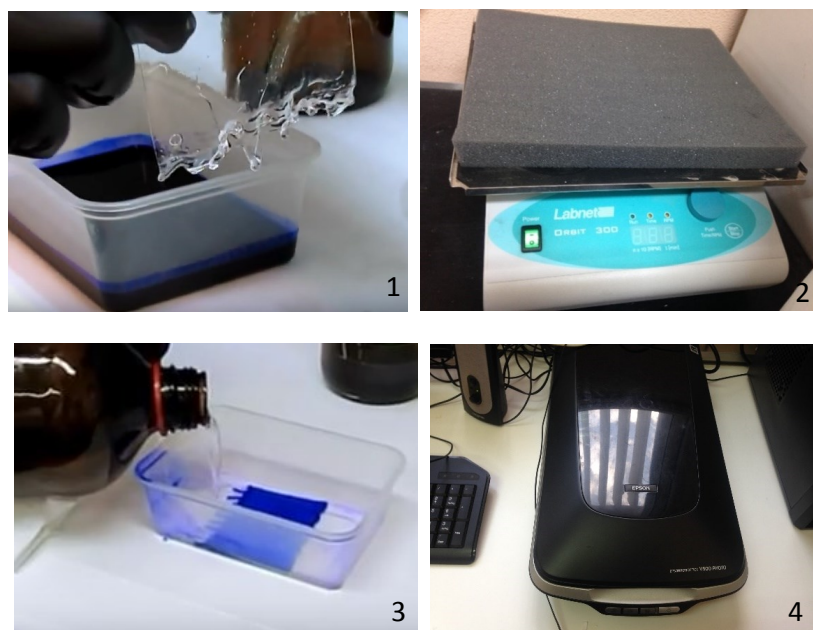


Figura 6.37.- 1) Solución de tinción de Coomassie, para la tinción de los geles de poliacrilamida; 2) Foto del Vortex Shaker, Orbit 300, Labnet, utilizado en nuestro laboratorio, para mantener en constante agitación los geles de poliacrilamida durante el proceso de tinción; 3) Destinción de los geles de poliacrilamida teñidos con la solución de Coomassie; 4) Escáner utilizado para fotografiar los geles de poliacrilamida tras su revelado y tinción.

Además de las PAGE, también se realizaron SDS-PAGE, siguiendo el procedimiento de Laemmli (1970). Para la preparación de los geles, se siguió el protocolo descrito en la tabla 6.16.

290

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 27/06/2017 09:46:14

JUAN IGNACIO FRIAS VIERA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 19:33:58

FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

29/06/2017 09:05:47

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

18/07/2017 14:28:34

Tabla 6.16.- Composición de los mini-geles de la electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalizante (SDS-PAGE).

Reactivos	Gel Resolving 12% (gel inferior)	Gel Staking 4% (gel superior)
Agua destilada	1337 μ l	1220 μ l
Tampón Tris-HCl pH 8.8	1000 μ l	-
Tampón Tris-HCl pH 6.8	-	500 μ l
SDS 10% (0.1% final)	40 μ l	20 μ l
Acrilamida/Bis-acrilamida (30%)	1600 μ l	260 μ l
Persulfato amónico al 10%	20 μ l	20 μ l
TEMED	4 μ l	5 μ l
Volumen total	4000 μ l	2000 μ l

Y en cuanto al tampón de incubación de las muestras en este tipo de electroforesis, los componentes del mismo se detallan a continuación (Tabla 6.17).

Tabla 6.17.- Composición del tampón de incubación en condiciones desnaturalizante, para la SDS-PAGE.

Reactivos	Tampón incubación DESNATURALIZANTE (4x)
Agua	4000 μ l
Tampón Tris-HCl pH 6.8	1000 μ l
Glicerol	800 μ l
SDS 10% (0.1% final)	80 μ l
Azul de bromofenol	4mg
Volumen total	8000 μ l

El revelado de los geles conteniendo peroxidasas procedentes de SDS PAGE, se llevó a cabo siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

Los geles desarrollados en la SDS-PAGE se fijaron con agitación orbital en 100ml de solución Tris 10mM al 25% de isopropanol (4°C) a pH 6.5, durante 10 minutos. Posteriormente, se incubaron en 100ml de solución Tris 10mM (4°C) a pH 6.5 otros 10 minutos. A continuación, se revelaron las bandas conteniendo actividad peroxidasa, incubando los geles en una disolución de tampón fosfato a pH 6.5 conteniendo 10mM de guaiacol y 5mM de H₂O₂, durante 15 minutos.

De forma alternativa, los geles se revelaron con otros sustratos de las peroxidases, como son la diaminobencidina o el catecol, incubando los geles en una disolución de tampón fosfato a pH 6.5 conteniendo diaminobencidina o n-Naftol / H₂O₂.

En los revelados en los que se utiliza n-Naftol como sustrato de la peroxidasa, la exposición de los geles a la luz UV a 254nm, nos permite visualizar el producto de la reacción y obtener su fotografía.

VI.2.2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados cuantitativos de los diferentes ensayos fueron sometidos a análisis, mediante una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, con el objetivo de determinar la influencia de los factores tejidos vegetales, sustrato y la exposición a luces ultravioletas en la actividad peroxidasa.

VI.2.3. ENSAYOS HISTOQUÍMICOS

Otra herramienta vital en nuestra investigación son las técnicas histoquímicas, que tienen como objetivo, poner de manifiesto la presencia de una molécula en una sección histológica para estudiar su distribución tisular *in situ*. Se utilizan, cuando la molécula estudio no se tiñe con los colorantes habituales. Durante el procesamiento de la muestra, hay que evitar dañar la molécula que queremos detectar antes de que se lleve a cabo la reacción histoquímica, y ello se consigue, usando un fijador adecuado que no deteriore la molécula estudio (Megías et al., 2016).

En nuestro caso se utilizará la técnica histoquímica enzimática o histoenzimología, que se basa en la capacidad que tienen algunos enzimas de preservar su actividad enzimática tras el proceso de fijación, permitiendo detectar el producto de la reacción y no la enzima propiamente. En general, se usan sustratos solubles e incoloros específicos del enzima a estudiar, que son convertidos por el enzima en productos

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

insolubles y coloreados, y que quedan precipitados en el sitio en donde ha tenido lugar la reacción enzimática (Ross & Pawlina, 2007).

Los enzimas que se pueden detectar por este método son variados, y entre ellos se encuentran las peroxidasa. Hay que tener en cuenta que cuando queremos detectar una actividad enzimática es recomendable no incluir el tejido en medios como la parafina, puesto que la deshidratación y la temperatura elevada pueden dañar la conformación del enzima, y la actividad de su centro activo. Por ello, estas técnicas se realizan normalmente en secciones obtenidas por congelación o con el vibratomo (Megías et al., 2016).

VI.2.3.1. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA EN CORTES DE HOJA Y TALLO DE *NEPETA TEYDEA*.

Se realizaron experimentos con el objetivo de identificar la presencia de actividad peroxidasa, (empleando siempre H₂O₂ como sustrato oxidante y, el guaiacol o diaminobencidina (DAB), como sustratos reductores para la detección de peroxidasa sobre cortes de tejido de hoja y tallo de *Nepeta teydea*.

La finalidad de estos ensayos fue localizar macroscópicamente las zonas donde se presenta la mayor concentración del enzima y determinar si existe una distribución de la presencia de actividad peroxidasa inducido por la exposición a luz UV.

VI. 2.3.1.1. MATERIALES

El material vegetal utilizado para el estudio fueron hojas y tallos de la zona apical de pA y pA-UV de *Nepeta teydea*.

VI.2.3.1.2. MÉTODOLOGÍA

VI.2.3.1.2.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las hojas y tallos frescos de *Nepeta teydea*, se cortaron con un vibratomo Lancer Vibratome Series 1000 Sectioning System (Fig. 6.38), obteniendo secciones transversales con un grosor comprendido entre 100 y 300µm.

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Figura 6.38.- Vibratomo (Lancer Vibratome Series 1000 Sectioning System) utilizado para la obtención de las secciones de hojas y tallos de *Nepeta teydea* para el estudio histoquímico de las peroxididasas.

VI.2.3.1.2.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA HISTO-LOCALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA

Cortes sin fijar de tallo y hoja de *Nepeta teydea* se emplearon directamente para la detección de regiones ricas en actividad peroxidasa. Para ello, las secciones de *Nepeta teydea* se incubaron durante 60 minutos, en Tampón Tris-Cl 0.05M, a pH 7.6, que contenía: los dos sustratos que utilizan las peroxididasas: $1.4 \times 10^{-3}M$ de diaminobencidina (DAB) y 2% de H₂O₂ (1%).

El revelado se produjo a 25°C de temperatura, y el final de la reacción se controló mediante observaciones periódicas bajo el microscopio, parándose con el lavado de las secciones con agua destilada.

VI.2.3.1.2.3. OBTENCIÓN Y OBSERVACIÓN DE LAS FOTOMICROGRAFIAS

Las fotomicrografías se observaron y se obtuvieron con un microscopio Optika B-350 con un sistema de captura de imagen por ordenador Motic Images Plus 2.0 ML, con la digitalizamos las imágenes de las muestras.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

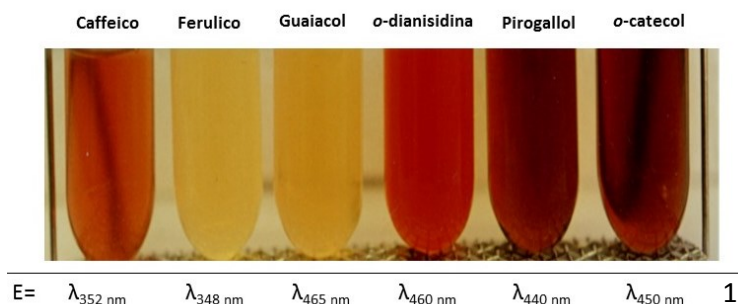
VI.3. RESULTADOS

VI.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA EN EXTRACTOS DE HOJAS Y CALLOS DE *NEPETA TEYDEA*

La caracterización de la actividad peroxidasa para *N. teydea* se llevó a cabo a partir de extractos libres de células obtenidos para diferentes preparaciones y tejidos.

Previamente a los ensayos de actividad peroxidasa con diferentes sustratos, se procedió a hacer un estudio para determinar las condiciones óptimas de ensayo en plantas sometidas a luz UV. Para ello se procedió a emplear los sustratos H₂O₂ como oxidante y como sustrato aceptor una batería de fenoles y minas reactivas frente a peroxidasa, incluyendo el aceptor universal guaiacol, así como el ferúlico y la o-dianisidina. Se realizaron una serie de incubaciones con estos reactivos que permitieran determinar las condiciones óptimas de ensayo que se llevarían a cabo en los experimentos de exposición a luz UV. Para ello se emplearon extractos obtenidos a partir de hojas tal y como se describe en material y método a fin de obtener las condiciones sub-inhedoras (para el caso del H₂O₂) y óptimas para los demás sustratos ensayados.

En la figura 6.39, se muestra la reactividad de diferentes sustratos frente a las peroxidases presente en hojas de *N. teydea*, y la detección de los productos de reacción mediante cromatografía en capa fina (TLC).



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

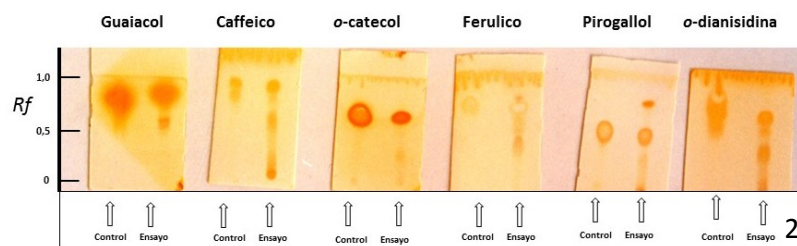


Figura 6.39.- 1) Reactividad de la fracción de peroxidasas en hoja de *N. teydea* a diferentes sustratos ensayados espectrofotométricamente; 2) Detección de los productos de reacción de las peroxidasas con diferentes sustratos, mediante separación por TLC de la fracción orgánica (Acetato etilo: Éter petróleo: etanol 10:9:1).

En la figura 6.40, se muestra el resultado obtenido de una cromatografía líquida HPLC extraída de la reacción de las peroxidasas de *N. teydea* con el ácido cafeico, como sustrato.

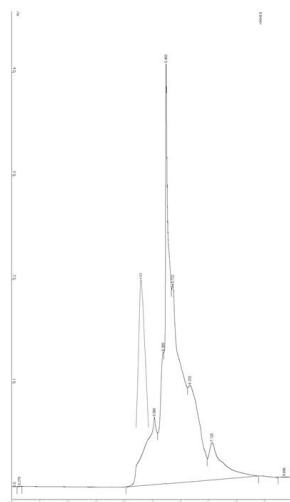


Figura 6.40.- Muestra el cromatograma de HPLC extraído de la reacción de las peroxidasas de *N. teydea* con el ácido cafeico en reacciones como las indicadas en el texto. En inserto se muestra el pico correspondiente al ácido cafeico empleando columnas C-18 y una mezcla de 60% (Acetonitrilo: H₂O) 40% Metanol como eluyente y detección espectrofotométricamente a 214 nm.

En la tabla 6.18, se muestra los valores de Absortividad Molar (ϵ) expresados como ($M^{-1} \text{ cm}^{-1} L^{-1}$) y los valores de velocidades relativa, obtenidos mediante ensayos

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

espectrofotométricos, empleando H₂O₂ y los sustratos indicados, y a las λ máximas de los productos de las reacciones indicadas para cada sustrato ensayado.

Tabla 6.18.- se muestra los valores de Absortividad Molar (ε) expresados como (M⁻¹ cm⁻¹ L⁻¹) y los valores de velocidades relativa, obtenidos mediante ensayos espectrofotométricos, empleando H₂O₂ y los sustratos indicados, y a las λ máximas de los productos de las reacciones indicadas para cada sustrato ensayado.

Sustrato	Velocidad relativa (μmoles x s ⁻¹ x L ⁻¹)	ε (M ⁻¹ cm ⁻¹ L ⁻¹) x 10 ³	λ max (nm)
Cafeico	44	4,80	352,0
Ferúlico	79	6,50	348,0
Guaiacol	84	5,65	465,0
o-dianisidina	100	10,80	460,0
pirogallol	60	8,50	440,0
o-catecol	32	5,90	450,0

La figura 6.41, muestra gráficamente los valores de actividad relativa de la peroxidasa de *N. teydea*, para los sustratos indicados.

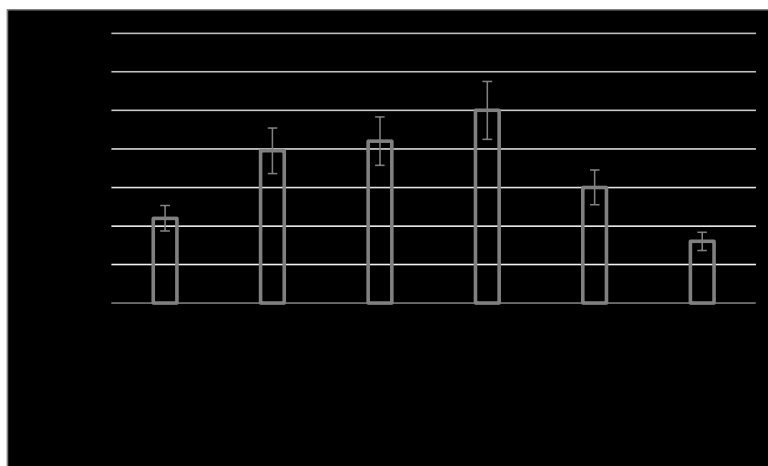


Figura 6.41.- Representación gráfica de los valores de actividad para las peroxidasas de *N. teydea*, para los sustratos descritos, en valores relativos a la o-dianisidina (barra de error estándar para tres experimentos independientes).

En cultivos *in vitro* de callos de *N. teydea* inducidos con los reguladores de crecimiento ANA y 2,4-D, los ensayos de o-dianisidina peroxidasa se muestran en la tabla 6.19.

Tabla 6.19.- Actividad de o-dianisidina peroxidasa ensayadas en callos de *N. teydea* inducidos con ANA y 2,4-D.

Material vegetal	Sustrato	Actividad ($\mu\text{moles x s}^{-1} \text{x L}^{-1}$)
Callo ANA control	o-dianisidina	106194690,3
Callo 2,4-D control	o-dianisidina	132743362,8

En la figura 6.42, observamos que utilizando como sustrato reductor la o-dianisidina en extractos de callos control de *N. teydea*, la actividad peroxidasa es mayor en los callos inducidos con el regulador de crecimiento 2,4-D, que los callos inducidos con la hormona ANA.

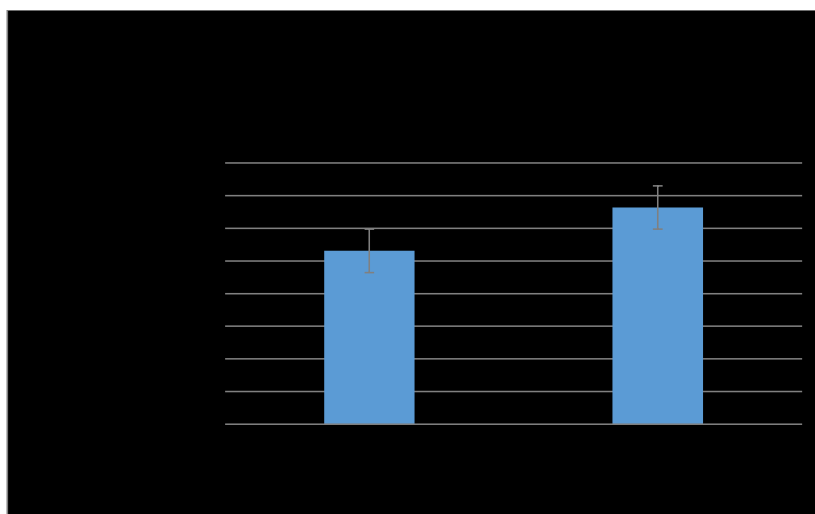


Figura 6.42.- Representación gráfica de la actividad de o-dianisidina peroxidasa presentes en callos de *N. teydea* inducidos por ANA y 2,4-D.

En la tabla 6.20, se muestra la actividad de ferúlico peroxidasa ensayadas en callos de *N. teydea* inducidos con los reguladores de crecimiento ANA y 2,4-D.

Tabla 6.20.- Actividad de ferúlico peroxidasa ensayadas en callos de *N. teydea* inducidos con ANA y 2,4-D.

Material vegetal	Sustrato	Actividad ($\mu\text{moles x s}^{-1} \text{x L}^{-1}$)
Callo ANA control	Ácido ferúlico	4166666,67
Callo 2,4-D control	Ácido ferúlico	4032258,06

En la figura 6.43, observamos que utilizando como sustrato reductor el ácido férrico en extractos de callos control de *N. teydea*, la actividad peroxidasa es mayor en los callos inducidos con el regulador de crecimiento ANA, que los callos inducidos con la hormona 2,4-D.

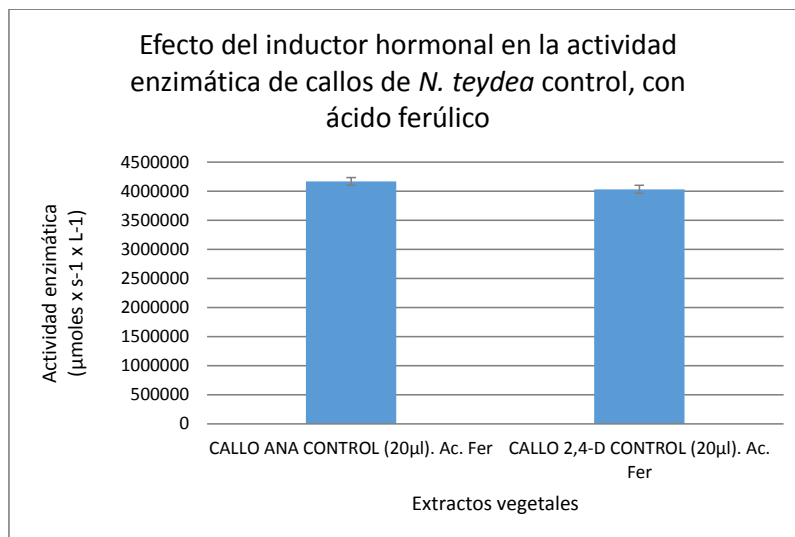


Figura 6.43.- Representación gráfica de la actividad de ferúrico peroxidasa presentes en callos de *N. teydea* inducidos por ANA y 2,4-D.

Debido a que las diferencias en los valores obtenidos pueden ser reflejo de las diferentes concentraciones de proteínas que se encuentran en los callos, y que está relacionado con el efecto que las diferentes hormonas pueden tener sobre el metabolismo de estas células, realizamos la representación de la actividad específica que pretende, minimizar este efecto en el experimento.

