



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

# Estudio de la respuesta a estrés salino en *Paulownia sp.* cultivada *in vitro*

Marc Prieto Gornals

**Grau de Bioquímica**

Any acadèmic 2015-16

Treball tutelat per Dr María José Clemente Moreno  
Departament de Biologia

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
	X	X	

Paraules clau del treball:

*Paulownia*, cultivo *in vitro*, propagación, salinidad



## ÍNDICE

	<b>pág.</b>
<b>1.</b> Introducción.....	<b>4</b>
<b>2.</b> Material y métodos.....	<b>14</b>
<b>3.</b> Resultados y discusión.....	<b>19</b>
<b>4.</b> Conclusiones.....	<b>29</b>
<b>5.</b> Bibliografía.....	<b>30</b>

## Introducción

### *Características del cultivo y su importancia*

*Paulownia* es un árbol del grupo de las dicotiledóneas, orden *Lamniae* de la familia *Paulowniaceae*, según el sistema de clasificación APG III (Angiosperm Phylogeny Group) correspondiente a la última versión del sistema para la clasificación de las angiospermas de acuerdo a criterios filogenéticos (Bremer et al. 2009). Tiene 7 especies aceptadas de las 26 descritas y todas son originarias de China aunque *P. fortunei* se extiende desde China hasta Vietnam y Laos, y *P. tomentosa* también se extiende a Corea y Japón (Zhu et al. 1986).

En los últimos años se ha convertido en un cultivo en auge al ser un árbol de crecimiento rápido y buena madera, que crece en un rango amplio de condiciones ambientales, siendo acogido en muchas partes del mundo entre ellas Europa. Inicialmente se introdujo solo como árbol ornamental, pero las propiedades físicas de su madera, su rápido crecimiento y su capacidad de biorremediación de suelos contaminados (Macci et al. 2012, Wang et al. 2011), han hecho que su cultivo se extienda a gran escala. Debemos señalar que su cultivo, en los últimos años, se ha utilizado en muchos casos para la biorremediación (Doumet et al. 2008, Tzvetkova et al. 2015, Wang et al. 2011), al ser un árbol tolerante a los metales pesados que presenta un rápido crecimiento y una elevada productividad de biomasa, lo que conduce a una disminución de la concentración de metales pesados del suelo, a pesar de presentar una baja tasa de absorción del metal en comparación con los cultivos de plantas herbáceas endémicas de suelos metalíferos (Doumet et al. 2008, Robinson et al. 2000).

Estos árboles de crecimiento rápido también son destinados a producir madera como fuente de energía ecológica en forma de astillas o *pellets*. Este árbol puede producir mayor cantidad de biomasa por año que otras especies si se utiliza como cultivo leñoso de corta rotación (Kalaycioglu et al. 2005). El árbol se puede cosechar a los 15 años después de la plantación, produciendo hasta 50 t por Ha y año, productividad que se encuentra entre las más altas reportadas, lo que permitirá un mayor valor añadido. Además existe un aumento en la demanda de biomasa a nivel Europeo, ya que se espera un incremento del 50%, respecto a la demanda de

2010, en el año 2020 (Sikkema et al. 2011). Por otra parte la Directiva Europea 2009/28/CE establece que para el año 2020 al menos el 20% del consumo de energía primaria deberá proceder de fuentes renovables, por ello es esperable un importante desarrollo del sector de la producción de biomasa (Hernández et al. 2008).

Un árbol de *Paulownia* de 10 años, bajo condiciones normales, sin estrés, puede llegar a medir en el tronco entre 30 – 40 cm de diámetro y llegar a producir un volumen total de madera de entre 0,3 y 0,5 m<sup>3</sup>. Al ser de crecimiento rápido, también tiene un gran potencial económico maderero si se compara con otros tipos de cultivos como son las plantaciones de chopos y plátanos, árboles con crecimientos en torno a los 18 años o respecto a otras especies destinadas a producir madera de calidad (nogal, cerezo, fresno, roble, falso plátano), con ciclos situados entre de 50 a 80 años (Yadav et al. 2013).

#### *Fisiología y crecimiento*

*Paulownia* es un árbol de enraizamiento profundo, las raíces superiores son finas y crecen de forma ramificada muy densa. Las raíces adventicias son largas y normalmente son de entre 1–5 mm de grosor y se pueden extender a más de 60 cm. El desarrollo y la distribución del sistema radicular están muy influenciados por el tipo y características del terreno, el nivel del agua y las características físicas y nutritivas del terreno (Zhu et al. 1986).

*Paulownia* crece sobre variados tipos de suelos, desde ricos en humus, suelos pobres y secos, y hasta en suelos arcillosos y/o arenosos. Tolera suelos con pH comprendidos entre 5 y 8,5 ya que este árbol tiene la habilidad de seleccionar la absorción de calcio y magnesio del suelo (Zhu et al. 1986). En este sentido debemos indicar que los suelos del sur de la isla de Mallorca son básicos con un pH situado entre 7,8 y 8,2. *Paulownia* puede tolerar un alto rango de temperaturas, situadas entre -15 °C y 40 °C, siendo la temperatura óptima para su crecimiento entre 24–29 °C. Por lo que hace referencia al requerimiento hídrico soporta bien entre 500 y 1.500 mm de lluvia por m<sup>2</sup> anual (en Mallorca está situada en unos 350 mm/m<sup>2</sup> en la zona sur y 1500 mm/m<sup>2</sup> en la sierra de Tramuntana), lluvia que le permite un buen crecimiento sin riego artificial (Zhu et al. 1986). Pero es necesario que la mayor parte de esta lluvia se produzca durante los meses de su mayor crecimiento situados entre Mayo y Septiembre. En España este periodo de crecimiento coincide con los meses de menor precipitación, pero no llega a ser un problema al ser resistente al estrés hídrico, situándose esta capacidad de resistencia entre 3 y 9 meses de sequía (Zuazo et al. 2013).

Sus ramas y flores de son ricas en nitrógeno y son buenas tanto como fertilizante del suelo como forraje para los animales. El crecimiento de la corona se produce por la acumulación y la continua producción de ramas cada año. Normalmente crece un metro cada año después de la plantación (Zhu et al. 1986). *Paulownia* se propaga normalmente mediante la siembra directa de semillas y la plantación de tallos de raíz de la planta madre (San Miguel 1985). La propagación *in vitro* se realiza mediante brotes axilares y adventicios y es la mejor técnica para producir plántulas clonales de los híbridos existentes.

#### *Cultivo en clima mediterráneo y adaptación a la salinidad*

La introducción de *Paulownia* en España fue hace unos cuarenta años como árbol ornamental. El primer estudio de *Paulownia* en España fue realizado en 1985 por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) donde se estudió la producción de plántulas y su crecimiento (San Miguel 1985). Pero su explotación comercial es más reciente y está siendo un éxito. Esta fama que le precede hace que algunas comunidades autónomas (Aragón, Andalucía, Extremadura, Murcia,...) subvencionen la forestación con *Paulownia* a través del Fondo Europeo Agrícola de Garantía (FEAGA).

Las investigaciones sobre su capacidad de adaptación al clima mediterráneo es limitada y actualmente hay escasos datos disponibles (Zuazo et al. 2013). Tampoco ha sido totalmente estudiada su capacidad de crecimiento y cultivo en áreas y tierras marginales. *Paulownia* podría acortar significativamente el tiempo necesario para obtener beneficios a largo plazo de biomasa energética en ambientes mediterráneos.

En Mallorca la actividad agrícola ha descendido en los últimos 50 años y los acuíferos que se utilizaban para riego se utilizan actualmente para actividades del sector terciario, por ello uno de los problemas agrícolas que nos afectan es la salinización de los suelos. A lo largo del litoral de la isla de Mallorca, existen numerosos acuíferos que se están salinizando por este gran uso de agua que se realiza para su consumo humano (el 80% del agua de consumo proviene tradicionalmente de aguas subterráneas). Este elevado consumo produce, en muchos casos, la intrusión del agua de mar. Un ejemplo de ello es la salinización producida en el sur de Mallorca. Si bien cabe destacar que esta salinización es variable (depende de la pluviosidad y del uso humano de la misma), se ha mantenido estable durante los últimos años e incluso en algunos casos ha descendido (López-García et al. 2003). En el sur de Mallorca existen muchas catas donde las concentraciones salinas se mantienen alrededor de 1.000 mg/L como en la zona de

Ses Salines, en otros puntos como en la zona entre Campos y Felanitx hay una pequeña tendencia ascendente, debido a su sobreexplotación, produciéndose concentraciones cercanas a los 1.500 mg/L. También en la zona comprendida entre Santanyí y Campos se encuentran valores que van desde los 800 hasta los 2.500 mg/L (Instituto Geológico y Minero de España, 2004), es decir concentraciones de una posible agua de riego situadas entre 12-80 mM de NaCl.

La salinidad es una característica del suelo que la podemos determinar por su elevada concentración de sales solubles. Esta salinidad la podemos medir en concentración (c) de sales disueltas por litro de agua del suelo (g/L) o mediante medidas de conductividad ( $\sigma$ ) a 25°C expresada en deciSiemens por metro (dS/m). Los suelos se clasifican como salinos los que presenta aproximadamente una salinidad de 40 mM de NaCl, salinidad que reduce significativamente el rendimiento en la mayoría de los cultivos. El riego con determinados tipos de aguas, más o menos salinas, puede llegar a comportar la salinización del suelo con la consecuente pérdida de fertilidad, lo que perjudica o imposibilita determinados tipos de cultivos. Estos suelos se podrían utilizar para el cultivo de plantas que toleren mejor la salinidad y permitan la lixiviación de las sales por fenómenos naturales y la acumulación en las mismas plantas.