En la figura 6.44, se muestra la actividad específica de la o-dianisidina peroxidasa (unidades por mg proteína ensayada) referente a experimentos representativos a los descritos en la tabla 6.19. En ella, se observa una gran diferencia en las actividades específicas de los callos, siendo mucho mayor en los extractos de callos inducidos con el regulador de crecimiento 2,4-D, que en los callos inducidos con la hormona ANA. El experimento muestra el efecto sobre la biomasa de la hormona ANA respecto de la 2,4D asociada a una menor concentración de peroxidasas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

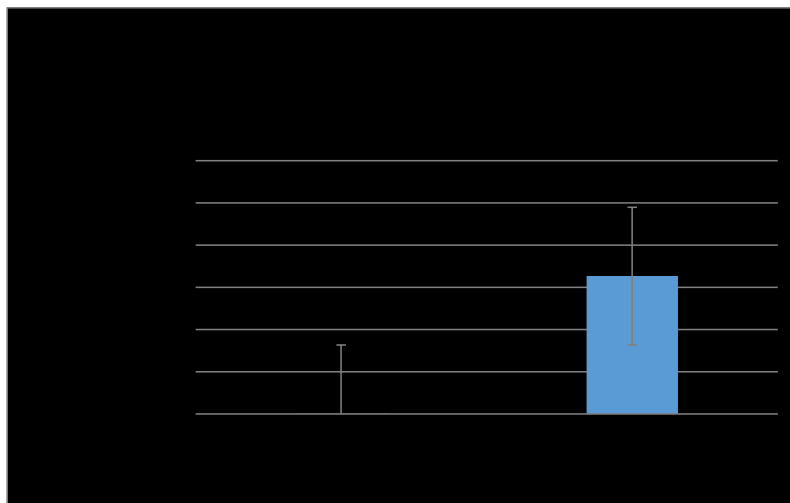


Figura 6.44.- Representación gráfica de la actividad específica de la o-dianisidina peroxidasa en callos inducidos por ANA y 2,4-D

VI.3.2. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA Y EL PH ÓPTIMO PARA LA PEROXIDASA DE *NEPETA TEYDEA*

VI.3.2.1. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA

Extractos libres de células de hojas, se ensayaron para determinar la actividad de peroxidasa con la o-dianisidina y a distintas temperaturas. Los ensayos se muestran en la tabla 6.21.

Tabla 6.21.- Porcentaje de actividad máxima de peroxidasa de hojas (% max) ensayada con distintas temperaturas. Los valores de temperaturas ensayadas, se representan como inversas de grados kelvin ($1/T$ ($10^3 K$)), y la desviación estándar de los valores de temperatura (expresado como sd $1/T$).

° C	° K	$1/T$ ($10^3 K$)	$1/T$ sd	(% max)
10	283,2	3,53	0,3	10
15	288,2	3,47	0,2	14
20	293,2	3,41	0,2	29
25	298,2	3,35	0,4	38
30	303,2	3,30	0,2	68
35	308,2	3,25	0,1	78
40	313,2	3,19	0,1	82
45	318,2	3,14	0,2	89

300

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 27/06/2017 09:46:14

JUAN IGNACIO FRIAS VIERA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 19:33:58

FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

29/06/2017 09:05:47

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

18/07/2017 14:28:34

50	323,2	3,09	0,4	100
55	328,2	3,05	0,3	58
60	333,2	3,00	0,4	43
65	338,2	2,96	0,3	15

En la figura 6.45, se muestra la actividad de la o-dianisidina peroxidasa expresada como porcentaje de actividad máxima (% max) frente diferentes temperaturas (1/T (10³K)). Aquí se observa, como la máxima actividad peroxidasa se consigue cuando la temperatura (en 1/T) es de 3,09, es decir, que la temperatura óptima del ensayo sería de 50°C.

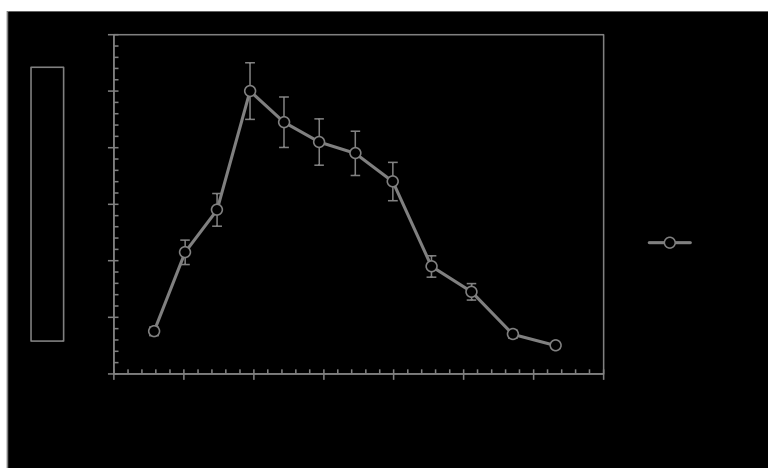


Figura 6.45.- Representación gráfica que muestra la dependencia de la actividad peroxidasa presente en hoja de *Nepeta teydea* respecto de la temperatura determinada según se indica en material y métodos. Los datos presentados son valores medios ± de n=3 experimentos.

VI.3.2.2. DETERMINACIÓN DEL PH ÓPTIMO

Extractos libres de células de callo se ensayaron para determinar la actividad de peroxidasa con el sustrato ácido cafeico y a distintos valores de pH. Los ensayos se muestran en la tabla 6.22.

Tabla 6.22.- Actividad enzimática de la cafeico peroxidasa de *N. teydea*, a distintos valores de pH.

Sustrato	pH del ensayo	Actividad enzimática (μmoles x s ⁻¹ x L ⁻¹)
----------	---------------	--

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Ác. cafeico	3,50	0,00
Ác. cafeico	4,00	0,20
Ác. cafeico	4,40	0,55
Ác. cafeico	5,00	0,60
Ác. cafeico	5,50	0,74
Ác. cafeico	5,56	0,87
Ác. cafeico	6,06	1,00
Ác. cafeico	6,28	1,26
Ác. cafeico	6,60	1,32
Ác. cafeico	6,78	1,20
Ác. cafeico	7,04	0,98
Ác. cafeico	7,27	0,64
Ác. cafeico	7,63	0,61
Ác. cafeico	7,76	0,54
Ác. cafeico	8,01	0,10
Ác. cafeico	8,50	0,05
Ác. cafeico	9,00	0,00

La figura 6.46, muestra la variación de la actividad peroxidasa en función de los diferentes valores de pH ensayados, descritos en la tabla anterior. Aquí observamos que, el valor óptimo de pH es 6.06, donde obtenemos la máxima actividad enzimática (1.32 $\mu\text{moles} \times \text{s}^{-1} \times \text{L}^{-1}$).

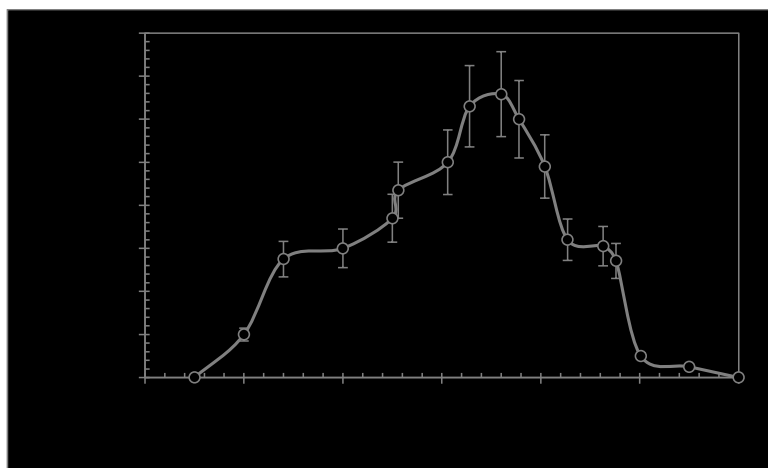


Figura 6.46.- Representación gráfica que muestra la dependencia de la actividad cafeico peroxidasa presente en callos de *N. teydea* respecto a diferentes valores de pH ensayados.

VI.3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA EN *NEPETA TEYDEA* EXPUESTA A LUZ UV

Para determinar el efecto que la irradiación con luz UV tenía sobre la actividad y propiedades de las peroxidases de *N. teydea*, se desarrollaron varios escenarios experimentales a partir de datos de la literatura en los que se abordan similares experimentos. Los dos tipos de protocolos experimentales descritos en material y métodos dieron resultados equivalentes, pero al mismo tiempo señalan la importancia de una correcta aproximación experimental para detectar el efecto que ejerce la exposición a radiación lumínica sobre las plantas. Describimos a continuación los ensayos realizados:

En primer lugar, se comentará los resultados de los experimentos siguiendo el protocolo 1 en el que se empleó lámparas de emisión de 240nm (UV-b), 360nm (UV-a) y 365nm (UV-a) a una distancia de 10 cm de la muestra.

La segunda parte está dedicada a experimentos realizados siguiendo el protocolo 2, en el cual se empleó una serie de pulsos con una combinación de lámparas de emisión a 230-250 nm (UV-b rango extendido) simultaneado con luz de emisión blanca con filtro en la región inferior a 380nm (véase material y métodos) y a una distancia de 30 cm.

VI.3.3.1. ENSAYOS SIGUIENDO EL PROTOCOLO 1 PARA HOJAS

Plantas de *Nepeta teydea* fueron expuestas durante un determinado periodo de tiempo a diferentes lámparas de luz UV, según se describe en materiales y métodos. A continuación, extractos libres de células obtenidos a partir de las hojas de estas plantas, se ensayaron en condiciones optimizadas (pH, temperatura y concentración de sustratos) para determinar la variación en la actividad específica de peroxidasa. Las tablas y figuras siguientes muestran los resultados obtenidos.

La tabla 6.23, muestra los resultados de la o-dianisidina peroxidasa obtenidos con hojas expuestas a luz UV-b y los dos tipos de luz UV-a.

Tabla 6.23.- Se muestra la actividad de o-dianisidina peroxidasa, en hojas expuestas a luz UV-b y los dos tipos de luz UV-a.

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Material vegetal	Sustrato	Actividad ($\mu\text{moles} \times \text{s}^{-1} \times \text{L}^{-1}$)
Hoja control	o-dianisidina	234115,2784
Hoja 365nm SIN RECUPERACIÓN	o-dianisidina	468230,5567
Hoja 365nm CON RECUPERACIÓN	o-dianisidina	-
Hoja 360nm SIN RECUPERACIÓN	o-dianisidina	384095,3786
Hoja 360nm CON RECUPERACIÓN	o-dianisidina	768190,7571
Hoja 254nm SIN RECUPERACIÓN	o-dianisidina	3226401,18
Hoja 254nm CON RECUPERACIÓN	o-dianisidina	468230,5567

La figura 6.47, muestra la representación gráfica de la actividad de o-dianisidina peroxidasa expuesta a luz UV-b y los dos tipos de luz UV-a. En ella, observamos de manera generalizada, que la actividad peroxidasa es mayor en extractos de hojas sometidas a luz UV-b o a luz UV-a, que las hojas control (sin tratamiento con luz UV). Además, detectamos que la actividad peroxidasa es máxima, en extractos de hojas sometidas a luz de 245nm sin recuperación con luz blanca.

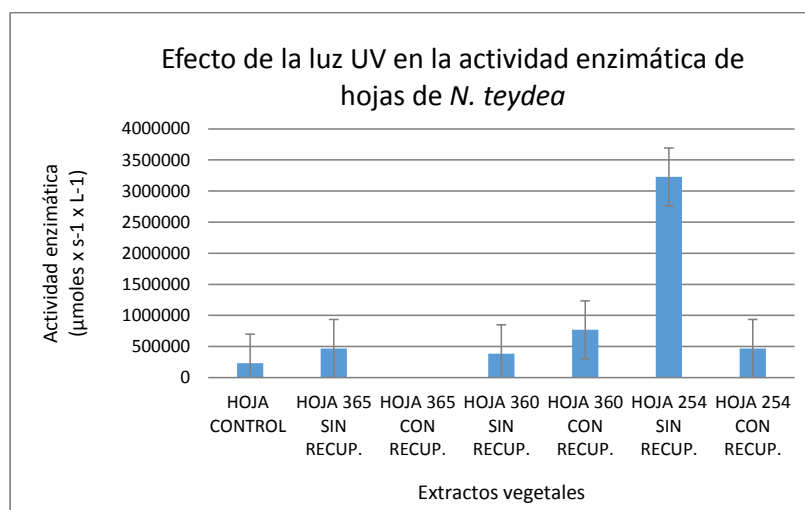


Figura 6.47. – Representación gráfica de la actividad de la o-dianisidina peroxidasa en hojas de *N. teydea* expuestas a luz UV-b y a los dos tipos de luz UV-a.

VI.3.3.2. ENSAYOS SIGUIENDO EL PROTOCOLO 1 PARA CALLOS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

En experimentos de exposición a luz UV-a y UV-b en callos de *N. teydea*, se adaptaron las condiciones experimentales a fin de poder incidir adecuadamente luz UV sobre las muestras, evitando el incremento térmico de las placas conteniendo los callos, que habían sido inducidos con diferentes reguladores de crecimiento (véase material y métodos)

En la tabla 6.24, se muestra la actividad o-dianisidina peroxidasa obtenida de la exposición a luz UV-b y los dos tipos de luz UV-a de callos de *N. teydea* inducidos por ANA y 2,4-D.

Tabla 6.24.- Actividad enzimática de la o-dianisidina peroxidasa en callos de *N. teydea* inducidos por ANA y 2,4-D expuestos a luz UV-b y a los dos tipos de luz UV-a.

Material vegetal	Sustrato	Actividad ($\mu\text{moles} \times \text{s}^{-1} \times \text{L}^{-1}$)
Callo ANA control	o-dianisidina	106194690,3
Callo ANA 365nm SIN RECUPERACIÓN	o-dianisidina	106194690,3
Callo ANA 365nm CON RECUPERACIÓN	o-dianisidina	73008849,56
Callo ANA 360nm SIN RECUPERACIÓN	o-dianisidina	1991150,442
Callo ANA 360nm CON RECUPERACIÓN	o-dianisidina	26902654,87
Callo ANA 254nm SIN RECUPERACIÓN	o-dianisidina	49292035,4
Callo ANA 254nm CON RECUPERACIÓN	o-dianisidina	4176991,15
Callo 2,4-D control	o-dianisidina	132743362,8
Callo 2,4-D 365nm SIN RECUPERACIÓN	o-dianisidina	97345132,74
Callo 2,4-D 365nm CON RECUPERACIÓN	o-dianisidina	1946902655
Callo 2,4-D 360nm SIN RECUPERACIÓN	o-dianisidina	212389380,5
Callo 2,4-D 360nm CON RECUPERACIÓN	o-dianisidina	60796460,18
Callo 2,4-D 254nm SIN RECUPERACIÓN	o-dianisidina	212389380,5
Callo 2,4-D 254nm CON RECUPERACIÓN	o-dianisidina	115044247,8

La representación gráfica de los resultados obtenidos en la tabla 6.24, para callos inducidos por ANA se muestran en la figura 6.48. En esta representación, observamos en los extractos de callos inducidos con ANA, que la actividad peroxidasa disminuye con la aplicación de las diferentes condiciones de los tratamientos con luz UV-a y UV-b, con respecto a los callos control. Sólo en el caso de callos de ANA irradiados con luz

UV a 365nm sin recuperación con luz blanca, se aprecia un valor de actividad peroxidasa igual al de los callos sin tratamiento con luz UV.

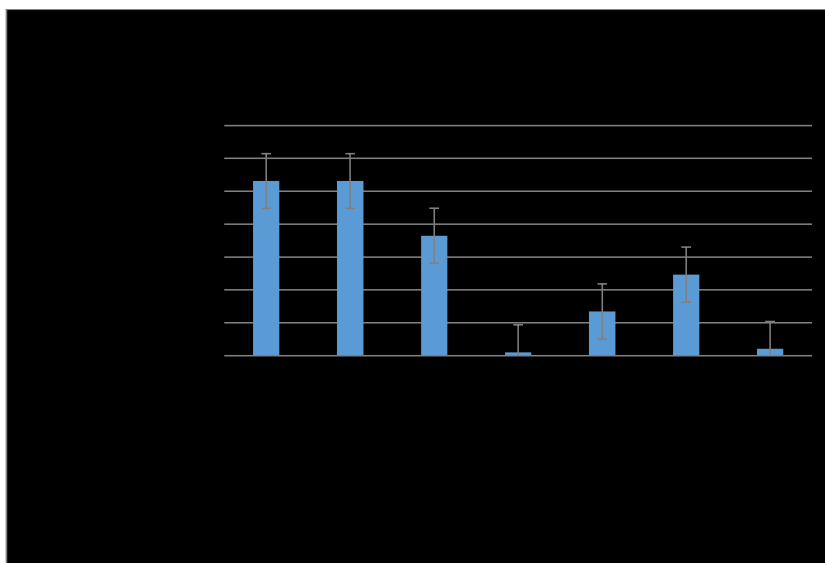


Figura 6.48. -Representación gráfica de la actividad o-dianisidina peroxidasa en callos inducidos por ANA, expuestos a luz UV-b y a los dos tipos de luz UV-a.

La representación gráfica de los resultados obtenidos en la tabla 6.24, para callos inducidos por 2,4-D se muestran en la figura 6.49. En esta representación, observamos que la actividad peroxidasa máxima, se consigue con en los extractos de callos inducidos con 2,4-D, sometidos al tratamiento con luz UV a 365nm con recuperación con luz blanca.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

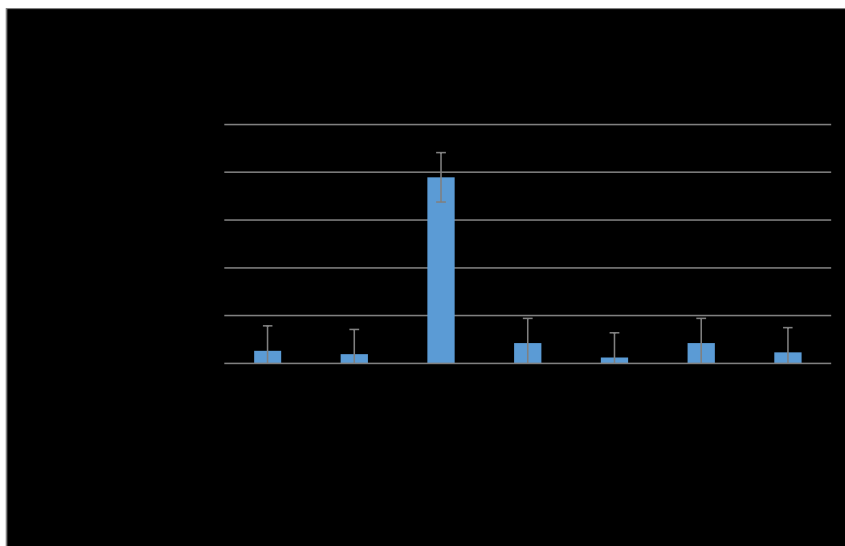


Figura 6.49. – Representación gráfica de la actividad o-dianisidina peroxidasa obtenida en callos inducidos por 2,4-D, expuestos a luz UV-b y a dos tipos de luz UV-a.

En la tabla 6.25, se muestran la actividad ferúlico peroxidasa obtenida de la exposición a luz UV-b y los dos tipos de luz UV-a de callos de *N. teydea* inducidos por ANA y 2,4-D.

Tabla 6.25.- Actividad enzimática de la ferúlico peroxidasa en callos de *N. teydea* inducidos por ANA y 2,4-D expuestos a luz UV-b y a los dos tipos de luz UV-a.

Material vegetal	Sustrato	Actividad ($\mu\text{moles x s}^{-1} \text{x L}^{-1}$)
Callo ANA control	Ác. ferúlico	4166666,667
Callo ANA 365nm SIN RECUPERACIÓN	Ác. ferúlico	1747311,828
Callo ANA 365nm CON RECUPERACIÓN	Ác. ferúlico	3360215,054
Callo ANA 360nm SIN RECUPERACIÓN	Ác. ferúlico	8333333,333
Callo ANA 360nm CON RECUPERACIÓN	Ác. ferúlico	715053,7634
Callo ANA 254nm SIN RECUPERACIÓN	Ác. ferúlico	4086021,505
Callo ANA 254nm CON RECUPERACIÓN	Ác. ferúlico	3021505,376
Callo 2,4-D control	Ác. ferúlico	4032258,065
Callo 2,4-D 365nm SIN RECUPERACIÓN	Ác. ferúlico	22365591,4

Callo 2,4-D 365nm CON RECUPERACIÓN	Ác. ferúlico	4032258,065
Callo 2,4-D 360nm SIN RECUPERACIÓN	Ác. ferúlico	5806451,613
Callo 2,4-D 360nm CON RECUPERACIÓN	Ác. ferúlico	3134408,602
Callo 2,4-D 254nm SIN RECUPERACIÓN	Ác. ferúlico	4478494,624
Callo 2,4-D 254nm CON RECUPERACIÓN	Ác. ferúlico	2666666,667

La representación gráfica de los resultados obtenidos en la tabla 6.25, para callos inducidos por ANA se muestran en la figura 6.50. En esta representación, observamos que la actividad peroxidasa máxima, se consigue en los extractos de callos inducidos con ANA, sometidos al tratamiento con luz UV a 360nm sin recuperación con luz blanca.