Siempre debemos considerar que la principal causa de la salinización de un suelo es un mayor aporte de sales que su descarga o utilización; y como hemos indicado antes, normalmente es el agua con sus sales disueltas la que las aporta. Pero también existen suelos salinos naturales que se encuentran en las costas marítimas donde los terrenos son afectados por gotículas de agua salina que el viento traslada tierra adentro junto con el flujo subterráneo del mar que penetra en los acuíferos como hemos comentado anteriormente.

#### *Tolerancia y estrés salino*

La tolerancia a la salinidad corresponde a la capacidad de una planta para soportar la salinidad del suelo sin experimentar grandes efectos perjudiciales en su desarrollo y/o producción. En una revisión Ashraf et al. (2007) enumeraron los siguientes efectos adversos de la salinidad en las plantas: a) un efecto iónico, b) un efecto osmótico, c) un desequilibrio de nutrientes, d) un desequilibrio hormonal y e) un exceso de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por ello las plantas tolerantes a la salinidad deben ofrecer diversas estrategias para tolerar los distintos aspectos adversos que esta produce (Carillo et al. 2011).

El efecto iónico lo debemos considerar a partir de que el NaCl es la sal más soluble y mayoritaria, por ello no es extraño que las plantas presenten mecanismos que permitan regular su acumulación, seleccionando aquellos mecanismos que favorezcan la entrada de otros iones presentes en bajas concentraciones, tales como  $K^+$  y  $NO_3^-$  y dificultando la acumulación de NaCl. En la mayoría de plantas, los iones  $Na^+$  y  $Cl^-$  se excluyen de manera efectiva por parte de las raíces en el momento de captar el agua del suelo. Las plantas halófilas son capaces de mantener esta exclusión a salinidades más elevadas que las plantas glicofitas, que toleran sólo bajas concentraciones salinas en el suelo.

En cuanto al efecto hídrico las plantas también han desarrollado mecanismos de respuesta para tolerar un bajo potencial hídrico del suelo y un bajo flujo del agua entre zonas por ósmosis, gravedad, presión mecánica o tensión superficial, causado tanto por la salinidad del suelo como por la sequía, por lo que esta tolerancia es una característica más o menos desarrollada la mayoría de plantas glicofitas y halófilas. Los mecanismos que presentan son variados, por ejemplo se puede ajustar la presión osmótica intracelular mediante la síntesis de sustancias compatibles como prolina, glicina-betaína o azúcares (Ashraf et al. 2007). Otra estrategia es la acumulación de sales dentro de sus vacuolas intracelulares, controlando de esta forma la concentración de sales en el citosol y manteniendo en el citoplasma de las células una relación  $K^+/Na^+$  elevada. Estos mecanismos descritos corresponden a la regulación de la homeostasis iónica y osmótica (Munns et al. 2008).

El estrés salino, además de los problemas iónicos y osmóticos expuestos, y al igual que otros tipos de estrés abiótico, conduce al estrés oxidativo a través de un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). La producción de ROS es omnipresente durante el metabolismo de las plantas al ser el oxígeno ( $O_2$ ) esencial para la vida y, por ello, todas las plantas deben hacer frente a las ROS. Sin embargo, si la producción de ROS se hace significativamente elevada puede producir daño celular, entre otras causas, al interferir una variedad de procesos metabólicos en la planta (Foyer et al. 2003, Temple et al. 2005).

Las ROS son generalmente radicales libres que corresponden a átomos o grupos de átomos que tienen al menos un electrón no apareado. Esta es una configuración electrónica muy inestable, por lo que los radicales reaccionan rápidamente con otras moléculas para estabilizarse con lo que generan más radicales libres, porque los electrones, desde un punto de vista energético, siempre tienden a emparejarse hasta dar lugar a enlaces estables cuando estos comparten dos electrones. Las principales ROS corresponden al radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (aunque no es un radical es una molécula muy inestable y en presencia de un

catalizador que inicie su descomposición produce ROS), y los radicales hidroxilo (OH<sup>\*</sup>) (Gill et al. 2010). Las ROS pueden reaccionar con todo tipo de moléculas y metabolitos tales como ADN, pigmentos, proteínas, lípidos y otras moléculas celulares esenciales lo que conduce a diferentes procesos degenerativos y/o destructivos.