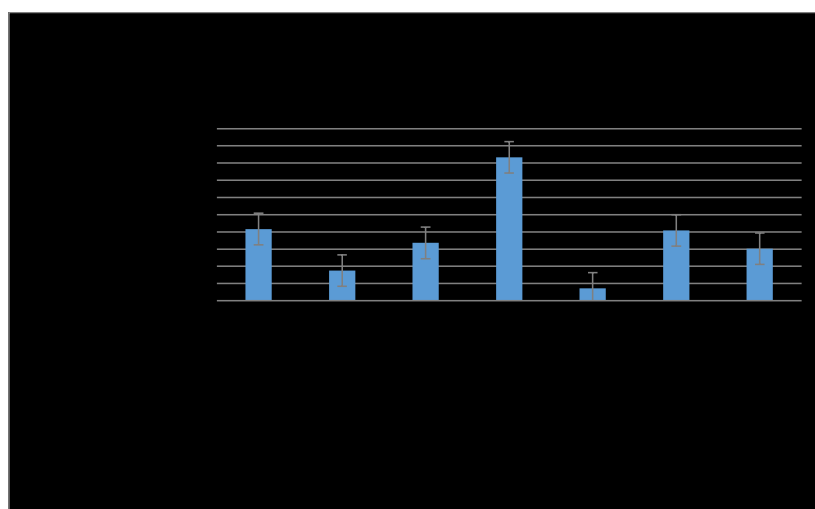


Figura 6.50. – Representación gráfica de la actividad ferúlico peroxidasa obtenida en callos inducidos por ANA, expuestos a luz UV-b y a dos tipos de luz UV-a.

La representación gráfica de los resultados obtenidos en la tabla 6.25, para callos inducidos por 2,4-D se muestran en la figura 6.51. En esta representación, observamos que la actividad peroxidasa máxima, se consigue con en los extractos de callos inducidos con 2,4-D, sometidos al tratamiento con luz UV a 365nm sin recuperación con luz blanca.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 27/06/2017 09:46:14

JUAN IGNACIO FRIAS VIERA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 19:33:58

FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

29/06/2017 09:05:47

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

18/07/2017 14:28:34

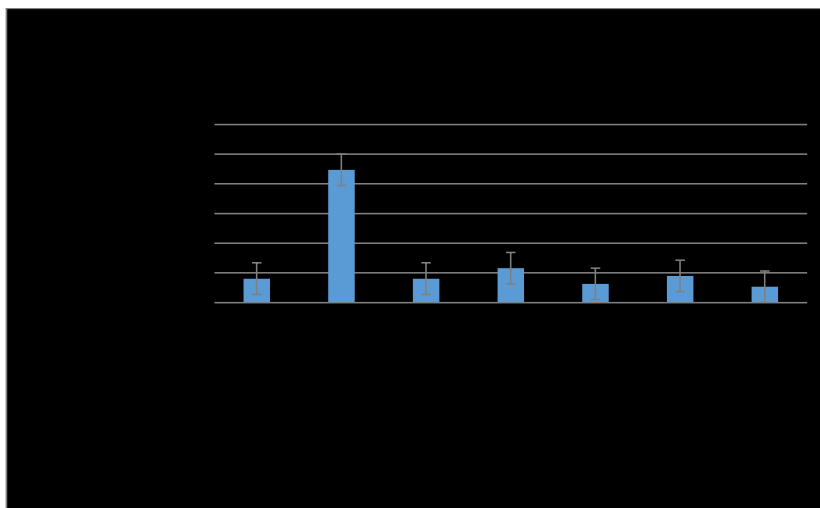


Figura 6.51.- Representación gráfica de la actividad ferúlico peroxidasa obtenida en callos inducidos por 2,4-D, expuestos a luz UV-b y a dos tipos de luz UV-a.

VI.3.3.3. ENSAYOS SIGUIENDO EL PROTOCOLO 2 PARA HOJAS

Los resultados de las actividades peroxidadas de hojas procedentes de plantas de *N. teydea*, sometidas a luz UV-b en las condiciones descrita para el protocolo 2 se muestra en la tabla 6.26.

Tabla 6.26. – Actividades enzimáticas y específica de la guaiacol-peroxidasa y de la ferúlico-peroxidasa en hojas de *N. teydea* sometidas a luz UV-b.

Material vegetal	Sustrato	Actividad enzimática ($\mu\text{moles} \times \text{s}^{-1} \times \text{L}^{-1}$)	Actividad específica (UI/mg)
Hoja Control	Guaiacol	619,8333333	0,026316667
Hoja con UV	Guaiacol	1132,833333	0,046683333
Hoja Control	Ác. ferúlico	330,6666667	0,0136
Hoja con UV	Ác. ferúlico	589	0,023333333

La figura 6.52, muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos para la actividad enzimática de los experimentos indicados en la tabla 6.26. En esta representación, observamos que la actividad enzimática de las peroxidadas de manera

generalizada, es mayor en los extractos de hojas tratadas con luz UV que en el caso de los extractos de hojas control, con ambos sustratos. Sin embargo, se detectó que la actividad peroxidasa fue mayor en el caso de los callos tanto control como los tratados con luz UV, cuando se utilizaba guaiacol como sustrato reductor.

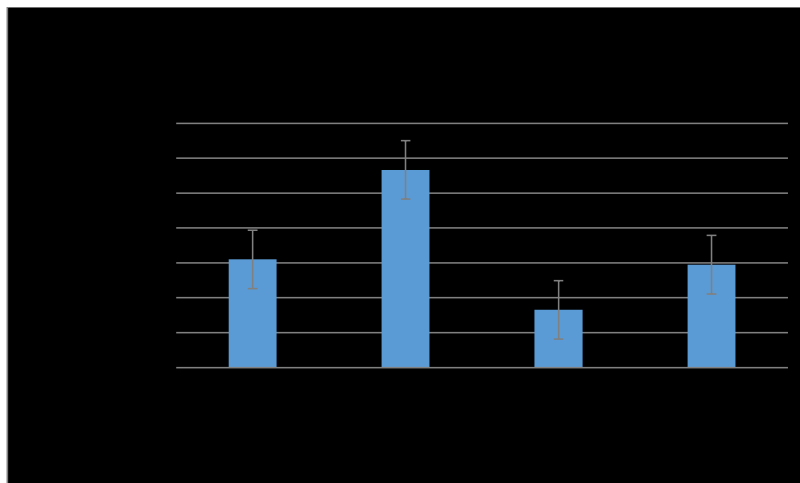


Figura 6.52.- Representación gráfica de las actividades enzimáticas de la guaiacol peroxidasa y de la ferúlico peroxidasa, de los experimentos indicados en la tabla 6.26.

La figura 6.53, muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos para la actividad específica de los experimentos indicados en la 6.26. Aquí, detectamos, que la actividad específica de los extractos de hojas, siguen el mismo comportamiento que las actividades enzimáticas de las peroxidasas. La actividad específica de las peroxidasas de manera generalizada, es mayor en los extractos de hojas tratadas con luz UV que en el caso de los extractos de hojas control, con ambos sustratos. Sin embargo, se detectó que la actividad peroxidasa fue mayor en el caso de las hojas tanto control como los tratados con luz UV, cuando se utilizaba guaiacol como sustrato reductor.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

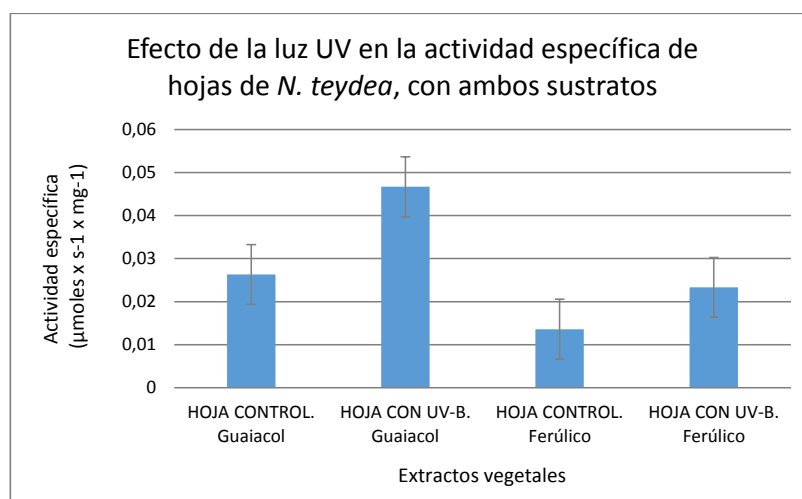


Figura 6.53.- Representación gráfica de las actividades específicas de la guaiacol peroxidasa y de la ferúlico peroxidasa, de los experimentos indicados en la tabla 6.26.

VI.3.3.4. ENSAYOS SIGUIENDO EL PROTOCOLO 2 PARA CALLOS

Los resultados de la actividad peroxidasa obtenidos a partir de extractos de callos de *N. teydea* inducidos con 2,4-D se muestran en la tabla 6.27.

Tabla 6.27.- Actividades enzimáticas y específica de la guaiacol-peroxidasa y de la ferúlico-peroxidasa en callos de *N. teydea* inducidos con 2,4-D, sometidos a luz UV-b.

Material vegetal	Sustrato	Actividad enzimática (µmoles x s ⁻¹ x L ⁻¹)	Actividad específica (UI/mg)
Callo Control	Guaiacol	426,6666667	0,054316667
Callo con UV	Guaiacol	849,7	0,10835
Callo Control	Ác. ferúlico	1188,333333	0,148933333
Callo con UV	Ác. ferúlico	1761,666667	0,228866667

La figura 6.54, muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos para la actividad enzimática de los experimentos indicados en la tabla 6.27. En esta representación, observamos que la actividad enzimática de las peroxidases de manera generalizada, es mayor en los extractos de callos tratados con luz UV que en el caso de los extractos de callos control, con ambos sustratos. Sin embargo, se detectó que la

actividad peroxidasa fue mayor en el caso de los callos tanto control como los tratados con luz UV, cuando se utilizaba ferúlico como sustrato reductor.

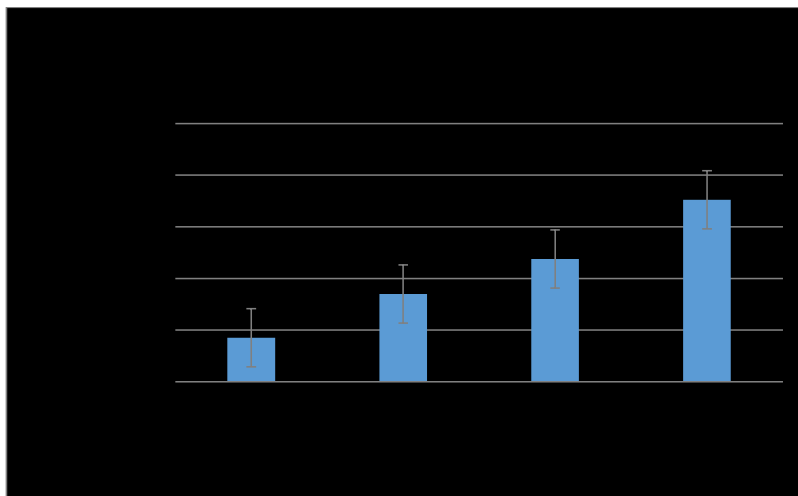


Figura 6.54. – Representación gráfica de las actividades enzimáticas de la guaiacol peroxidasa y de la ferúlico peroxidasa, de los experimentos indicados en la tabla 6.27.

La figura 6.55, muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos para la actividad específica de los experimentos indicados en la tabla 6.27. Aquí, detectamos, que la actividad específica de los extractos de callos, siguen el mismo comportamiento que las actividades enzimáticas de las peroxidases. La actividad específica de las peroxidases de manera generalizada, es mayor en los extractos de callos tratados con luz UV que en el caso de los extractos de callos control, con ambos sustratos. Sin embargo, se detectó que la actividad peroxidasa fue mayor en el caso de los callos tanto control como los tratados con luz UV, cuando se utilizaba ferúlico como sustrato reductor.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

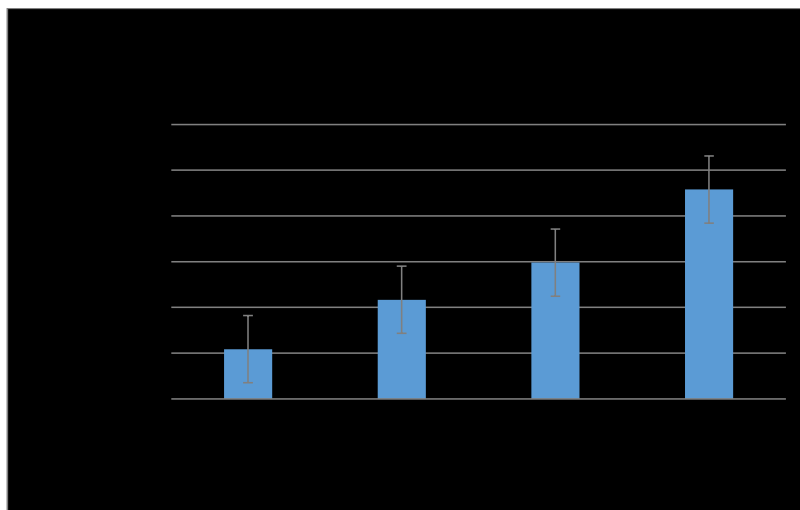


Figura 6.55. – Representación gráfica de las actividades específicas de la guaiacol peroxidasa y de la ferúlico peroxidasa, de los experimentos indicados en la tabla 6.27.

Por último, la figura 6.56, muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos para la actividad específica de todos los extractos vegetales utilizados en el protocolo 2: extractos de callos inducidos con 2,4-D y hojas en condiciones control y expuestos a luz UV-b. En ella, se observa como las actividades específicas son mayores en los extractos de callos con respecto a los extractos de hojas, alcanzando el máximo valor de actividad específica entre todos los extractos, con los extractos de callos sometidos a tratamiento con luz UV y utilizando ferúlico como sustrato reductor.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

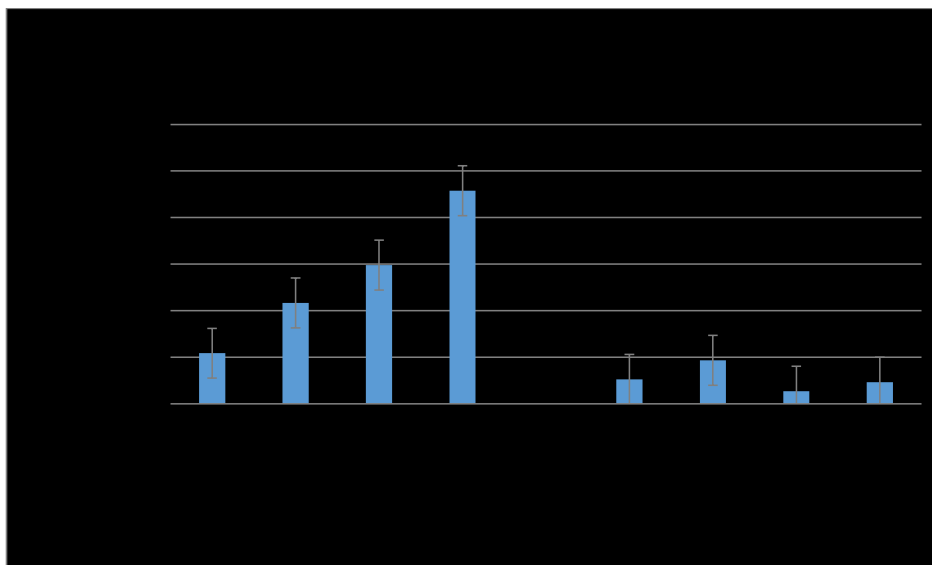


Figura 6.56. - Representación gráfica de las actividades específicas de la guaiacol peroxidasa y de la ferúlico peroxidasa, de callos y hojas de *N. teydea*, sometidas a los experimentos indicados en la tabla 6.26 y 6.27.

VI.3.4. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS K_M Y V_{max} DE LA PEROXIDASA DE CALLOS DE *NEPETA TEYDEA* EXPUESTAS A LUZ UV-B.

Con el fin de determinar si la exposición a luz UV, bien sea UV-a o UV-b, en hojas y callos de *N. teydea*, originaba cambios en la expresión de diferentes isoenzimas o cambios en las propiedades cinéticas de las peroxidasas expresadas, se diseñaron una serie de experimentos en los cuales, se calculó para cada condición experimental, los valores de K_M y V_{max} , mediante diagramas de Lineweaver - Burk. De esta forma, evidenciaríamos si la exposición a luz UV induce cambios en las propiedades más determinantes de estos enzimas como son la afinidad por el sustrato que cataliza (K_M) o la velocidad máxima a la que puede procesar dicha transformación (V_{max}).

Para este experimento se emplearon solamente muestras de callos inducidos en las diferentes condiciones experimentales (véase material y método) al asumir que, la modificación del sistema de callo es más plástica al expresar cambios en la expresión de las peroxidasas que los tejidos de planta, en los cuales la diferenciación propia de los tejidos (en nuestro caso hojas) marca un límite a dicha plasticidad.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Los resultados de K_M y V_{max} obtenidos de los ensayos realizados con la o-dianisidina peroxidasa en callos expuestos a diferentes condiciones experimentales, se muestran en la tabla 6.28.

Tabla 6.28.- Valores de K_M y V_{max} de o-dianisidina peroxidasa de extractos de callos de *N. teydea*, inducidos en condiciones *in vitro* por diferentes reguladores de crecimiento (ANA y 2,4-D), que fueron expuestos a distinta luz UV (luz UV-a (365nm), luz UV-a (360nm), o UV-b (254nm)), y a los que se les permitió o no, recuperarse en condiciones de luz blanca, antes de ser empleados en los ensayos.

Material vegetal	Sustrato	K_M aparente (mM)	V_{max} ($\mu\text{moles} \times \text{s}^{-1} \times \text{L}^{-1}$)
CALLO ANA CONTROL	o-dianisidine/ H ₂ O ₂	0,123871715	0,003216779
CALLO ANA 365nm SIN RECUP	o-dianisidine/ H ₂ O ₂	0,434817747	0,005497828
CALLO ANA 365nm CON RECUP	o-dianisidine/ H ₂ O ₂	0,238266971	0,004079634
CALLO ANA 360nm SIN RECUP	o-dianisidine/ H ₂ O ₂	0,178558895	0,003733433
CALLO ANA 360nm CON RECUP	o-dianisidine/ H ₂ O ₂	0,163977442	0,000257506
CALLO ANA 254nm SIN RECUP	o-dianisidine/ H ₂ O ₂	0,690267152	0,006271165
CALLO ANA 254nm CON RECUP	o-dianisidine/ H ₂ O ₂	0,073100719	0,000807689
CALLO 2,4-D CONTROL	o-dianisidine/ H ₂ O ₂	0,341632424	0,001867762
CALLO 2,4-D 365nm SIN RECUP	o-dianisidine/ H ₂ O ₂	0,252746868	0,000699839
CALLO 2,4-D 365nm CON RECUP	o-dianisidine/ H ₂ O ₂	0,171709734	0,000699839
CALLO 2,4-D 360nm SIN RECUP	o-dianisidine/ H ₂ O ₂	0,210708869	0,003297066
CALLO 2,4-D 360nm CON RECUP	o-dianisidine/ H ₂ O ₂	0,364706544	0,00187452
CALLO 2,4-D 254nm SIN RECUP	o-dianisidine/ H ₂ O ₂	1,44290773	0,066813657
CALLO 2,4-D 254nm CON RECUP	o-dianisidine/ H ₂ O ₂	0,21574863	0,00200008

Las figuras 6.57 y 6.58, muestran la representación gráfica de los datos de K_M aparente y V_{max} de la o-dianisidina peroxidasa de callos, presentados en la tabla 6.28.

La figura 6.57, revela que el valor máximo de K_M se localiza en los callos de *N. teydea* inducidos con 2,4-D y tratados con luz UV-a sin recuperación con luz blanca, seguidos de los callos ANA y tratados con luz UV-a sin recuperación con luz blanca, y de los callos inducidos con ANA y tratados con luz UV-b (365nm), sin recuperación con luz blanca. En el resto de los callos ensayados, se detecta valores bajos de K_M .

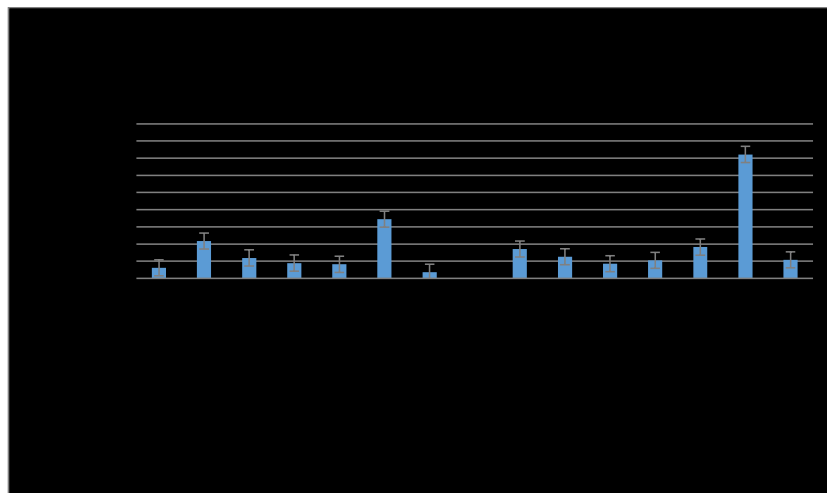
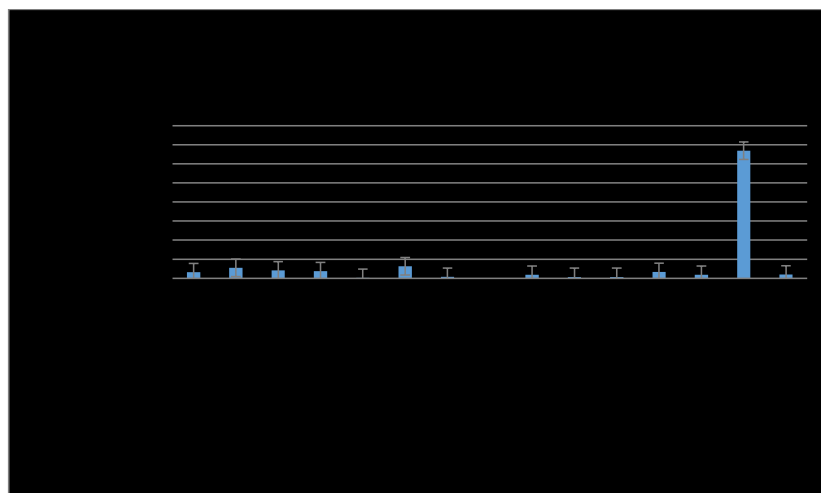


Figura 6.57.- Representación gráfica de los valores de K_M aparente (en mM) de la o-dianisidina peroxidasa de los callos de *N. teydea*, presentados en la tabla 6.28.

La figura 6.58, revela que el valor máximo de V_{max} se localiza en los callos de *N. teydea* inducidos con 2,4-D y tratados con luz UV-a sin recuperación con luz blanca. En el resto de los callos ensayados, se detecta valores muy bajos de V_{max} .



316

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 27/06/2017 09:46:14

JUAN IGNACIO FRIAS VIERA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 19:33:58

FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

29/06/2017 09:05:47

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

18/07/2017 14:28:34

Figura 6.58.- Representación gráfica de los valores de **V_{max}** ($\mu\text{moles} \times \text{s}^{-1} \times \text{L}^{-1}$) de la o-dianisidina peroxidasa de callos de *N. teydea*, presentados en la tabla 6.28.

Los resultados de **K_M** y **V_{max}** obtenidos mediante el diagrama de Lineweaver – Burk para la ferúlico peroxidasa en callos expuestos a diferentes condiciones experimentales se muestran en la tabla 6.29.

Tabla 6.29.- Valores de **K_M** y **V_{max}** de la ferúlico peroxidasa de extractos de callos de *N. teydea*, inducidos en condiciones *in vitro* por diferentes reguladores de crecimiento (ANA y 2,4-D), que fueron expuestos a distinta luz UV (luz UV-a (365nm), luz UV-a (360nm), o UV-b (254nm)), y a los que se les permitió o no, recuperarse en condiciones de luz blanca, antes de ser empleados en los ensayos

Material vegetal	Sustrato	Km aparente (mM)	Vmax ($\mu\text{moles} \times \text{s}^{-1} \times \text{L}^{-1}$)
CALLO ANA CONTROL	Ácido ferúlico /H ₂ O ₂	0,050798659	0,0003944
CALLO ANA 365nm SIN RECUP	Ácido ferúlico /H ₂ O ₂	0,036595526	0,000257136
CALLO ANA 365nm CON RECUP	Ácido ferúlico /H ₂ O ₂	0,074219302	0,000706514
CALLO ANA 360nm SIN RECUP	Ácido ferúlico /H ₂ O ₂	0,067120988	0,0014347
CALLO ANA 360nm CON RECUP	Ácido ferúlico /H ₂ O ₂	0,02895354	0,001090858
CALLO ANA 254nm SIN RECUP	Ácido ferúlico /H ₂ O ₂	0,103889058	0,00060957
CALLO ANA 254nm CON RECUP	Ácido ferúlico /H ₂ O ₂	0,111739579	0,000469395
CALLO 2,4-D CONTROL	Ácido ferúlico /H ₂ O ₂	12,90533571	0,0251566
CALLO 2,4-D 365nm SIN RECUP	Ácido ferúlico /H ₂ O ₂	0,297580645	0,000775434
CALLO 2,4-D 365nm CON RECUP	Ácido ferúlico /H ₂ O ₂	0,112452351	0,000668762
CALLO 2,4-D 360nm SIN RECUP	Ácido ferúlico /H ₂ O ₂	8,218970875	0,027501994
CALLO 2,4-D 360nm CON RECUP	Ácido ferúlico /H ₂ O ₂	0,169859524	0,000727855
CALLO 2,4-D 254nm SIN RECUP	Ácido ferúlico /H ₂ O ₂	0,116660882	0,000694203
CALLO 2,4-D 254nm CON RECUP	Ácido ferúlico /H ₂ O ₂	0,593234311	0,000777665

Las figuras 6.59 y 6.60, muestran la representación gráfica de los datos de K_M aparente y V_{max} presentados en la tabla 6.29.

La figura 6.59, revela que el valor máximo de K_M se localiza en los callos de *N. teydea* inducidos con 2,4-D control, seguidos de los callos inducidos con 2,4-D tratados con luz UV-b (360nm) sin recuperación con luz blanca. En el resto de los callos ensayados, se detecta valores bajos de K_M .

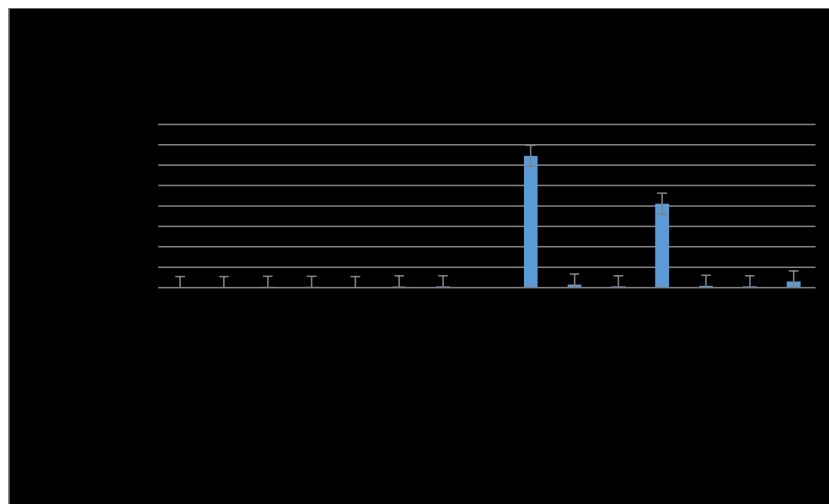


Figura 6.59.- Representación gráfica de los valores de K_M aparente (en mM) de la ferúlico peroxidasa de los callos de *N. teydea*, presentados en la tabla 6.29.

La figura 6.60, revela que el valor máximo de V_{max} se localiza en los callos de *N. teydea* inducidos con 2,4-D y tratados con luz UV-b (360nm) sin recuperación con luz blanca, seguido de los callos inducidos con 2,4-D control. En el resto de los callos ensayados, se detecta valores muy bajos de V_{max} .

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

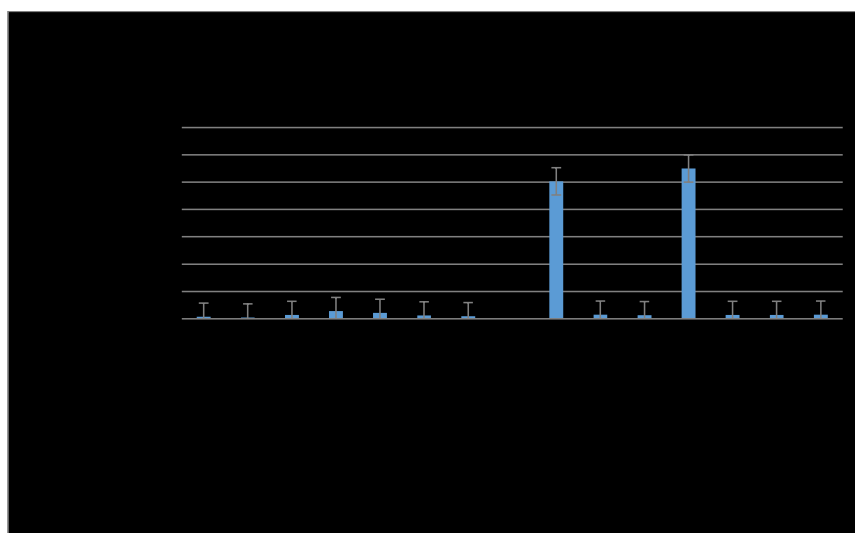


Figura 6.60.- Representación gráfica de los valores de V_{max} ($\mu\text{moles} \times \text{s}^{-1} \times \text{L}^{-1}$) de la ferúlica peroxidasa de los callos de *N. teydea*, presentados en la tabla 6.29.

Los resultados de concentración de proteínas obtenidos de los extractos de callos *in vitro* de *N. teydea*, inducidos con diferentes reguladores de crecimiento (ANA y 2,4-D) y expuestos a los diferentes tratamientos con luz UV del protocolo 1, se muestran en la tabla 6.30.

Tabla 6.30.- Concentración de proteínas (en mg/ml de extracto), obtenidos de los extractos de callos *in vitro* de *N. teydea*, inducidos con diferentes reguladores de crecimiento (ANA y 2,4-D) y expuestos a los diferentes tratamientos con luz UV del protocolo 1.

EXTRACTOS VEGETALES	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS (mg/ml de extracto)
CALLO ANA CONTROL	1,093
CALLO ANA 365 SIN RECUP.	0,693
CALLO ANA 365 CON RECUP.	1,233
CALLO ANA 360 SIN RECUP.	0,418
CALLO ANA 360 CON RECUP.	0,3
CALLO ANA 254 SIN RECUP.	0,533
CALLO ANA 254 CON RECUP.	0,367
CALLO 2,4-D CONTROL	0,271

319

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 27/06/2017 09:46:14

JUAN IGNACIO FRIAS VIERA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

28/06/2017 19:33:58

FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

29/06/2017 09:05:47

ERNESTO PEREDA DE PABLO
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

18/07/2017 14:28:34

CALLO 2,4-D 365 SIN RECUP.	0,2
CALLO 2,4-D 365 CON RECUP.	0,933
CALLO 2,4-D 360 SIN RECUP.	0,55
CALLO 2,4-D 360 CON RECUP.	0,535
CALLO 2,4-D 254 SIN RECUP.	1,333
CALLO 2,4-D 254 CON RECUP.	0,538

Las figuras 6.61 y 6.62, muestran la representación gráfica de los valores de concentración de proteínas obtenida a partir de extractos de callos *in vitro* de *N. teydea*, mostrados en la tabla 6.30, y agrupados en función del regulador de crecimiento aplicado para inducir los callos (ANA y 2,4-D).

La figura 6.61 nos indica que, en los extractos de callos inducidos con ANA, la mayor concentración de proteínas se obtuvo en los callos tratados con luz UV-b (365nm) con recuperación con luz blanca, seguidos de los callos control.

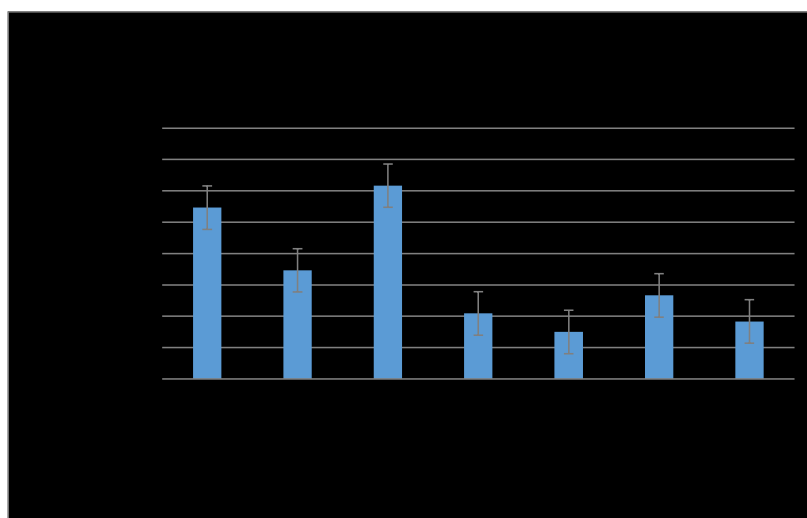


Figura 6.61.- Representación gráfica de la concentración de proteínas obtenidas en extractos de callos *in vitro* de *N. teydea*, inducidos por el regulador de crecimiento ANA, y sometidas a los diferentes ensayos del protocolo 1.

La figura 6.62 nos indica que, en los extractos de callos inducidos con 2,4-D, la mayor concentración de proteínas se obtuvo en los callos tratados con luz UV-a sin recuperación con luz blanca, seguidos de los callos tratados con luz UV-b (365nm) con recuperación con luz blanca.

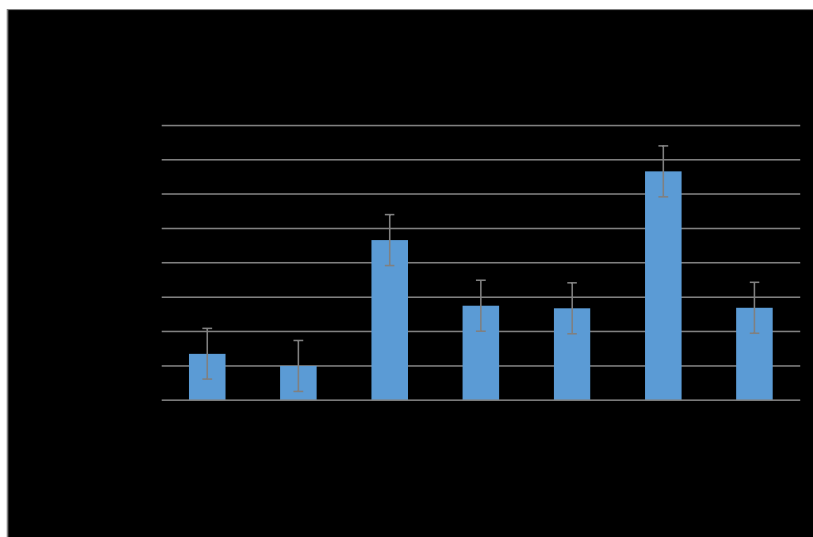


Figura 6.62.- Representación gráfica de la concentración de proteínas obtenidas en extractos de callos *in vitro* de *N. teydea*, inducidos por el regulador de crecimiento 2,4-D, y sometidas a los diferentes ensayos del protocolo 1.

VI.3.5. IDENTIFICACIÓN DE LAS FORMAS ISOENZIMÁTICAS DE PEROXIDASA DE *NEPETA TEYDEA* MEDIANTE ELECTROFORESIS NATIVA

Las diferencias en los parámetros cinéticos K_M y V_{max} de las peroxidasas, permiten establecer la existencia de diferencias en las propiedades que pueden ser manifestadas a nivel estructural. Es importante la dilucidación de este aspecto de la caracterización de las peroxidasas, primero, por el indiscutible interés que presenta un sistema controlado de expresión diferencial en enzimas inducidos por luz UV, y también, porque nos brinda una herramienta para identificar, en especies sometidas o expuestas a esta radiación luminosa, la presencia de alteraciones estructurales, que pueden rastrearse a nivel histológico o inmuno-histoquímico.

Para ello se diseñaron una batería de experimentos conducentes a reproducir las diferentes técnicas electroforéticas que permiten detectar peroxidasas sin tener que recurrir a anticuerpos que obviamente no están disponibles para esta especie vegetal (experimentos realizados en colaboración con otros laboratorios han puesto de manifiesto la no reactividad de al menos 2 anticuerpos comerciales dirigidos contra las peroxidasas tipo III de millo y tomate).

La figura 6.63, muestra la distribución de proteínas totales de muestras de callos de *N. teydea*, inducidos con ANA y 2,4-D, mediante SDS PAGE y reveladas con Azul de Coomassie. Observamos que la intensidad de la señal es mayor en el caso de los callos inducidos con 2,4-D, que los inducidos con ANA.

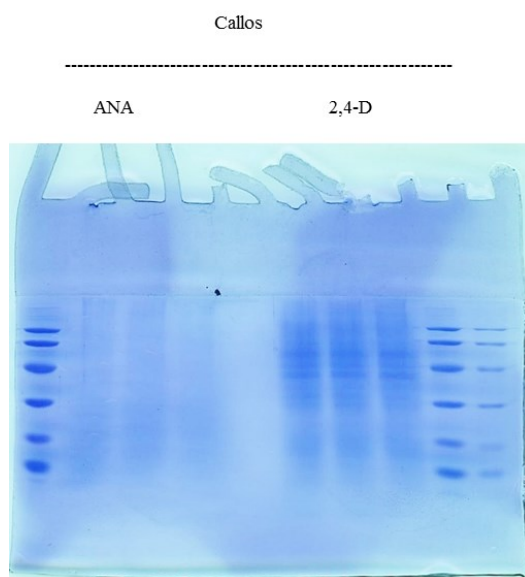


Figura 6.63.- Distribución de las formas enzimáticas de peroxidasas, presentes en extractos obtenidos a partir de callos de *N. teydea* inducidas con las hormonas ANA y 2,4-D, mediante electroforesis en condiciones desnaturalizante (SDS-PAGE) al 10% de acrilamida-bis y revelado con azul de Coomassie.

La figura 6.64, muestra la distribución de las formas enzimáticas de peroxidasas nativas presentes en extractos obtenidos de callos de *N. teydea*, inducidos con ANA y 2,4-D, mediante PAGE al 10% de acrilamida-bis y revelado con los sustratos guaiacol y H₂O₂. Observamos que la intensidad de la señal es mayor en el caso de los callos inducidos con 2,4-D, que los inducidos con ANA.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

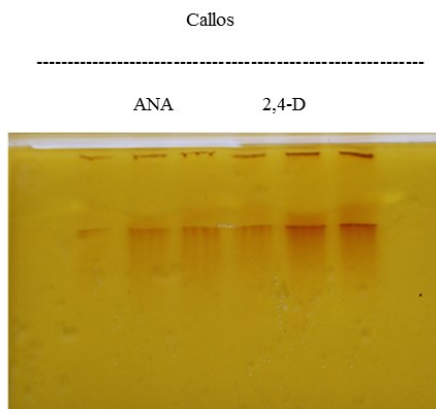


Figura 6.64.- Distribución de las formas enzimáticas de peroxidasa nativas presentes en extractos obtenidos a partir de callos de *N. teydea* inducidas con las hormonas ANA y 2,4-D, mediante electroforesis no desnaturalizante (PAGE) al 10% de acrilamida-bis y revelado con los sustratos guaiacol y H₂O₂.

La figura 6.65, muestra la distribución de las formas enzimáticas de peroxidasa nativas presentes en extractos obtenidos de callos de *N. teydea*, inducidos con ANA y 2,4-D, mediante PAGE al 5% acrilamida-bis y reveladas con el sustrato guaiacol y H₂O₂. Se incluye un control de HRP como comparación.

Observamos que la intensidad de la señal es mayor cuando la fuente de peroxidasa procede de rábano picante (HRP), y no se detectan diferencias entre los callos inducidos con ANA y los inducidos con 2,4-D.

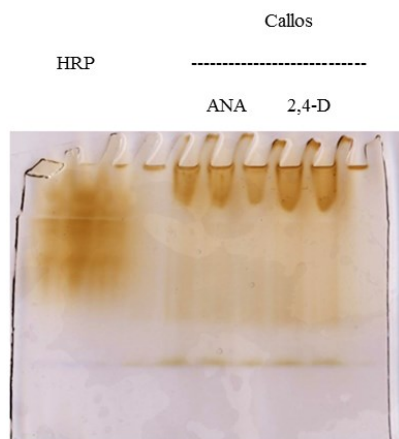


Figura 6.65.- Distribución de las formas enzimáticas de peroxidasa nativas presentes en extractos obtenidos a partir de callos de *N. teydea* inducidas con las hormonas ANA y 2,4-D, mediante electroforesis no desnaturizante (PAGE) al 5% acrilamida-bis y revelado con los sustratos guaiacol y H₂O₂. Se incluye un control de HRP como comparación.