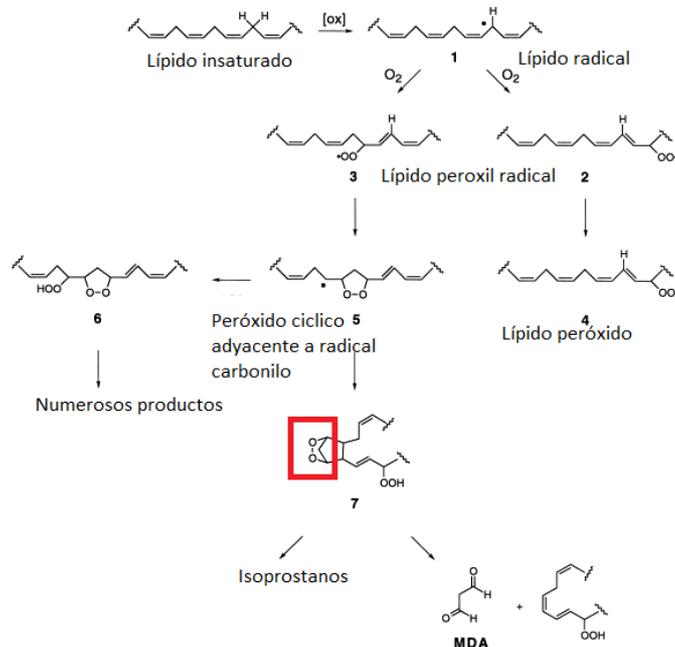
La producción de ROS son debidas a situaciones de estrés celular, por ello las ROS pueden considerarse indicadores de la respuesta al estrés por parte de las plantas (Suzuki et al. 2012). El problema es que estas especies tienen una vida media muy corta y por ello son difíciles de determinar directamente y en su lugar se determinan los productos producidos al reaccionar estas con proteínas, lípidos, etc.

Para mitigar el daño oxidativo iniciado por las ROS, las plantas presentan un sistema de defensa antioxidante complejo, con acciones muy diversas, donde se incluyen antioxidantes de bajo peso molecular y enzimas antioxidantes, tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), las peroxidasas (POX) y la glutatión reductasa (GR). Varios orgánulos subcelulares, tales como el cloroplasto, la mitocondria y los peroxisomas son los centros comunes de la producción de las ROS (Foyer et al. 2003).

Un parámetro indicador o prueba indirecta del daño oxidativo es la concentración de malondialdehído (MDA) o propanodial, producto de la peroxidación de lípidos. Este se determina por su reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA), mediante la técnica TBARS o *tiobarbituric acid reactive species*. El MDA es uno de los varios productos finales de bajo peso molecular formados a partir de la acción de las ROS sobre los lípidos, productos de la descomposición peroxidación lipídica primaria y secundaria. Sin embargo, debemos señalar que sólo ciertos productos de la peroxidación de lípidos generan MDA, y además el MDA no es el único producto final que se forma por la descomposición de lípidos, ni es una sustancia generada exclusivamente a través de la peroxidación lipídica, aunque si es su origen mayoritario a partir de la peroxidación. Por lo tanto, la determinación de sus niveles será un indicador de la acción de las ROS sobre la estabilidad de la membrana celular y ello puede permitir diferenciar cultivos tolerantes y sensibles al estrés salino y la evolución de la respuesta al mismo (Meloni et al. 2003).

La tolerancia de un cultivo a la salinidad es importante para el posible uso de dicho cultivo, esta se puede evaluar mediante diferentes formas. Una es estudiando la capacidad de las plantas cultivadas para sobrevivir en suelo salino mediante el cálculo de la productividad del cultivo en suelo salino y su rendimiento relativo del cultivo en suelo salino y comparándolo con la producción en las mismas condiciones de no salinidad. Pero estos estudios de campo son lentos y muy costosos. Por ello actualmente es posible conocer la tolerancia individual a la salinidad

mediante el desarrollo *in vitro* de plantones y el estudio de indicadores bioquímicos que nos permita conocer su status oxidativo y que nos determinará de forma indirecta su tolerancia a la salinidad.



**Figura 1.** Reacciones a partir del radical hidroxilo sobre un lípido insaturado de membrana. Una vez formado el lípido peróxido o peróxido radical, este se cicla sobre el carbono del doble enlace rompiendo el lípido y originando diversas moléculas de MDA (malondialdehído) de forma sucesiva. (Modificación del esquema de Marnett 1999)

### *Micropagación in vitro*

La micropropagación *in vitro* es la mejor manera de realizar clones de una misma planta eliminando posibles virus y produciendo un gran número de plantas idénticas en un corto periodo de tiempo a partir del cultivo en condiciones asépticas de un explanto, permitiendo después determinar variaciones y adaptaciones de las plántulas a unas condiciones determinadas (Hernández et al. 2006).