La figura 6.66, muestra la distribución de las formas enzimáticas de peroxidasa nativa presentes en extractos obtenidos de callos de *N. teydea*, inducidos con ANA y 2,4-D, sometidos a luz UV-b (con pulsos de luz UV-b), mediante PAGE al 5% acrilamida-bis y reveladas con el sustrato guaiacol y H₂O₂. Se incluye un marcador de peso molecular. Observamos que la intensidad de la señal es mayor en el caso de los callos inducidos con 2,4-D, que los inducidos con ANA.

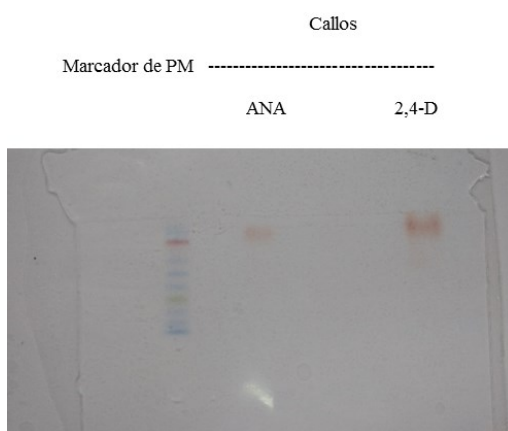


Figura 6.66.- Distribución de las formas enzimáticas de peroxidasa nativas presentes en extractos obtenidos a partir de callos de *N. teydea* inducidas con las hormonas ANA y 2,4-D, sometidos a luz UV-b (con pulsos de luz UV-b), mediante electroforesis no desnaturizante (PAGE) al 5% acrilamida-bis y revelado con los sustratos guaiacol y H₂O₂. Se incluye un marcador de peso molecular.

La figura 6.67, muestra la distribución de las formas enzimáticas de peroxidasa nativas presentes en extractos obtenidos de callos de *N. teydea*, inducidos con 2,4-D, sometidos a condiciones control y luz UV-b (con pulsos de luz UV-b), mediante PAGE al 5% acrilamida-bis y reveladas con 4-Cloro-Naptol.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Observamos que la intensidad de la señal es mayor cuando los callos inducidos con 2,4-D se han sometido con luz UV-b, con respecto a los callos inducidos con 2,4-D control (sin sometimiento a luz UV).

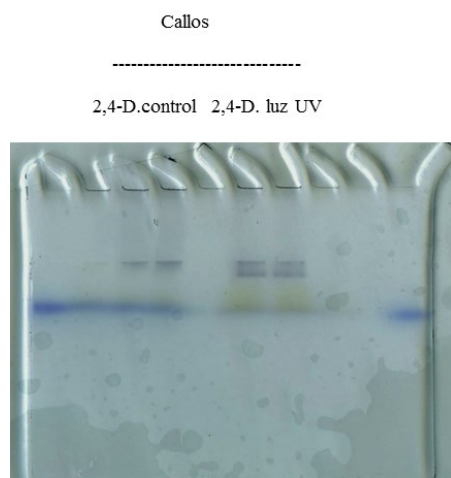


Figura 6.67.- Distribución de las formas enzimáticas de peroxidasa nativas presentes en extractos obtenidos a partir de callos de *N. teydea* inducidas con la hormona 2,4-D, sometidos a condiciones control y a luz UV-b (con pulsos de luz UV-b), mediante electroforesis no desnaturizante (PAGE) al 5% acrilamida-bis y revelado con 4-Cloro-Naptol.

La figura 6.68, muestra la distribución de las formas enzimáticas de peroxidasa nativas presentes en extractos obtenidos de callos de *N. teydea*, inducidos con 2,4-D, sometidos a condiciones control y luz UV-b (con pulsos de luz UV-b), mediante PAGE al 5% acrilamida-bis y reveladas con o-dianisidina.

Observamos que la intensidad de la señal es mayor cuando los callos inducidos con 2,4-D se han sometido con luz UV-b, con respecto a los callos inducidos con 2,4-D control (sin sometimiento a luz UV).

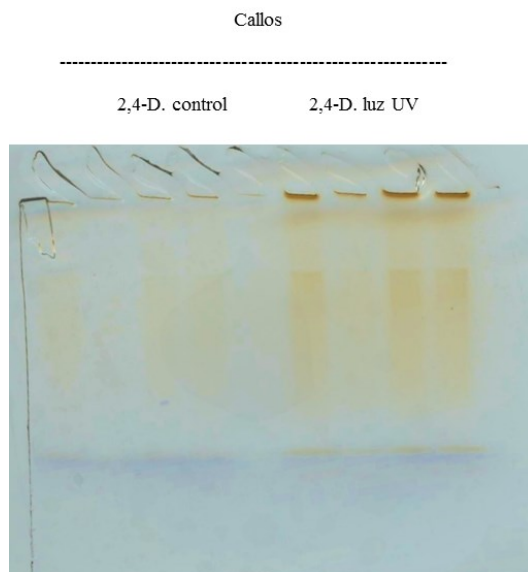


Figura 6.68.- Distribución de las formas enzimáticas de peroxidasa nativas presentes en extractos obtenidos a partir de callos de *N. teydea* inducidas con la hormona 2,4-D, sometidos a condiciones control y luz UV-b (con pulsos de luz UV-b) mediante electroforesis no desnaturalizante (PAGE) al 5% acrilamida-bis y revelado con con o-dianisidina.

La figura 6.69, muestra la distribución de las formas enzimáticas de peroxidasa nativas presentes en extractos obtenidos de callos de *N. teydea*, inducidos con 2,4-D, sometidos a condiciones control y luz UV-b (con pulsos de luz UV-b), mediante PAGE al 5% acrilamida-bis y revelado con guaiacol.

En este caso, no observamos grandes diferencias en la intensidad de la señal en los callos inducidos con 2,4-D sometidos a luz UV-b y control, cuando utilizamos guaiacol como sustrato revelador.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

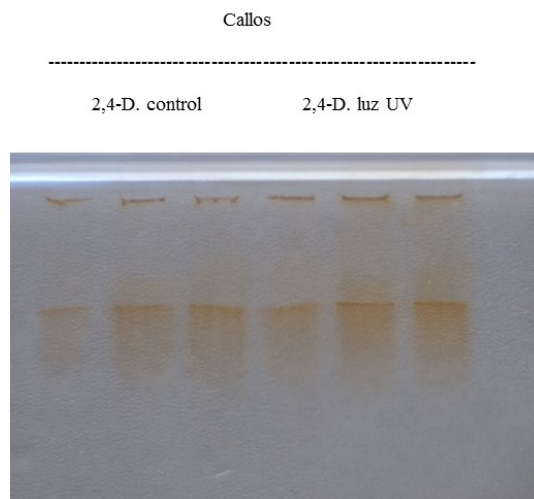


Figura 6.69.- Distribución de las formas enzimáticas de peroxidasa nativas presentes en extractos obtenidos a partir de callos de *N. teydea* inducidas con la hormona 2,4-D, sometidos a condiciones control y luz UV-b (con pulsos de luz UV-b), mediante electroforesis no desnaturalizante (PAGE) al 5% acrilamida-bis y revelado con guaiacol.

La figura 6.70, muestra la distribución de las formas enzimáticas de peroxidasa nativas presentes en extractos obtenidos de callos de *N. teydea*, inducidos con 2,4-D, sometidos a condiciones control y luz UV-b (con pulsos de luz UV-b), mediante PAGE al 5% acrilamida-bis y revelado con aminobencidina como sustrato específico de peroxidases y con luz UV con filtros.

Observamos que la intensidad de la señal es mayor cuando los callos inducidos con 2,4-D se han sometido con luz UV-b, con respecto a los callos inducidos con 2,4-D control (sin sometimiento a luz UV).

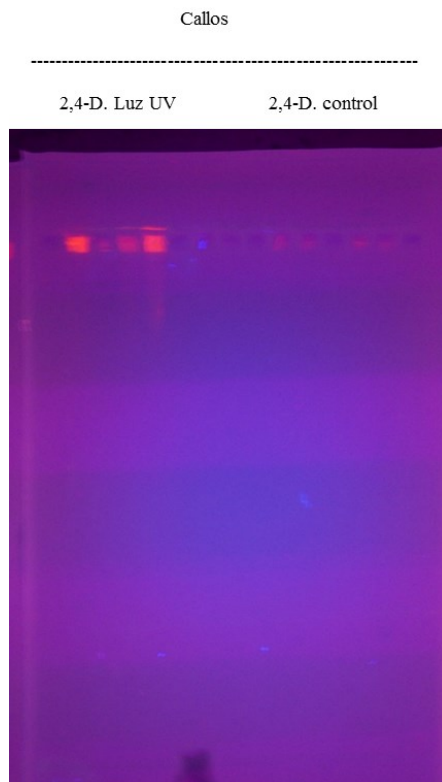


Figura 6.70.- Distribución de las formas enzimáticas de peroxidasa nativas presentes en extractos obtenidos a partir de callos de *N. teydea* inducidas con la hormona 2,4-D, sometidos a condiciones control y luz UV-b (con pulsos de luz UV-b), mediante electroforesis no desnaturalizante (PAGE) al 5% acrilamida-bis y revelado con aminobencidina-luz UV con filtros.

VI.3.6. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA EN CORTES DE HOJA Y TALLO DE *NEPETA TEYDEA*.

VI.3.6.1. SUSTRATO DAB

VI.3.6.1.1. HOJA DE PLANTAS ACLIMATADAS A CONDICIONES *EX VITRO* (pA)

VI.3.6.1.1.1. LUZ BLANCA

La s.t. de la hoja de las plantas que se revelaron con DAB como sustrato reductor y sin emplear H₂O₂ como sustrato oxidante, expuestas solamente a luz blanca,

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

mostró las mismas características descritas en el apartado 2.3.1.3.1. del capítulo V, tal y como se puede observar en la figura 6.61.

Sin embargo, en la figura 6.61.2, se representa una s.t de la hoja de plantas que se revelaron con DAB como sustrato reductor y empleando H₂O₂ como sustrato oxidante, expuestas solamente a luz blanca. En ella, se muestra la distribución de actividad peroxidasa, que se localiza principalmente en los tricomas presentes en ambas superficies epidérmicas, principalmente en los tricomas peltados, que se tiñeron de colos marrón.

FIGURA 6.61.- Hoja en s.t., expuesta a luz blanca, con revelado específico de peroxidasa con DAB

Figura 6.61.1.- Vista panorámica de la hoja en sección s.t, en el que se muestran los tejidos: epidermis con numerosos tricomas glandulares y no glandulares, parénquima clorofílico y haces vasculares. Revelado con DAB y sin H₂O₂.

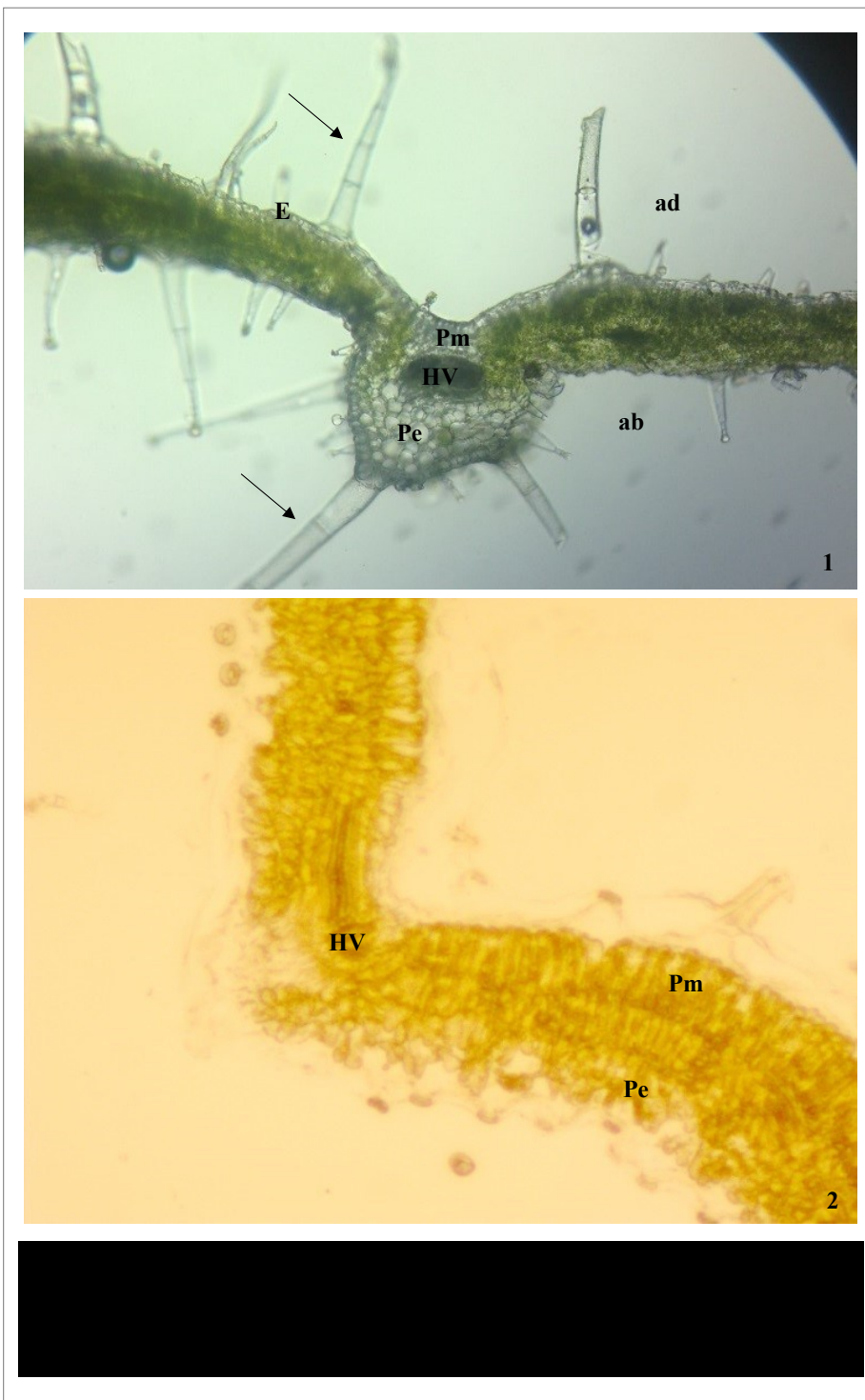
Figura 6.61.1.- Nervio central. Haz vascular. Revelado con DAB y con H₂O₂. Nótese las tricomas peltados teñidos de color marrón.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



330

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

VI.3.6.1.1.2. LUZ UV-B

La s.t. de la hoja de las plantas pA expuestas a luz UV-b, y que se revelaron con DAB como sustrato reductor, se muestran en la figura 6.62.

El estudio de la distribución de las peroxidasa en estas hojas de *Nepeta teydea*, mostró que la localización de estas proteínas se produce mayoritariamente en las epidermis, donde tanto las células epidérmicas como los tricomas glandulares se tiñeron completamente de color marrón, mientras que en los tricomas no glandulares sólo se tiñó la zona basal. (Figs. 6.62.1-2).

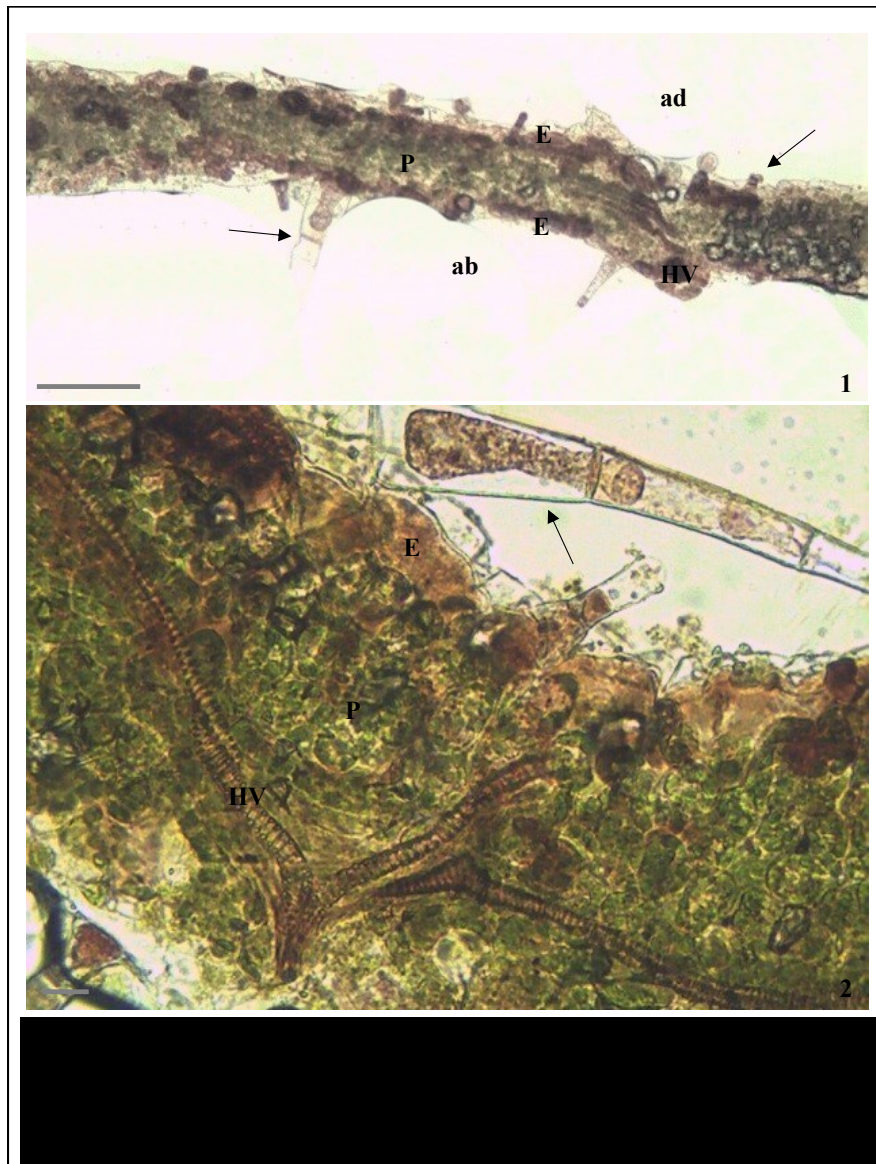
En el mesófilo se apreciaron también algunas manchas de color marrón, mientras que en los haces vasculares sólo se tiñeron las traqueidas (Figs.6.62.1-2).

FIGURA 6.62.- Hoja en s.t., expuesta a luz UV-b, con revelado específico de peroxidasa con DAB

Figura 6.62.1.- Vista panorámica de hoja en sección s.t., en el que se muestra los tejidos: epidermis, parénquima y haces vasculares. Nótese, la presencia de actividad peroxidasa principalmente en las epidermis y en los tricomas, que se encuentran fuertemente teñidos de color marrón.

Figura 6.62.2.- Detalles de la región internervial de la hoja. Epidermis simple con presencia de tricomas glandulares y no glandulares. Mesófilo clorofílico en el que se observan traqueidas. Nótese, la presencia de actividad peroxidasa en las traqueidas.

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

VI.3.6.1.2. TALLO DE PLANTAS ACLIMATADAS A CONDICIONES *EX VITRO* (pA)

VI.3.6.1.2.1. LUZ BLANCA

La s.t. del tallo de las plantas que se revelaron con DAB como sustrato reductor tanto, con empleo como sin empleo de H₂O₂ como sustrato oxidante, y expuestas solamente a luz blanca, no se detectó la presencia de actividad peroxidasa en ninguno de los tejidos, mostrando por tanto, las mismas características descritas en el 2.3.2.3.1. del capítulo V, tal y como se puede observar en la figura 6.63.1-2.

VI.3.6.1.2.2. LUZ UV-B

La s.t. de la hoja de las plantas pA expuestas a luz UV-b, y que se revelaron con DAB como sustrato reductor, se muestran en la figura 6.63.3-4.

El estudio de la distribución de las peroxidases en tallos de *Nepeta teydea* procedentes de estas plantas, mostró la localización de estas proteínas en las células epidérmicas de protección y en los tricomas glandulares (Fig. 6.63.3-4). Sin embargo, en los tricomas no glandulares el color marrón sólo aparece en la zona basal de estos pelos.

También se observó la presencia de peroxidases en el tejido colenquimático (Figs.6.63.3-4), en los haces vasculares, sobre todo, en los elementos del xilema y en la médula parenquimática (Fig. 6.63.3).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

FIGURA 6.63.- Tallo en s.t.

Figuras 6.63.1-2.- Tallo de plantas sometidas a luz blanca, con revelado específico de la peroxidasa con DAB. **Figura 6.63.1.-** Vista panorámica en la que se muestran los tejidos: epidermis con tricomas, colénquima subepidérmico, córtex parenquimático, haces vasculares y médula. **Figura 6.63.2.-** Detalle de la zona de la esquina del tallo. Epidermis simple con tricomas glandulares y no glandulares, colénquima subepidérmico, córtex parenquimático y haz vascular con fibras de esclerénquima perivasculares.