La micropropagación consiste en un conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos que permiten multiplicar las plantas asexualmente de forma rápida, eficiente y en grandes cantidades. Forma parte de las técnicas de micropropagación el cultivo *in vitro* realizado a partir de plantas, semillas, embriones, órganos, explantos, células y protoplastos, que deben hallarse

en una situación aséptica, y que posteriormente son cultivados en un medio nutritivo en condiciones estériles.

Una técnica de micropropagación consiste en aislar una parte de la planta con el objetivo de obtener plantas viables idénticas. Las características que definen a esta técnica son: a) que se desarrolla a pequeña escala y en una pequeña superficie, b) las condiciones ambientales están optimizadas mediante la regulación de las condiciones físicas, nutricionales y hormonales y c) no siempre siguen el patrón normal de crecimiento, ya que puede formar tejidos como el callo, o bien se pueden desarrollar vías inusuales de crecimiento (Jain et al. 2007).

La óptima micropropagación consistirá en el desarrollo y aclimatación de plantas mediante cinco etapas que conformarán todo el proceso pero estas deberán adaptarse a las características de la especie vegetal. Las etapas consistirán primero en la selección de la planta madre y la preparación de los explantos, seguidamente el establecimiento del cultivo, le sigue la etapa de la proliferación o multiplicación de explantos y finalmente las etapas de enraizamiento y aclimatación de las plántulas (Hernández et al. 2013).

La correcta preparación del material inicial en especies leñosas deberá asegurar un buen estado fisiológico y sanitario de la planta madre de la cual se obtendrán los explantos utilizando tejidos meristemático en la época de crecimiento activo. El tejido meristemático o meristemo, es el tejido responsable del crecimiento vegetal. Este tejido se encuentra en diferentes regiones, presentando células pequeñas, con paredes finas y abundantes vacuolas. Es un tejido joven y poco diferenciado con capacidad de división, que a partir del mismo permite el desarrollo de los demás tejidos, un ejemplo del mismo son las yemas axilares (Burger et. al. 1985). El crecimiento es posible considerando el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece, sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Ferl et al. 2015). El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta estará determinado tanto por las condiciones ambientales creadas *in vitro* como también por las características iniciales del vegetal de partida (genotipo, estado fisiológico y sanitario, condiciones de crecimiento, tamaño del explanto, vigorosidad y edad del tejido, posición en la planta y método de obtención).

La desinfección es una etapa fundamental que debe permitir utilizar explantos de mayor tamaño, aumentando así la tasa de supervivencia y la calidad de los mismos y una vez aislado el explanto. Es el paso previo a su plantación en el medio de cultivo estéril antes de establecer su cultivo. Las características y composición de este medio y la presencia de reguladores del

crecimiento de plantas estarán en función de la especie. El proceso de desinfección consistirá en la esterilización superficial de los explantos con el fin de eliminar los patógenos de la superficie de la planta. El cultivo se considera establecido cuando los explantos ya sobreviven en el medio de cultivo libres de contaminaciones.

El aumento del número de brotes obtenidos en cada subcultivo corresponderá a la etapa de proliferación, una vez que los explantos iniciales se han establecido. Los brotes son separados y cultivados de nuevo de forma independiente (subcultivo). La eficiencia de la propagación aumenta cuando los cultivos son homogéneos, evitando siempre el subcultivo de explantos con problemas de hiperhidratación, necrosis apical o clorosis (Jain et al. 2007, Hernández et al. 2013).

El enraizamiento puede realizarse *in vitro* o *ex vitro*, aunque en ambos existe una primera etapa de inducción de la raíz, normalmente por un estímulo hormonal y otra para el desarrollo e incremento de la longitud de la misma. Un buen enraizamiento presentará un buen número de raíces de longitud apropiada, formadas en ausencia de callo (De Klerk et al. 1997). Las estrategias de enraizamiento incluyen el tratamiento de los brotes con auxinas durante un periodo corto y la replantación posterior en un medio sin reguladores. En ocasiones, el enraizamiento puede venir precedido de una fase de etiolación de los brotes. El enraizamiento es crítico en plantas leñosas ya que las raíces formadas *in vitro* pueden no ser funcionales durante la aclimatación y necesitarían ser reemplazadas retrasando su crecimiento.

La última etapa de aclimatación comprende el establecimiento de las plantas a condiciones *ex vitro* por transferencia del cultivo en invernáculo. Las plantas *in vitro* difieren en su anatomía y fisiología de las originadas en condiciones naturales. Las plántulas *in vitro* se desarrollan en una atmosfera con una alta humedad relativa, una baja intensidad luminosa, condiciones asépticas y un medio de cultivo que les proporciona los componentes necesarios (nutrientes y azúcar) para un crecimiento heterotrófico o mixotrófico presentando muy poca capacidad fotosintética. El proceso de aclimatación a condiciones *ex vitro* ha de ser gradual con una disminución de la humedad relativa un incremento de la intensidad de luz que permita el desarrollo de hojas adaptadas a las condiciones *ex vitro* de forma progresiva.

La micropropagación *in vitro* se ve afectada por muchos factores que determinarán las características del medio de cultivo. De este modo el desarrollo *in vitro* de los explantos necesita, además de agua, nutrientes, luz y dióxido de carbono, los reguladores del crecimiento o fitohormonas que actúan de señalizadores. Existen numerosas fitohormonas que actualmente están agrupadas en cinco grupos: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno.

Estas fitohormonas y su relación entre la concentración de las mismas y su localización, controlarán los procesos de crecimiento vegetal (Davies 2012).

Una de las fitohormonas importantes en cultivo de tejidos en la etapa de proliferación son las citoquininas, derivados prenilados de la adenosina, como la 6-benziladenina (BA) que estimula el desarrollo y crecimiento de la parte aérea de las plantas promocionando la división celular (Arab et al. 2014). Las auxinas son otro grupo de fitohormonas, el representante más abundante en la naturaleza es el ácido indolacético (IAA), derivado del aminoácido triptófano, que actúan como reguladoras del crecimiento vegetal de la raíz. En la planta la dominancia apical está determinada por un balance entre auxinas y las citoquininas. El balance citoquininas/auxinas contribuye a determinar la arquitectura de una planta debido a su antagonismo. Por ello en el crecimiento *in vitro* se utilizan las fitohormonas como reguladores de la arquitectura de la planta modificando su concentración en el medio de cultivo (Zaerr et al. 1982).

### *Objetivos*

1. Poner a punto la técnica de micropropagación *in vitro* de *Paulownia* estudiando las diferentes etapas de propagación para optimizar su desarrollo.
2. Establecer un cultivo *in vitro* de *Paulownia sp.*
3. Dotar de plantas enraizadas de *Paulownia sp* para otros trabajos fin de grado.
4. Evaluar la respuesta al estrés salino en plantas de *Paulownia sp* cultivadas *in vitro*.

## Material y métodos

### *Material vegetal*

El material vegetal de campo, *ex vitro*, se obtuvo en un cultivo en masa de 2 años de *Paulownia tomentosa* en el término de Porreres (Mallorca, España). En este campo se recolectaron, en distintos árboles, segmentos de aproximadamente 1,0 cm, conteniendo yemas axilares. El transporte se realizó en papel de celulosa empapado con agua destilada hasta el laboratorio.

El material vegetal cultivado *in vitro* se obtuvo gracias a una donación del Doctor Abel Piqueras del Departamento de Mejora Vegetal del CEBAS-CSIC (Murcia). Las 10 plántulas recibidas, fueron cortadas, obteniéndose 40 explantos. Los explantos tuvieron una medida de ente 1,0 y 1,5 cm. A partir de los mismos se estableció un cultivo *stock* a partir del cultivo y recultivo aséptico *in vitro* de plántulas de *Paulownia tomentosa*.

### *Protocolos de asepsia*

Los explantos *ex vitro* se trataron siguiendo los siguientes protocolos de asepsia.

Protocolo A: Los explantos se sumergieron en una disolución que contenía un 20% de lejía comercial durante 15 min., después en una solución de etanol al 70% durante 2 min. y finalmente 5 inmersiones de 5 min. en agua milliQ, cambiando el agua en cada inmersión.

Protocolo B: Los explantos se sumergieron en una disolución que contenía un 30% de lejía comercial y 1 mL/L de polisorbato 60 o Tween 60 en agitación durante 15 min., en etanol 70% 2 min. y finalmente 5 inmersiones de 5 min. en agua milliQ, cambiando el agua en cada inmersión.

Protocolo C: Los explantos se sumergieron en dos disoluciones con fungicidas, la primera contenía Curzate® (cimoxanilo 4% + mancozeb 40%) a una concentración de 0,3 g/100mL, la segunda contenía Dorado®P (penconazol 10% p/v) a una concentración de 40 µL/100mL,

donde los explantos permanecieron en cada disolución 15 min., después se siguió el protocolo A.

#### *Establecimiento del cultivo in vitro y multiplicación de los explantos*

El medio de cultivo utilizado fue medio MS (Murashiage et al. 1962), suplementado con 30 g/L de sacarosa, 6 g/L agar. En el medio de cultivo de crecimiento aéreo (MS+BA) se incluyó además 0,5 ml/L de 6-benziladenina (BA). El medio de cultivo se ajustó siempre a pH 5,8 y después se sometió a esterilización en autoclave durante 20 min. a 121°C y 50 psi de presión, posteriormente se dispensó en tubos estériles de 60 mL.