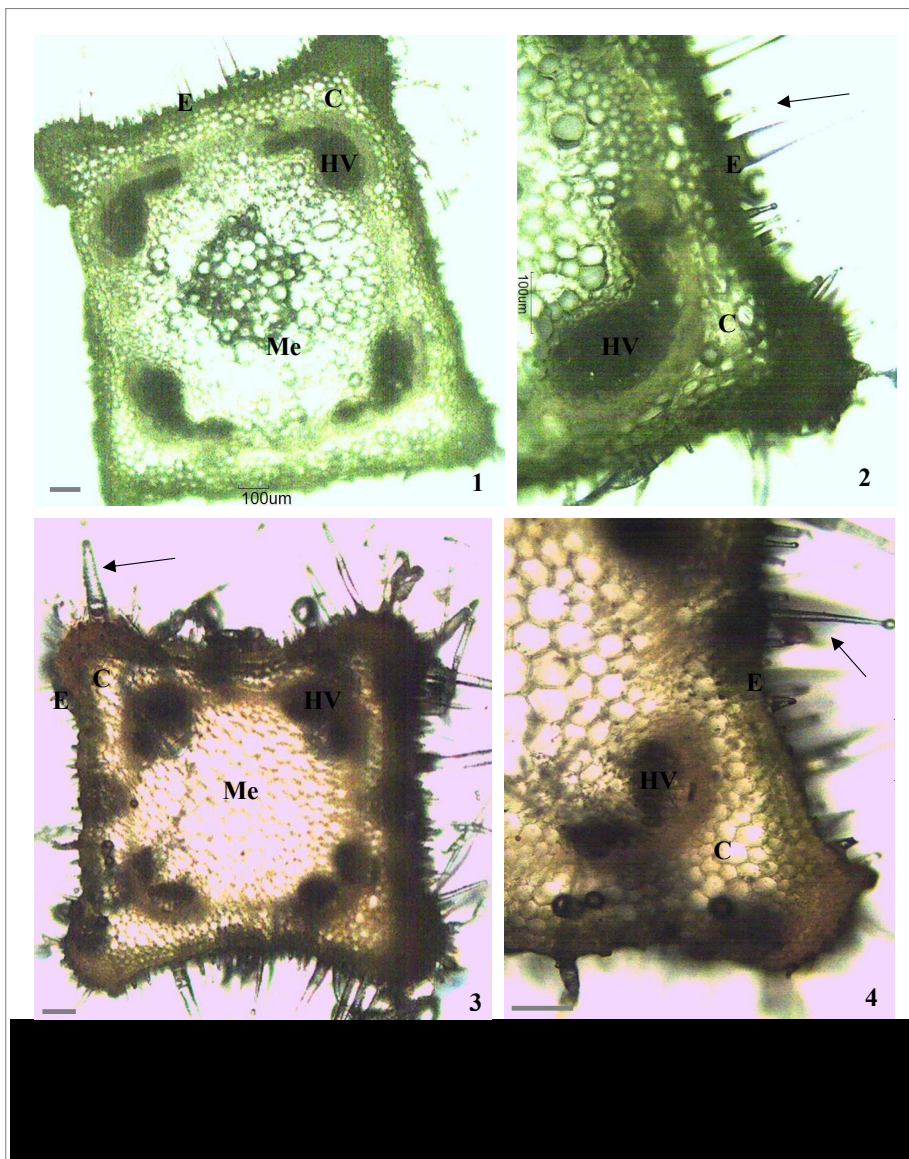
Figuras 6.63.3-4.- Tallo de plantas sometidas a luz UV-bc, on revelado específico de la peroxidasa con DAB. **Figura 6.63.3.-** Vista panorámica en la que se muestran los tejidos: epidermis con tricomas, colénquima subepidérmico, córtex parenquimático, haces vasculares y médula. Nótese la localización de la actividad peroxidasa en la epidermis y en los haces vasculares, que aparecen teñidos de color marrón. **Figura 6.63.4.-** Detalle de la zona de esquina del tallo. Epidermis simple con tricomas glandulares y no glandulares, colénquima subepidérmico, córtex parenquimático y haz vascular con fibras de esclerénquima perivasculares. Nótese la tinción marrón de los tricomas, la epidermis, el colénquima subepidérmico, el tejido vascular y las paredes celulares de las células parenquimáticas que constituyen el córtex y la médula del tallo.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

VI.3.6.2. SUSTRATO GUAIACOL**VI.3.6.2.1. HOJA Y TALLO DE PLANTAS ACLIMATADAS A CONDICIONES EX VITRO (pA)****VI.3.6.2.1.1. LUZ BLANCA**

La s.t. de la hoja de las plantas que se revelaron con guaiacol como sustrato reductor y sin emplear H_2O_2 como sustrato oxidante, expuestas solamente a luz blanca (Fig. 6.64.1-4), no mostró tinción de color marrón en los tejidos observados, presentando tricomas glandulares y no glandulares translúcidos (Fig. 6.64.1 y 6.64.2), y una mesófilo clorofílico (Fig. 6.64.1 y 6.64.4). Aunque en la figura 6.64.3, se apreció con dificultad la localización de actividad peroxidasa en la epidermis y en algunos tricomas.

Sin embargo, en las figuras 6.64.5-6, se representa una s.t de la hoja de plantas que se revelaron con guaiacol como sustrato reductor y empleando H_2O_2 como sustrato oxidante, expuestas solamente a luz blanca. En ella, se muestra la distribución de actividad peroxidasa, que se localiza principalmente en los tricomas, y concretamente en los tricomas no glandulares, es en la parte apical de estos pelos, donde apareció la tinción de color marrón (Fig. 6.64.5).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

FIGURA 6.64.- Hojas expuestas a luz blanca, con revelado específico de peroxidasa con guaiacol.

Figura 6.64.1.- Mesófilo clorofílico con detalle de un tricoma glandular.

Figura 6.64.2.- Detalle de un tricoma no glandular.

Figura 6.64.3.- Detalle de la zona del nervio central de la hoja. Detalle del parénquima que rodea al tejido vascular y que está localizado hacia el haz, epidermis y tricomas. Nótese la tinción de color marrón en las paredes celulares de las células del parénquima, de la epidermis y en algunos de los tricomas.

Figura 6.64.4.- Detalle del mesófilo clorofílico en la zona internervial de la hoja.

Figura 6.64.5.- Tricoma no glandular. Nótese la presencia de actividad peroxidasa en la parte apical del pelo.

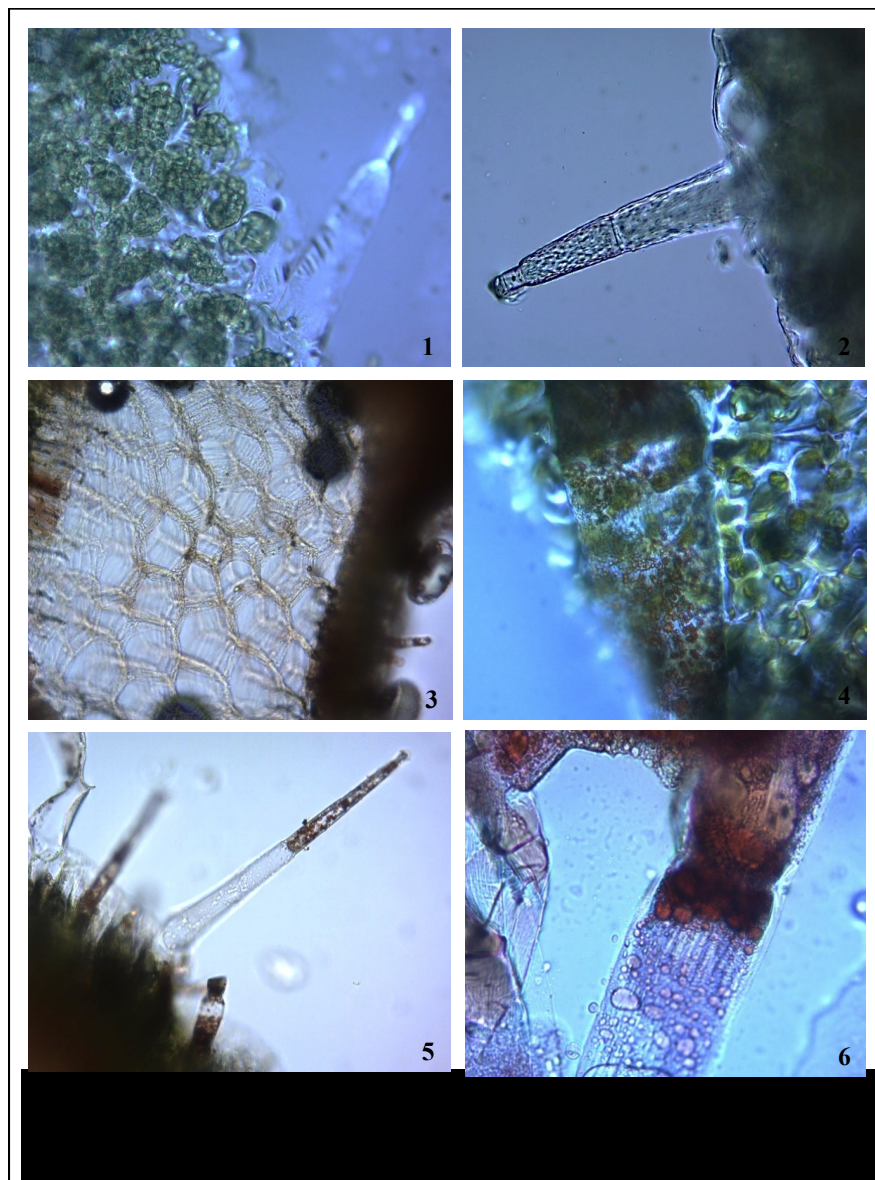
Figura 6.64.6.- Detalle el interior de un tricoma teñido de color marrón.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

VI.3.6.2.1.2. LUZ UV-B

La s.t. de la hoja de las plantas pA expuestas a luz UV-b, y que se revelaron con guaiacol como sustrato reductor, se muestran en la figura 6.65.

El estudio de la distribución de las peroxidases en estas hojas de *Nepeta teydea*, mostró que la localización de estas proteínas se produce mayoritariamente en las epidermis, donde tanto las células epidérmicas como los tricomas glandulares se tiñeron completamente de color marrón, mientras que en los tricomas no glandulares sólo se tiñó la zona basal. (Figs. 6.65.1-2).

En el mesófilo se apreciaron también algunas manchas de color marrón, mientras que en los haces vasculares sólo se tiñeron las traqueidas (Figs. 6.65.1-2).

La s.t. de tallo de las plantas pA expuestas a luz UV-b, y que se revelaron con guaiacol como sustrato reductor, se muestran en la figura 6.65.4. La distribución de la actividad peroxidasa en tallos de *N. teydea* se mostró principalmente en la epidermis (incluyendo los tricomas), el córtex y el tejido vascular, los cuales, se tiñeron intensamente de color marrón. En la médula central, sólo se localizó actividad peroxidasa, en las paredes celulares de las células parenquimáticas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

FIGURA 6.65.- Hoja y tallo con revelado específico de peroxidasa con guaiacol expuesta a radiación UV-b

Figura 6.65.1.- Detalle del interior de un tricoma. Nótese la intensa tinción de color marrón en ellos.

Figura 6.65.2.- Zona internervial de la hoja, en el que se aprecia la localización de la actividad peroxidasa en los tricomas.

Figura 6.65.3.- Zona del nervio central de la hoja. Detalle del parénquima que rodea al tejido vascular y que está localizado hacia el haz y tricomas. Nótese la tinción de color marrón en las paredes celulares de las células del parénquima.

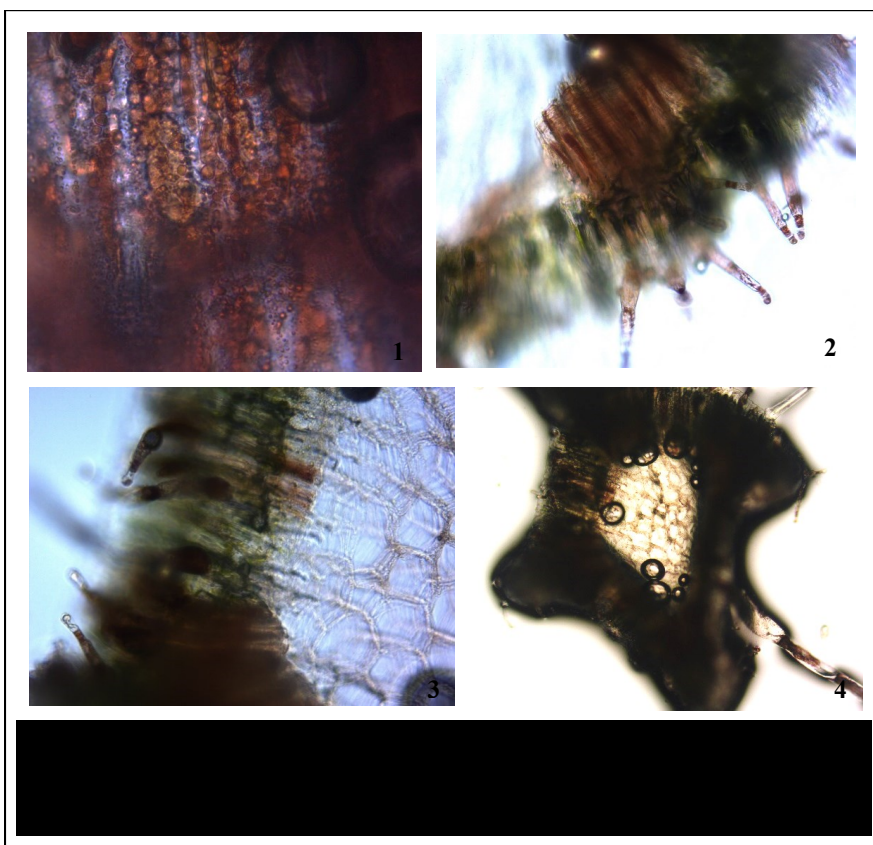
Figura 6.65.4.- Panorámica de tallo en s.t. Nótese la intensa tinción de color marrón que aparece en la zona que comprende la epidermis (con sus correspondientes tricomas), córtex y tejido vascular. Sin embargo, en la zona de la médula central del tallo, únicamente se localiza la actividad peroxidasa en las paredes celulares.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383		Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		18/07/2017 14:28:34

VI. 4. DISCUSION

VI. 4.1. ACTIVIDAD PEROXIDASA EN PLANTAS DE *NEPETA TEYDEA*.

El grupo más importante de peroxidases en plantas superiores se agrupan estructural y genéticamente como Peroxidases Clase III. Este grupo está formado por peroxidases de naturaleza glicoproteica, con alta estabilidad térmica y están implicadas en la respuesta de la planta a estímulos externos (frecuentemente de defensa frente a esas señales) y también se encuentran representadas otras importantes funciones fisiológicas para el crecimiento y la diferenciación de las plantas (incluyendo secreción, crecimiento meristemático, enraizamiento, procesamiento del metabolismo secundario etc.). Aunque localizadas principalmente en vacuolas o unidas a membrana, otro importante grupo de ellas se localizan libremente y responden rápidamente a señales del entorno (Lüthje et al., 2011).

Los ensayos realizados para determinar diferentes fracciones de peroxidasa en la fracción soluble de hoja de *Nepeta teydea*, muestran la reactividad de estas enzimas de *N. teydea* para transformar un amplio grupo de sustratos naturales como el guaiacol, el ácido ferúlico o ácido cafeico, sustratos no naturales como el catecol y sustratos que incluso no están presentes en plantas como la o-dianisidina. Las reacciones y los valores de Absortividad molar (ϵ) se calcularon para estos sustratos y se realizaron ensayos de cromatografía en capa fina para identificar los productos de la reacción. Los resultados obtenidos nos indican que el enzima se presenta en todos los tejidos tanto hojas como peciolas, tallo y raíz (resultados no mostrados en este trabajo gráficamente). Aunque todos los sustratos indicados (excepto el sustrato no natural o-dianisidina) forman parte de diferentes rutas metabólicas en plantas, la baja especificidad de las peroxidases para ellos, hace difícil establecer, solamente con esta aproximación, la naturaleza de las peroxidases detectadas. Sin embargo, nuestro interés está en encontrar variaciones en al menos una de estas formas enzimáticas, que sea detectable a niveles que permitan inferir el efecto sobre la planta de la exposición a diferentes formas de luz UV, por lo que no requerimos aislar la fuente de actividad siempre que esta sea identificable. Se emplearon preferentemente en nuestros ensayos, el sustrato guaiacol, por ser un sustrato natural e inducible, y el sustrato o-dianisidina, por ser un marcador de actividad peroxidasa genérico.

Nuestra hipótesis de partida propone que la diferencia encontrada en la actividad enzimática, estaría implicada en la respuesta a luz, probablemente mediante

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

los niveles de H₂O₂ mantenidos por estas peroxidasas y regulados por ellas, en el citoplasma de las células situadas bajo la epidermis (Mullineaux et al., 2000; Hung et al., 2005).

Los datos obtenidos para la estabilidad térmica de la enzima medida en las diferentes condiciones ensayadas, nos indican que presenta una alta resistencia a la temperatura, como se ha descrito para este tipo de peroxidasas, probablemente debido a la presencia de grupos azúcar recubriendo su superficie.

Por otro lado, la determinación del pH óptimo de la actividad peroxidasa de *N. teydea* (pH 6.60), nos indica que las peroxidasas con las que estamos trabajando son más bien peroxidasas citoplasmáticas. Estudios diferencian la actividad ensayada de peroxidasas de membranas que presentan pH óptimos más básicos (en torno a 7.0), incluso de las peroxidasas presentes en vacuolas, que presentan pH óptimos más ácidos (en torno a 5.0) (Hiraga et al., 2001).

VI. 4.2. RESPUESTA A LA LUZ ULTRAVIOLETA DE DIFERENTES TEJIDOS DE *NEPETA TEYDEA*.

Las plantas responden a la luz UV-b de forma universal activando diferentes modelos de defensa que en ocasiones son específicos de la especie (Rozema et al., 1997; Yao & Liu, 2006).

A pesar de ello las plantas con exposición alpina, en general aquellas plantas que están expuestas a altos niveles de luz UV y en ambientes despejados, parecen responder más intensamente y de forma más rápido a estos estímulos que especies de ambientes donde la incidencia de estos parámetros es más tenue, mostrando una menor respuesta de defensa y concomitantemente una menor capacidad de indicar con cambios metabólicos o ultra-estructurales que está sufriendo un daño ambiental (Caldwell et al., 1982).

La elección de *Nepeta teydea* como modelo biológico de estudio, surge como consecuencia de esta observación referente a la previsible mayor respuesta a la luz UV en especies alpinas (en nuestro caso el límite inferior para esta especie se sitúa alrededor de los 1800 m.s.n.m.) y, por otro lado, por pertenecer a la familia de las labiadas. Las plantas de esta familia, presentan un rico metabolismo secundario derivado de la ruta de los ácidos sikimicos hacia fenilpropanos, lo que garantiza la presencia de gran cantidad

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

de enzimas asociadas a la respuesta de defensa general de las plantas, como son las peroxidases (Tohge et al., 2013; Herrmann, 1995).

La importancia de ensayar las peroxidases como marcadores, radica en su papel central en la respuesta a las ROS (Shigeto & Tsutsumi, 2016), y más importante aún para nosotros, por la implicación directa de este enzima, en los procesos de modificación del pool de fenoles que se produce como respuesta inmediata a la exposición a todo tipo de radiación ionizante (Stafford, 1991; Kubitzki, 1987)

Por tanto, ensayar la actividad de peroxidasa en tejidos de *Nepeta teydea* expuestas a luz UV-b, nos pareció un modelo adecuado para estudiar en primer lugar la respuesta de las plantas a este tipo específico de daño y, en segundo lugar, nos permite proponer un modelo natural para inferir la acumulación del daño promovido entre otros por el incremento en la radiación ionizante propuesto actualmente (Nawkar et al., 2013; Herman, 2010; Ballare et al., 2011).