Se establecieron tres cultivos *in vitro* a partir del material *ex vitro*, una vez sometido a los distintos protocolos de asepsia, uno para cada protocolo. Se introdujeron las yemas laterales y apicales de las secciones de tallo esterilizadas en medio de cultivo dispensado en tubos de cristal, de 60 ml, con 3 mL de medio MS+BA. Las yemas fueron introducidas de forma aséptica en una cámara de flujo laminar horizontal. Las condiciones en la cámara de crecimiento fueron las siguientes, 16 horas de fotoperiodo lumínico (obtenido mediante fluorescentes de luz blanca) y una temperatura de 25°C durante el periodo lumínico y de 20°C durante el periodo oscuro.

La multiplicación de los explantos procedentes del CEBAS se realizó cultivando las yemas, en las mismas condiciones anteriores, a razón de 4 yemas axilares por bote, en 10 botes de cristal de 100 mL que contenían el medio de crecimiento descrito. Después de 4 semanas de crecimiento, se replantaron las nuevas yemas producidas en nuevos botes de cultivo multiplicando el número de plántulas. Este proceso se realizó 4 veces, durante un periodo total de 4 meses.

#### *Condiciones de micropropagación*

*Etiolación:* Dos grupos de 15 plántulas del *stock* fueron seleccionadas para someterlas a unas condiciones de etiolación, aislándolas de la luz en la misma cámara de crecimiento, durante 2 y 7 días observándose su respuesta. Las condiciones de crecimiento fueron las mismas que las descritas anteriormente a excepción del fotoperiodo.

*Enraizamiento:* Dos grupos de 25 plántulas del *stock* fueron replantadas respectivamente en dos medios de cultivo de enraizamiento consistentes en el medio MS anterior uno con 0.5 ml/L de

ácido indol-3-butírico (IBA) y otro con 1,0 ml/L de IBA (Medio enraizamiento o MS+IBA). Las condiciones de crecimiento fueron las mismas que las plántulas *stock*.

*Aclimatación:* 45 plántulas del *stock* de enraizamiento fueron replantadas en una palangana de 40x60 cm y una profundidad de 8 cm con una capa de 8 cm de vermiculita (mineral formado por silicatos de hierro o magnesio, del grupo de las micas que se utiliza en cultivos hidropónicos), regando con agua desionizada, situándose en el invernáculo a unas condiciones de 25°C y un ciclo de luz natural.

#### *Tratamiento salino*

*Salinidad:* Dos grupos de 16 plántulas del *stock* fueron subcultivadas respectivamente en dos medios de cultivo de crecimiento consistentes en el medio de crecimiento (MS+BA) uno con unas condiciones de salinidad de 50 mM y 100 mM de NaCl. Las condiciones de crecimiento fueron las mismas que las plántulas *stock* durante 21 días.

*Efecto del estrés salino sobre el crecimiento:* Los pesos de las plántulas completas sin callo se determinaron en los grupos control, 50 mM de NaCl y 100 mM de NaCl después de 21 días de crecimiento.

#### *Preparación de la muestra*

El material vegetal se homogenizó con un tampón de extracción (50 mM Tris-acetato (pH 6), conteniendo EDTA 0,1 mM, cisteína 2 mM y Tritón X-100 0.2% (v/v)) añadiéndose también polivinilpolipirrolidona (PVPP) a una concentración final del 2% (p/v) realizándose las extracciones sobre hielo. Las muestras de los diferentes grupos fueron pesadas y homogeneizadas con una relación masa/volumen de tampón 1/4. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 20 min. a 4°C en centrífuga Sigma 3K30 con rotor 12153 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Alemania) y se recolectó el sobrenadante para las determinaciones de la actividad enzimática catalasa y peroxidasa.

### *Determinaciones analíticas*

*Determinación de proteínas totales:* La concentración de proteínas totales en el extracto vegetal se determinó por el método de Bradford (1976). El método está basado en el cambio de color del colorante Azul de Coomassie G-250 al interaccionar con radicales de aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos de la proteína. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm determinándose la absorbancia a 595 nm. Se utilizó una recta patrón de una disolución de albúmina con 8 concentraciones (0,05-3,2 mg/mL). El resultado se expresó en mg de proteína por ml de extracto 1/4 de la muestra vegetal.

*Determinación de la actividad peroxidasa:* La actividad peroxidasa se determinó según una modificación de Ferrer et al. (1999). El método consiste en medir la actividad enzimática de peroxidasa en el homogenado. En resumen la actividad se determinó mediante la disminución de la absorbancia a 595 nm, en una solución tampón de Tris-acetato 50 mM pH 5,0, conteniendo 0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 1 mM del donador de electrones el 4-metoxi- $\alpha$ -naftol a temperatura ambiente. El tiempo de reacción fue de entre 120 s y se consideró un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_{595}$ ) de 21.600 M<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>. El resultado se expresó en actividad enzimática por mg de proteína de la muestra vegetal.