Los resultados obtenidos de la exposición de hojas aisladas de *Nepeta teydea* a ciclos cortos de luz UV-b, las cuales sumaban una irradiación total relativamente poco intensa (30 minutos de exposición total a luz UV-b), se detectan tras un periodo corto de adaptación. Los ensayos llevados a cabo con las hojas, indican un incremento en la actividad de guaiacol peroxidasa de hojas expuestas a luz respecto de los controles. Estos resultados confirman nuestra hipótesis de que *Nepeta teydea* puede ser un modelo adecuado para la detección de este tipo de agresión y que vale la pena explorar este modelo biológico en condiciones más próximas a las naturales. En este sentido, realizamos otra serie de experimentos en los cuales utilizamos plantas vivas y aclimatadas a un ambiente controlado invernadero-laboratorio con ciclos de humedad y luminosidad constantes. Estas plantas se mantuvieron al menos 4 mes (4-8 meses) en estas condiciones antes de ser sometidas a los experimentos descritos en materiales y métodos, en los que se utilizaron ciclos cortos, a mayor distancia aun, y por tanto de menor intensidad de luz UV-b. En estas condiciones las planta responden de forma similar a las hojas aisladas (véase tabla de resultados), pero lo más interesante resulta del posterior pase al medio de crecimiento controlado, donde el efecto de la irradiación se manifiesta a las 2 semanas, originando un marcado decaimiento y la muerte en un periodo de 6-8 semanas posterior a la exposición (no así en las plantas control). Estos experimentos preliminares nos indican la viabilidad del modelo y apuntan a la necesidad de establecer las irradiaciones mínimas que generen el equivalente al LD 50 descrito para sustancias tóxicas y de una forma exacta.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

De los resultados obtenidos de los experimentos realizados en la última parte de este trabajo (con pulsos de luz UV-b), hemos planteado como posible hipótesis, que valores de irradiación de luz UV-b alrededor de $\frac{1}{4}$ del valor empleado en nuestros ensayos, producirían aproximadamente el 50% de muerte en las plantas ensayadas (6 ejemplares, resultados no confirmados para esta Tesis) véase imagen adjunta:

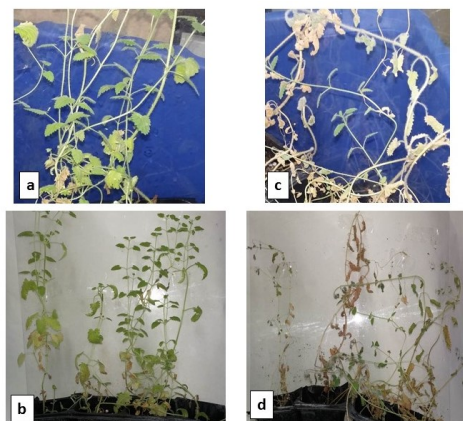


Figura 6.66.- Muestra plantas de cultivo en condiciones de invernadero expuestas a luz UV-b o controles expuestos solamente a luz blanca. Planta control a los 30 días del experimento empleando solamente luz blanca (a) detalle y (b) planta entera. Planta expuesta a luz UV-b a los 30 días del ensayo (c) detalle y (d) planta entera.

Papel de la inducción hormonal en el establecimiento de callos que responden a luz UV-b.

Diferentes autores han descrito un mayor incremento de la biomasa de callos cuando éstos se inducen empleando la hormona ANA que cuando se emplea la hormona 2,4-D (Kumar et al., 2014).

Estos tejidos indiferenciados inducidos con ANA, acumulan menos metabolitos secundarios y menos especies reactivas, que los inducidos con 2,4-D. Sin embargo, cuando la inducción es en sinergia con benciladenina (BA), la producción de fenoles se incrementa drásticamente. En nuestro trabajo, se detectó una menor presencia de peroxidasas en los callos inducidos con ANA con respecto a los inducidos con 2,4-D. Los callos inducidos con 2,4-D, en general, muestran mayores niveles de actividad enzimática para peroxidasas, que cuando se emplean otros inductores hormonales, he

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 965383	Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

hecho, esta característica ha sido ampliamente descrita para diferentes modelos de plantas.

Por otro lado, se ha estudiado por diferentes autores (Ahmad et al., 2016) que la exposición a luz de diferentes longitudes de onda (UV, infrarroja) en callos inducidos con 2,4-D, induce cambios metabólicos que incluyen una mayor producción y concentración de fenoles.

Actualmente existe un consenso en emplear la hormona 2,4-D, para inducir callos con alta producción de metabolitos y enzimas del metabolismo de los fenilpropanos (Santos et al., 2003).

Por último, también se ha descrito el uso de la hormona ABA, como un potente inductor de las actividades asociadas con el metabolismo de los fenilpropanos, entre ellos, se incluye la actividad de las peroxidasa y la acumulación de fenoles como el guaiacol implicados como sustratos en la actividad de esta enzima (Jiang & Joyce, 2003).

VI.4.3. VARIACIÓN EN LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LAS PEROXIDASAS DE *NEPETA TEYDEA*: K_M Y V_{max} .

La mayor diferencia detectada al determinar los parámetros cinéticos K_M y V_{max} para la peroxidasa de *Nepeta teydea*, se localiza en callos inducidos por diferentes hormonas (ANA versus 2,4-D) en referencia al valor de la afinidad por los sustratos empleados. Tanto con el guaiacol, que en nuestro experimento representa el sustrato natural y por tanto el que podríamos considerar específico, como con la o-dianisidina, que es el sustrato genérico, que se emplea para identificar toda la capacidad peroxidativa de un tejido, se encuentran diferencias estadísticamente significativamente mayores cuando los callos han sido inducidos con ANA que cuando el inductor hormonal es 2,4-D. Estos resultados son consistentes con las evidencias obtenidas por otros autores que detectan un proteoma más representativo de las rutas del metabolismo de fenilpropanos en el que participan las peroxidasa tipo III como la que nos ocupan en este trabajo, que cuando las células reciben otros estímulos hormonales diferentes (Jiang & Joyce, 2003).

Las variaciones en los valores de actividad máxima no son tan representativas y no se sostienen estadísticamente, por lo que se requieren experimentos más detallados, por ejemplo, aislando las isoenzimas inducidas por diferentes hormonas y determinando

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

inequívocamente sus parámetros de velocidad y eficiencia catalítica para poder sacar conclusiones acerca de la eficiencia de la catálisis de las peroxidasas que se inducen en respuesta a luz UV-b.

VI.4.4. DETECCIÓN DE PEROXIDASAS DE *NEPETA TEYDEA* EN PAGE.

El análisis de la distribución de isoenzimas de peroxidasa mediante PAGE en condiciones no desnaturizantes muestra que, no hay diferencias apreciables en la cantidad de bandas reactivas asociadas a formas diferentes de isoenzimas. El patrón de revelado es irregular y la técnica, aunque eficiente para identificar isoenzimas de peroxidasa en otros tejidos vegetales, se muestra en nuestro sistema experimental muy difícil de resolver para identificar bandas discretas, debido probablemente a que nuestros extractos de *N. teydea*, proceden de callos inducidos hormonalmente en condiciones *in vitro*, en los cuales, se adiciona grandes cantidades de azúcares al medio de cultivo. Hemos repetido bajo diferentes condiciones y empleando reactivos alternativos y siempre obtuvimos con *Nepeta teydea*, dispersión de las bandas identificadas por revelado. Mantenemos la hipótesis de que la gran cantidad de azúcares presentes en el medio y el carácter de glicoproteína con un alto contenido de azúcares enlazados en el exterior de esta proteína, y que le confieren la alta estabilidad térmica señalada en otros apartados de este trabajo, es la responsable de esta variabilidad en la movilidad de las diferentes fracciones de enzima. Así y todo, hemos detectado el correspondiente incremento en la reactividad de las bandas separadas por PAGE no desnaturizante en aquellos extractos de callos inducidos por 2,4-D respecto de los inducidos por ANA. Más importante aún, hemos detectado mayor señal en los experimentos de inducción por luz UV-b respecto de los controles, lo que nos indica (al igual que los datos del cálculo de V_{max}) que en el proceso de adaptación, posterior a la inducción por luz UV-b, se origina síntesis de más proteína implicada en la respuesta a este estímulo en *Nepeta teydea*.

VI.4.5. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD PEROXIDASA EN CORTES DE HOJA Y TALLO DE *NEPETA TEYDEA*.

Las peroxidasas tienen una amplia distribución a lo largo del reino vegetal, y están fuertemente asociadas con las regiones de crecimiento y diferenciación de las plantas (Crevecoeur et al., 1997). Las peroxidasas vegetales están presentes en la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

mayoría de los tejidos, y se han correlacionado con las múltiples funciones fisiológicas que pueden llevar a cabo. Algunas de ellas son: la biosíntesis de pared celular (suberificación y lignificación), el catabolismo de auxinas (degradación de ácido indol-3-acético), (Miesli et al., 1991), la biosíntesis de etileno y la defensa de la planta (Douroupi & Margaritis, 1998).

VI.4.6. DISCUSIÓN ESTUDIO HISTOQUÍMICO DE LAS PEROXIDASAS DE PLANTAS CONDICIONES ACLIMATADA A CONDICIONES *EX VITRO* EXPUESTAS A LUZ UV

Hemos empleado el sustrato DAB (3,3-diaminobencidina) por tratarse de un compuesto estable bajo las condiciones de ensayo habituales, porque su velocidad de autooxidación es despreciable y porque en ocasiones se ha demostrado que es más sensible que otros como la o-dianisidina (Herzog & Fahimi, 1973), y el guaiacol, por tratarse de un sustrato natural de las peroxidasas.

Tanto el DAB como el guaiacol, son sustrato que precipita, tiñendo de color marrón oscuro aquellos lugares del tejido donde detecta actividad peroxidasa.

VI.4.6.1. HISTO-LOCALIZACIÓN DE LAS PEROXIDASAS EN SECCIONES DE HOJAS EXPUESTAS A LUZ UV

En las hojas de *Nepeta teydea*, la presencia de actividad peroxidasa se detectó principalmente en las epidermis (abaxial y adaxial), tanto en las células epidérmicas de protección como en los tricomas glandulares. Este dato concuerda con los estudios realizados en *Urtica dioica*, donde las peroxidasas se localizaron principalmente en las células epidérmicas, tanto a nivel del tonoplasto como en las paredes celulares de hojas (Douroupi & Margaritis, 1998) y en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) donde además se observó una mayor presencia en la superficie abaxial y la ausencia en las células estomáticas (Klotz et al., 1998).

En cuanto a los tricomas no glandulares, sólo se observó la presencia de peroxidasas en la zona basal de los mismo, debido posiblemente al desplazamiento o a la acumulación de gran parte de la actividad peroxidasa hacia esa zona, después de exponer las hojas a luz UV-b.

La presencia de esta enzima en los tricomas foliares ha sido estudiada en *Rosmarinus officinalis*, cuyos tricomas glandulares capitados y peltados, contienen una

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

mezcla de secreción heterogénea formada por proteínas, polisacáridos y compuestos fenólicos. Estos resultados son consistentes con los resultados fitoquímicos obtenidos de otros análisis de la familia Lamiaceae (Marín et al., 2006).

También se observa claramente en la hoja de *Nepeta teydea*, la actividad peroxidasa en los elementos vasculares (traqueidas) al igual que en *Urtica dioica* (Douroupi & Margaritis, 1998).

Aunque se observan algunas manchas de color marrón dentro del mésofilo, no podemos asegurar la presencia de este enzima debido a la alta cantidad de clorofila de este tejido.

VI.4.6.2. HISTO-LOCALIZACIÓN DE PEROXIDASAS EN SECCIONES DE TALLOS EXPUESTAS A LUZ UV

En los tallos de *Nepeta teydea*, se muestra la existencia de actividad peroxidasa mayoritariamente en la epidermis, aunque también se aprecia en el colénquima, y en los cuatros haces vasculares.

En la epidermis del tallo de *Nepeta teydea*, las peroxidasas se encuentran en las células epidérmicas de protección, en los tricomas glandulares y sólo en la zona basal de los tricomas no glandulares, al igual que ocurre en las hojas. También se ha detectado la presencia de peroxidasas en la epidermis y tricomas de tallos de plantas de *Nicotiana tabacum* (Klotz et al., 1998), y en la epidermis caulinar de *Urtica dioica* (Douroupi & Margaritis, 1998).

La localización de las peroxidasas en el tejido colenquimático ha sido observada también en tallos de *Zinnia elegans* L., donde se concentra en las paredes celulares. Esta presencia de peroxidasas en el colénquima, se relacionó con su participación en la reticulación o entrecruzamiento de las pectinas y hemicelulosa que predominan en las paredes de estas células (Liu et al., 1999).

La presencia de peroxidasas en los haces vasculares, principalmente en las paredes engrosadas de los elementos del xilema, se debe a que estas enzimas median en la polimerización de los alcoholes cinámilicos a ligninas (Ros Barceló, 1998).

Sin embargo, en plantas de tabaco, se detectó la presencia de peroxidasas en los tejidos, al existir actividad en el parénquima asociado con el xilema y el floema, pero no en los elementos conductores como tal (células lignificadas o células destinadas a estar

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

lignificadas). Esto sugiere que la actividad del enzima en el parénquima está implicada en la lignificación del xilema, pero también podría ser importante en la defensa, crecimiento y desarrollo de la planta (Klotz et al., 1998).

Por último, en los tallos de *Nepeta teydea*, se apreció la localización de estos enzimas únicamente en las paredes celulares tanto en el córtex como en la médula central parenquimatoso, con el sustrato DAB, mientras que con el sustrato guaiacol, el córtex se tiñó intensamente, y en la médula sólo aparece actividad peroxidasa a nivel de las paredes celulares. Estos datos, concuerdan con estudios en plantas de tomate, donde la presencia de peroxidasa se detectó en el córtex pero no en la médula caulinar (Liu et al., 2014).

En tallos de *Zinnia elegans* L., se encontró que las células de la médula central producían peróxido de hidrógeno dependiente de peroxidasa (Liu et al., 1999).

De manera generalizada, la alta actividad de peroxidasa encontrada en las paredes celulares, probablemente indica la importancia de estos enzimas en el proceso de lignificación. Este patrón de localización explicaría el entrecruzamiento mediante peroxidasa de los diferentes polímeros de la pared (Dehon et al., 2002).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

VI.5. BIBLIOGRAFÍA

- Aboul-Gheit AK, Abdel-Hamid SM, Mahmoud SA, El-Salamony RA, Valyon J, Mihalyi MR, Szegedi A. 2011.** Mesoporous Ti-MCM-41 materials as photodegradation catalysts of 2,4,6-trichlorophenol in water. *J Mater Sci* 46: 3319-3329.
- Adams JB. 1991.** Review: Enzyme inactivation during heat processing of food – stuffs. *Int J Food Sci Technol* 26 (1): 1-20.
- Agostini E, Hernandez-Ruiz J, Amao MB, Milrad SR, Tigier HA, Acosta M. 2002.** A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root cultures: inactivation by hydrogen peroxidase and application in diagnostic kits. *Biotechnol Appl Biochem* 35:1-7.
- Ahmad N, Rab A, Ahmad N. 2016.** Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). *J Photochem Photobiol B* 154: 51-6.
- Alberty RA.1953.** A short history of the thermodynamics of enzyme-catalyzed reactions. *J Am Chem Soc* 75 (1953): 1921-1926
- Alva KS, Kumar J, Marx KA, Tripathy SK. 1997.** Enzymatic Synthesis and Characterization of a Novel Water- Soluble Polyaniline: Poly (2,5 Diaminobenzenesulfonate). *Macromolecules* 30: 4024- 4029.
- Almagro L, Gómez Ros LV, Belchí-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A, Pedreño MA. 2009.** Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot* 60: 377-390.
- Arrieta-Baez D, Stark RE. 2006.** Modelling suberization with peroxidase-catalyzed polymerization of hydroxycinnamic acids: cross-coupling and dimerization reactions. *Phytochem* 67: 743-753.

Identificador del documento: 965383		Código de verificación: Gox5F7nX
Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14	
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58	
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47	
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34	

- Asada K. 1992.** Ascorbate peroxidase-A hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 85:235-241.
- Azevedo AM, Martins VC, Prazeres DMF, Vojinovic V, Cabral JMS, Fonseca LP. 2003.** How Enzymes Adapt: Lessons from Directed Evolutions. *Trends Biochem Sci* 26: 100-106.
- Ballare C, Caldwell M, Flint S, Robinson S, Bornman J. 2011.** Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms, and interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci* 10: 226–241.
- Banci L. 1997.** Structural properties of peroxidase. *J Biotechnol* 53: 253-263.
- Bansal N, Kanwar SS. 2013.** Peroxidase(s) in Environment Protection. *Scientific World Journal*. 2013: 714639. doi: 10. 1155/2013/714639.
- Bellani LM, Guarnieri M, Scialabba A. 2002.** Differences in the activity and distribution of peroxidases from three different portions of germinating *Brassica oleracea* seeds. *Physiol Plant* 114: 102-108.
- Bolscher BGJM, Plat H, Wever R. 1984.** Some properties of human eosinophil peroxidase, a comparison with other peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 784: 177-186.
- Boyer N, Desbiez MO, Hofinger M, Caspar T. 1983.** Effect of lithium on thigmomorphogenesis in bryoniadioica ethylene production and sensitivity. *Plant Physiol*. 72: 522-525.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254.
- Caldwell M, Robberecht R, Nowak R. 1982.** Differential photosynthetic inhibition by ultraviolet radiation in species from the arctic-alpine zone. *Arctic and Alpine Research* 14: 195-202.
- Campa A. 1991.** Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. In: *Peroxidases in Chemistry and Biology*. (Eds.: Everse J, Everse KE, Grisham MB). CRC Press, Boca Raton. pp. 25-50.
- Gaspar TH, Penel CL, Thorpe T, Greppin H. 1982.** Physiological processes mediated by peroxidases. In: *Peroxidases 1970-1980. A survey of their*

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

biochemical and physiological roles in hisher plants. Université de Genève- Centre de Botanique. Genève. pp. 89-122.

Carey F. 2000. Organic chemistry. 4th Ed. Mc Graw Hill. Boston.

Chance B. 1949. The enzyme-substrate compounds of horseradish peroxidase and peroxides. 2. Kinetics of formation and decomposition of the primary and secondary complexes. Arch Biochem 22 (2): 224-252.

Christensen JH, Overney S, Rohde A, Diaz WA, Bauw G, Simon P, Van Montagu M, Boerjan W. 2001. The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem: cDNA isolation, characterization and expression. Plant Mol Biol 47: 581-593.

Cleland, W.W.1970. The enzymes. Vol. II. 3rd Ed. Boyer, P.D., ed Academic. New York.

Chiou CC, Chang EC, Wu TL, Tsao KC, Wu JT. 2003. Urinary 8-hydroxydeoxyguano sine analits analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. Clin Chim Acta 334: 87-94.

Colonna S, Gaggero N, Richelmi C, Pasta P. 1999. Recent biotechnological developments in the use of peroxidase. Trends Biotechnol 17 (4): 163168.

Cosgrove DJ. 2001. Wall structure and wall loosening. A look backwards and peanut forwards. Plant Physiol 125: 131-134.

Cosio C, Dunand C. 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. J Exp Bot 60: 391-408.

Crevecoeur M, Pinedo M, Greppin H, Penel C. 1997. Peroxidase activity in shoot apical meristem from Spinacia. Acta Histochem 99 (2): 177-186.

Dalton DA. 1991. Ascorbate peroxidase. In: Peroxidases in Chemistry and Biology. (Eds: Everse, J., Everse, K.E. y Grisham, M.B.). CRC Press, Boca Raton. pp. 139-153.

Damhus T, Kirk O, Pedersen G, García VM. 1991. Dye Transfer Inhibition. Patent PCT/DK1990/000261.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- de Souza S, Forgiarini E, de Souza AAU. 2007.** Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *J Hazard Mater* 147: 1073-1078.
- Dehon L, Macheix JJ, Durand M. 2002.** Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra*. *J Exp Bot* 53 (367): 303-311.
- Douroupi T, Margaritis LH. 1998.** Ultrastructural localization of peroxidase activity in *Urtica dioica*. Electron microscopy von Institute of Physics Pub, Bristol. International Congress 14th, Electron microscopy. Cancun. Mexico. 4: 731-732.
- Erecinska M, Oshino N, Loh P, Brocklehurst E. 1973.** *In vitro* studies on yeast cytochrome c peroxidase and its posible function in the electron transfer and energy coupling reactions. *Biochim Biophys Acta* 292: 1-12.
- Fry SC. 2004.** Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: Intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking. *Phytochem Rev* 3: 97-111.
- Grambow HJ, Langenbeck-Schwich B. 1983.** The relationship between oxidase activity, peroxidase activity, hydrogen peroxidase, and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid *in vitro*. *Planta* 157: 131-137.
- Gray JSS, Yang BY, Hull SR, Venzke DP, Montgomery R. 1996.** The glycans of soybean peroxidase. *Glycobiology* 6: 23-32.
- Hames BD. 1998.** Gel electrophoresis of proteins. A practical approach.
- Hamid M, Khalil uv R. 2009.** Potential applications of peroxidases. *Food Chem* 115: 1177-1186.
- Hatakka A. 1994.** Lignin-modifying enzymes from selected White-rot fungi - Production and role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett* 195: 242-246.
- Hazell P, Murray DR. 1982.** Peroxidase isoenzymes and leaf senescence in sunflower, *Helianthus-annuus* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 108: 87-92.
- Helenius A, Aebi M. 2001.** Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291: 5512-2364.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Herman J. 2010.** Global increase in UV irradiance during the past 30 years (1979–2008) estimated from satellite data. *J Geophys Res* 115. D04203, doi:10.1029/2009JD012219.
- Herrmann KM. 1995.** The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.
- Herzog H, Fahimi HD. 1973.** A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3,3'-diaminobenzidine as hydrogen donor. *Anal Biochem* 55 (2): 554-562.
- Higara S, Sasaki K, Ito H, Ohashi, Matsui H. 2001.** A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol* 42: 462-468.
- Higara S, Yamamoto K, Ito H, Sasaki K, Matsui H, Honma M, Nagamura Y, Sasaki T, Ohashi Y. 2000.** Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase gene. *FEBS Lett* 471: 245-250.
- Hoyle M.C. 1977.** High resolution of peroxidase, indoleacetic acid oxidase isoenzymes from horseradish by isoelectric focusing. *Plant Physiol* 60:787-793.
- Hung SH, Yu CW, Lin CH. 2005.** Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot Bull Acad Sin* 46: 1-10.
- Ikegawa T, Mayama S, Nakayashiki H, Kato H. 1996.** Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* and its role in the resistance of oat tissues to cell wall degrading enzymes. *Physiol Mol Plant Pathol* 48: 245- 255.
- Iwahara K, Hirata M, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M. 2000.** Free- Radical Polymerization of Acrylamide by Manganese Peroxidase Produced by the White- Rot Basidiomycete *Bjerkandera adusta*. *Biotechnol Lett* 22:1355- 1361
- Jiang Y, Joyce DC. 2003.** ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Reg* 39: 171-174.
- Jimenez E. 1993.** Utilización de la Enzima Lipoxigenasa y Peroxidasa como Índice en el Blanqueo de Espárragos verdes (*Asparagus officinalis* L.). Tesis para optar al título de Ingeniero en Industria Alimentarias. Universidad Nacional Agraria. La Molina. Lima. Perú.
- Jouili H, Bouazizi H, El Ferjani E. 2011.** Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress. *Acta Physiol Plant* 33: 2075-2082.

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Kamal J, Amisha K, Digambar B. 2008.** Kinetic stabilities of soybean and horseradish peroxidases. *Biochem Eng J* 38: 110-114.
- Kim YH, An ES, Song BK, Kim, DS, Chelikani R. 2003.** Polymerization of cardanol using soybean peroxidase and its potential application as anti-biofilm coating material. *Biotechnol Lett* 25 (18): 1521-1524.
- Kimura S, Ikeda-Saito M. 1988.** Human myeloperoxidase and thyroid peroxidase, two enzymes with separate and distinct physiological functions, are evolutionarily related members of the same gene family. *Proteins* 3: 133-120.
- Kondo R, Harazono K, Sakai K. 1994.** Bleaching of Hardwood Kraft Pulp with Manganese Peroxidase Secreted from *Phanerochaete sordida* YK- 624. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4359- 4363.
- Kranz R, Richard-Fogal C, Taylor JS, Frawley ER. 2009.** Cytochrome c biogenesis: mechanisms for covalent modifications and trafficking of heme and for heme-iron redox control. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 510-528.
- Kristensen BK, Bloch H, Rasmussen SK. 1999.** Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning and induction by pathogens. *Plant Physiol* 120: 501-512.
- Klotz LK, Liu YTT, Liu L, Lagrimini ML. 1998.** Expression of the tobacco anionic peroxidase genes is tissue-specific and developmentally regulated. *Plant Mol Biol* 36: 509-520.
- Kubitzki K. 1987.** Phenylpropanoid metabolism in land plant evolution *J Plant Physiol* 131: 17-24.
- Kumar MS, Chaudhury S, Balachandran S. 2014.** In vitro callus culture of *Heliotropium indicum* Linn. for assessment of total phenolic and flavonoid content and antioxidant activity. *Appl Biochem Biotechnol* 174 (8): 2897-909.
- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lagrimini LM. 1991.** Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiol* 96: 577-583.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Lehtonen MT, Akita M, Kalkkinen N, Ahola-Iivarinen E, Rönholm G, Somervuo P, Thelander M, Valkonen JP. 2009.** Quickly-released peroxidase of moss in defense against fungal invaders. *New Phytol* 183: 432-43.
- Leonard JJ, Yonetani, J. 1974.** Interaction of cytochrome c peroxidase with cytochrome c. *Biochem* 13 (7): 1465-1468.
- Li HY, Poulos TL. 1994.** Structural variation in heme enzymes: A comparative analysis of peroxidase and P450 crystal structures. *Structure* 2: 461-464.
- Liszkay A, Van der Zalm E, Schopfer P. 2004.** Production of reactive oxygen intermediates (O_2^- , H_2O_2 , and OH^\cdot) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol* 136: 3114-3123.
- Liu YH, Offler CE, Ruan YL. 2014.** A simple, rapid, and reliable protocol to localize hydrogen peroxide in large plant organs by DAB-mediated tissue printing. *Frontiers in Plant Science* 745 (5): 1-6.
- Liu L, Eriksson LKE, Dean FDJ. 1999.** Localization of hydrogen peroxide production in *Zinnia elegans* L. stems. *Phytochem* 52: 545-554.
- Lowry, OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Lüthje S, Meisrimler CN, Hopff D, Möller B. 2011.** Phylogeny, topology, structure and functions of membrane-bound class III peroxidases in vascular plants. *Phytochem* 72:1124-35.
- Mäder M. 1992.** Compartmentation of peroxidase isoenzymes in plant cells. *En C. Penel, T. Gaspar, H. Greppin, eds, Plant Peroxidases 1980-1990, Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical and Physiological Aspects. Université de Genève.* pp. 37-46.
- Marín M, Kokp V, Duletic'-Laušević'S, Marin PD, Rančić' D, Dajic-Stevanovic. 2006.** Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and histochemistry. *South Afr J Bot* 72: 378-382.
- Marjamaa K, Kukkola EM, Fagerstedt KV. 2009.** The role of xylem class III peroxidases in lignification. *J Exp Bot* 60: 367-376.
- Marques G, Gamelas JAF, Ruiz- Dueñas FJ, del Río JC, Evtuguin DV, Martínez AT, Gutiérrez A. 2010.** Delignification of Eucalypt Kraft Pulp with

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Manganese- Substituted Polyoxometalate Assisted by Fungal Versatile Peroxidase. *Bioresource Technology* 101: 5935- 5940.

May SW. 1999. Applications of Oxidoreductases. *Curr Opin Biotechnol* 10: 370-375.

McMannus MT, Ashford DA. 1997. Glycosylation of plant peroxidases. *Plant Perox Newslett* 10: 15-23.

Merlie JP, Fagan D, Mudd J, Needleman P. 1988. Isolation characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J Biol Chem* 263 (8): 3550-3553.

Miesli TJ, Protor A, Lagrimina LM. 1991. Peroxidase Activity, Isoenzymes, and Tissue Localization in Developing Highbush Blueberry Fruit. *J. AMER. Soc. HORT. SCI* 116 (5):827-830.

Moreira M, Feijoo G, Canaval J, Lema J. 2003. Semipilot- Scale Bleaching of Kraft Pulp with Manganese Peroxide. *Wood Sci Technol* 37: 117- 123.

Mullineaux P, Ball L, Escobar C, Karpinska B, Creissen G, Karpinski S. 2000. Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of Arabidopsis antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy?. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355 (1402): 1531-1540.

Nawkar G, Maibam P, Park J), Sahi V, Lee S, Kang C. 2013. UV-Induced cell death in plants. *Int J Mol Sci* 14: 1608-28.

Ngo TT. 2010. Peroxidase in chemical and biochemical analysis 43: 1572-1587.

Normanly J, Slovin JP, Cohen JD. 1995. Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant Physiol* 107: 323-329.

Ong ST, Keng PS, Lee WN, Ha ST, Hung YT. 2011. Dye Waste Treatment 3: 157-176.

Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss knife army. *Plant Cell Rep* 24: 255-265.

Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C. 2004. The plant peroxidase multigenic family in rice and its evolution in green plants. *Phytochem* 65: 1879-1893.

Passardi F, Theiler G, Zamocky M, Cosio C, Rouhier N, Teixeira F, Margis-Pinheiro M, Ioannidis V, Penel C, Falquet L, Dunand C. 2007. PeroxiBase: The peroxidase database. *Phytochem* 68: 1605-1611.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Pedreño MA, Bernal MA, Calderón AA, Ferrer MA, López-Serrano M, Merino de Cáceres F, Muñoz R, Ros Barceló A. 1993.** A general pattern for peroxidase isoenzyme localization and function in *Vitaceae*, *Solanaceae* y *Leguminosae*. Plant Peroxidases: Biochem Physiol. Ed. KJ Welinder, SK Rasmussen, C Penel y H Greppin, Universidad de Ginebra, Ginebra. 307-314.
- Paul KG, Stigbrand T. 1970.** Four isoperoxidases from horseradish root. Acta Chem Scand 24: 3607-3617.
- Picot D, Loll PJ, Gaavito M. 1994.** The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase-1. Nature 367: 243-249.
- Pomar F, Novo M, Bernal MA, Merino F, Barceló AR. 2004.** Changes in stem lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related with the maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*. New Phytologist 163: 111-123.
- Poulos TL, Kraut J. 1980.** The stereochemistry of peroxidase catalysis. J Biol Chem 255: 8199-8205.
- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Ros Barceló A, Amaanda I, Medina MI, Alonso FJ, de Forchetti SM, Tigier H, Valpuesta V. 2000.** A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. Plant Physiol 122: 1119-1127.
- Regalado C, García-Almendárez BE, Duarte-Vázquez MA. 2004.** Biotechnological Applications of Peroxidases. Phytochem Rev 3: 243-256.
- Ros Barceló A. 1998.** Hydrogen Peroxide Production is a General Property of the Lignifying Xylem from Vascular Plants. Annals of Botany 82 (1): 97-103.
- Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Esteban-Carrasco A. 2007.** Looking for syringyl peroxidases. Trends Plant Sci 12: 486-491.
- Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Carrión JS, Pedreño MA. 2004.** Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution? Phytochem Rev 3: 61-78.
- Ros Barceló A, Morales M, Pedreño MA. 1997.** In: Lewis NG and Sarkanen S, (eds). Specific compartmentalization of peroxidase isoenzymes in relation to lignin

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

biosynthesis in the plant cell. Lignin and Lignan Biosynthesis. ACS Symposium Series, ACS, Washington 697: 84-95.

Ros Barceló A, Muñoz R. 1989. Epigenetic control of a cell wall scopoletin peroxidase by lupisoflavone in *Lupinus*. *Phytochem* 28: 1331-1333.

Ros Barceló A, Muñoz R, Sabater F. 1987. Lupin peroxidases. I. Isolation and characterization of cell wall bound isoperoxidase activity. *Physiol Plant* 71: 448-454.

Rozema J, van de Staaij J, Björn LO, Caldwell M. 1997. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends Ecol Evol* 12(1): 22-28

Ruzgas T, C Scöregi E, Emnèus J, Gorton L, Marko-Vargas G. 1996. Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. *Analytica chimica Acta* 330: 123-138

Ryan JB, Ó'Fágáin C. 2007. Arginine-to-lysine substitutions influence recombinant horseradish peroxidase stability and immobilisation effectiveness. *BMC Biotechnol* 5;7: 86.

Santiago, R., Fontaniella, B., Vicente, C. 2009. Guion de prácticas de la asignatura Fisiopatología Vegetal. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3). pp. 146-166.

<<http://darwin.bio.ucm.es/revistas/index.php/reducabiologia/article/viewFile/27/70>>. (Consultado 07/01/2010).

Santos-Gomes PC, Seabra RM, Andrade PB, Fernandes-Ferreira M. 2003. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *J Plant Physiol* 160 (9): 1025-32.

Schmidt- Hebbel H, Pennacchiotti I. 1982. Las enzimas en los alimentos. Editado por Fundación Chile Santiago. Chile.

Schmidt HH, Pennacchiotti MI. 2001. Las enzimas en los alimentos. Su importancia en la química y la tecnología de los alimentos. Universidad de Chile. Santiago, Chile. <<http://www.repositorio.uchile.cl/handle/2250/121426>>. Consultado: 15/03/2015.

Schloss P, Walter C, Mader M. 1987. Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 170: 225-229.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Shannon LM, Kay E, Lew JY. 1966.** Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. Biol Chem 241 (9): 2166-2172.
- Sharrock RA, Quail PH. 1989.** Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. Genes Dev 3:1745-1757.
- Shigeto J, Tsutsumi Y. 2016.** Diverse functions and reactions of class III peroxidases. New Phytol 209 (4): 1395-402.
- Shin H, Guebitz G, Cavaco- Paulo A. 2001.** "In situ" Enzymatically Prepared Polymers for Wool Coloration. Macromolecular Materials and Engineering 286: 691- 694.
- Singh A, Ma D, Kaplan DL. 2000.** Enzyme- Mediated Free Radical Polymerization of Styrene. Biomacromolecules 1: 592- 596.
- Sottomayor M, Lopez- Serrano, M, DiCosmo F, Barcelo AR. 1998.** Purification and characterization of alpha-3',4'-anhydrovinblastine synthase (peroxidase-like) from *Catharanthus roseus* (L). G Don 428: 299-303.
- Spoel SH, Mou ZL, Tada Y, Spivey NW, Genschik P, Dong XNA. 2009.** Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. Cell 137: 860-872.
- Stafford H. 1991.** Flavonoids evolution: an enzymic approach Plant Physiol 96: 680-685.
- Stoscheck CM. 1990.** Quantitation of proteína. Methods Enzymol 182: 50-68.
- Sundaramoorthy M, Kishi K, Gold MH, Poulos TL. 1994.** The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution. J Biol Chem 269: 32759-32767.
- Theorell H. 1942.** The preparation and some properties of crystalline horseradish peroxidase. Ark Kemi Min o Geol 16A. No. 2:1-11.
- Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P. 2002.** Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. Gene 288: 129-138.
- Tohge T, Watanabe M, Hoefgen R, Fernie A. 2013.** The evolution of phenylpropanoid metabolism in the green lineage. Crit Rev Biochem Mol Biol 48 (2): 123-52.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

- Veitch NC. 2004.** Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochem Rev* 3: 3-18.
- Warrishi H, Gold MH. 1990.** Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *J Biol Chem* 265: 2070-2077.
- Watanabe L, Moura PR, Bleicher L, Nascimento AS, Zamorano LS, Calvete JJ, Sanz L, Perez A, Bursakov S, Roig MG, Shnyrov VL, Polikarpov I. 2010.** Crystal structure and statistical coupling analysis of highly glycosylated peroxidase from royal palm tree (*Roystonea regia*). *J Struct Biol* 169: 226-242.
- Welinder KG, Gajhede M. 1993.** Structure and evolution of peroxidases. In: *Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology*. (Eds: Greppin, H., Rasmussen, S.K., Welinder, K.G. y Penel, C.). University of Copenhagen and University of Geneva. Geneve, pp. 35-42.
- Welinder KG. 1991.** Bacterial catalase-peroxidases are gene duplicated members of the plant peroxidase superfamily. *Biochim Biophys Acta* 1080: 215-220.
- Welinder KG. 1992.** Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol* 2: 388-393.
- Welinder KG, Justesen AF, Kjærsgård IVH, Jensen RB, Rasmussen SK, Jespersen HM, Duroux L. 2002.** Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 269: 6063-6081.
- Whitaker J. 1972.** Principles of enzymology for the Food Sciences. Vol. II. Editorial Marcel Dekker. New York.
- Wilson IBH. 2002.** Glycosilation of proteins in plants and invertebrates. *Curr Opin Struc Biol* 12: 569-577.
- Yang BY, Gray JSS, Montgomery R. 1996.** The glycans of horseradish peroxidase. *Carbohydrate Res* 287: 203-212.
- Yao X, Liu Q. 2006.** Responses of enzymes in terrestrial plants to enhanced UV-B radiation *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* 17 (5): 939-942.
- Zambrano J, Maffei M, Valera A, Materano W, Quintero I. 2011.** Optimizacion de las condiciones de almacenamiento sobre el contenido de ácido ascórbico en brócoli. *Rev Fac Agron* 28 (1): 661-669.

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

Zeng J, Fenna RE. 1992. X-ray cristal structure of canine myeloperoxidas at 3Å resolution. J Mol Biol 226 (1): 185-207.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

CONCLUSIONES

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

CONCLUSIONES

Una vez completado el estudio de micropropagación de plantas y callos de *Nepeta teydea*, el estudio anatómico de los diferentes tipos de plantas (pC, pIV, pA) de *Nepeta teydea*, y bajo diferentes condiciones de luz (pA y pA-UV) y, por último, el estudio bioquímico de las peroxidasas de esta especie vegetal sometidas a diferentes condiciones de luz, la discusión de los resultados ha permitido llegar a las siguientes conclusiones.

1. El método más efectivo para la esterilización de las semillas de *Nepeta teydea* fue el hipoclorito cálcico, al permitir un porcentaje de contaminación de las semillas menor con respecto a los otros agentes desinfectantes empleados en este trabajo.
2. Tanto la escarificación química como los tratamientos de incubación en condiciones de oscuridad, tienen un efecto negativo sobre la germinación de las semillas de *Nepeta teydea*. Se señala la aplicación de un pre-tratamiento con ácido giberélico (3mg/ml) de las semillas, como causa del éxito de la activación de la germinación de las semillas.
3. Se establece el medio ½ MS como el más adecuado para el cultivo de *Nepeta teydea* en las diferentes fases del protocolo de micropropagación.
4. Se ha observado que la adición de hormona al medio de cultivo, durante la fase de multiplicación, incrementa las tasas de multiplicación en *Nepeta teydea*. Además, la adición controlada de los reguladores de crecimiento al medio de cultivo en la fase de multiplicación evitó el desarrollo de microesquejes con malformaciones y anomalías foliares.
5. La utilización de bandejas de semilleros, el empleo de un sustrato a base de turba/perlita (2:1), condiciones controladas de luz y temperatura, y una reducción gradual de la humedad relativa, permitió el paso a tierra y el proceso de aclimatación de las plantas de *Nepeta teydea* enraizadas *in vitro* espontáneamente.
6. Se describe para plantas de *Nepeta teydea*, en condiciones de cultivo en el medio natural, una serie de características escleromórficas y xeromórficas en sus hojas y tallos; abundancias de tricomas tanto no glandulares como glandulares, presencia de paredes anticlinales onduladas, mayor densidad estomática en la superficie abaxial, mayor desarrollo del tejido colenquimático, el esclerénquima y la médula central.
7. Las hojas y tallos de las pIV de esta especie vegetal, mostraron modificaciones estructurales atribuibles a las condiciones especiales de crecimiento; presentando

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

menor desarrollo del parénquima en empalizada, del esclerénquima y colénquima, un aumento del diámetro de los vasos del xilema y una reducción del número de haces (en el caso de las hojas), y una médula central muy reducida.

8. En cuanto a las pA, se describe una adaptación de éstas a las nuevas condiciones de invernadero- laboratorio; con un mayor desarrollo del mesófilo con respecto a las pIV, mayor desarrollo de la médula central, y a nivel del sistema radicular, no se aprecian diferencias con respecto a las pC. Estas modificaciones descritas, resultaron suficientes para la supervivencia de las plantas en condiciones naturales.
9. Respecto a las pA-UV, el efecto de la luz UV-b, condujo a una serie de alteraciones en la estructura de las plantas que se detectó únicamente a nivel de la hoja. Las hojas anfiestomáticas de *Nepeta teydea*, tras el tratamiento con luz UV-b se convirtieron en hojas hipostomáticas, y dentro del mesófilo, concretamente en el parénquima en empalizada, se apreció un desplazamiento de los cloroplastos. Además, se observó la presencia de un nuevo tipo de tricomas, los tricomas glandulares capitados de cabeza globosa bicelular y cuello unicelular. Todas estas alteraciones tienen como fin la protección de la planta frente al exceso de luz, pero finalmente resultan insuficientes para la supervivencia de las plantas sometidas al tratamiento con luz UV-b.
10. *Nepeta teydea* presenta en hojas y en los tejidos formados mediante cultivo “in vitro” una actividad de peroxidasa que ha sido caracterizada cinéticamente para diferentes sustratos.
11. La luz UV-b induce cambios en el metabolismo de hojas de *N. teydea* y más manifiestamente en los callos obtenidos a partir de esta planta, que se correlaciona con un incremento en la actividad de la actividad peroxidasa.
12. Los callos de *N. teydea* inducidos por ANA respecto a los inducidos por 2,4-D muestran mayores niveles de la actividad peroxidasa que en el caso de ANA y que provisionalmente parecen afectar al valor de K_M y no parecen afectar a la distribución de isoenzimas determinadas mediante PAGE.
13. *Nepeta teydea* se presenta como un modelo apto para el estudio de los procesos inducidos en las plantas por exposición a luz UV proponiéndolo, por tanto, como adecuado para el estudio en campo de los cambios ambientales que induce un incremento en la radiación UV. Y los callos de esta especie responden igualmente

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por:	Fecha:
NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34

a luz UV-b y UV-a, proponiéndolo, igualmente, como un adecuado modelo experimental para el estudio en el laboratorio de estos procesos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 965383

Código de verificación: Gox5F7nX

Firmado por: NIZA MAR ESCUELA IZQUIERDO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 27/06/2017 09:46:14
JUAN IGNACIO FRIAS VIERA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	28/06/2017 19:33:58
FRANCISCO JAVIER VALDES GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	29/06/2017 09:05:47
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	18/07/2017 14:28:34