*Determinación de la peroxidación de lípidos:* La concentración de MDA, un índice de la peroxidación lipídica, se determinó según Cakmak et al. (1991) a partir de material vegetal congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C. Aproximadamente 0,1 g del material se homogeneizó en 1 mL de una disolución de 0,1% de ácido tricloroacético (TCA). Las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min. temperatura ambiente y se recolectó el sobrenadante. Una alícuota de 0,5 ml del sobrenadante del homogenado vegetal se mezcló con 1,5 ml de de TBA al 0,5% en una disolución al 20% de TCA. La muestra reactiva se incubó durante 20 min. a 90°C y se enfrió en hielo durante 5 minutos. A continuación se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min. en una centrifuga Minicen 22 con rotor RT 254 (Orto Alresa, Madrid España) y posteriormente se determinó su absorbancia a 532 y a 600 nm. La concentración del complejo presente en el extracto MDA-TBA se calcula por diferencia entre la absorbancia a 532 nm y a 600 nm (turbidimetría no específica). La concentración de MDA se calculó considerando el coeficiente de extinción molar del MDA ( $\epsilon_{532}$ ) 155.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Heath et al. 1968). El resultado se expresó en nmol de MDA por g peso fresco de la muestra vegetal.

Todas las mediciones espectrofotométricas descritas se realizaron en un espectrofotómetro UV/VIS DU 730 (Beckman Coulter, California, USA).

### *Análisis estadístico*

Los resultados fueron analizados mediante la comparación de los valores (F) obtenidos en un ANOVA de una vía. La significancia estadística se analizó mediante un test t-de Student de los grupos que crecieron con 50 mM y 100 mM de NaCl en el medio de cultivo con respecto a las plántulas stock o control, considerándose estadísticamente significativa una  $p < 0,05$ . Todos los análisis se realizaron utilizando el programa Microsoft Excel.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Establecimiento del cultivo*

El establecimiento del cultivo *in vitro* a partir de material proveniente de campo se intentó 3 veces, para cada uno de los protocolos de asepsia. Desde la aplicación del protocolo de asepsia y el cultivo del material se realizó un seguimiento de la evolución del cultivo durante una semana para cada uno de los protocolos. En función de su evolución se aplicaba un nuevo protocolo de asepsia. Todos los protocolos de asepsia realizados fueron infructuosos debido a la elevada contaminación fúngica observada. Esta contaminación resultó ser totalmente invalidante para el establecimiento de un cultivo *in vitro* estéril tal como puede observarse con los síntomas externos de contaminación fúngica en las Figura 2, y poder obtener así un *stock* suficiente de plántulas. Seguramente esta dificultad en la asepsia es debido a las propias características de los explantos, estos presentan una gran superficie (con numerosos pelos), lo que dificulta la acción de antisépticos y fungicidas.



**Figura 2.** Contaminación fúngica observable. Esta contaminación fue similar para los protocolos A, B y C en el protocolo de asepsia.



**Figura 3.** Stock de plántulas viables, imagen parcial.

Por ello se decidió, como alternativa, el establecimiento del cultivo a partir de las 10 plántulas cedidas por el CEBAS. Después de 4 meses de cultivo de las plántulas cedidas se obtuvo un *stock* final de 380 plántulas viables (Figura 3). A partir de este conjunto de plántulas se iniciaron los estudios en las diferentes condiciones de propagación para optimizar su desarrollo y para el estudio del estrés salino.

#### *Evaluación de las condiciones de propagación*

**Etiolación:** Las plántulas, que fueron aisladas de la luz, mostraron un elevado crecimiento a los 2 días con una gran distancia entre nudos. A los 7 días, el crecimiento en altura fue interrumpido por el propio tamaño del bote. Este proceso se realizó para comparar si la planta más grande enraíza y se aclimata mejor que una que tenga los entrenudos cortos. Por eso se determinó como tiempo de etiolación suficiente los 2 días, ya que las plántulas con 7 días presentaban un tallo demasiado largo para ser recultivadas. Las plántulas etioladas durante 2 días fueron replantadas posteriormente en los medios de enraizamiento y finalmente pasaron a aclimatación (Figura 3).



**Figura 4.** Efecto de la etiolación sobre el crecimiento a los 2 días (izquierda) y a los 7 días (derecha). Cada bote incluye 4 plántulas.



**Figura 5.** Efecto de la etiolación sobre el crecimiento durante 2 días (derecha) y las plántulas control (izquierda). Cada bote incluye cuatro plántulas.

*Enraizamiento:* Las plantas recultivadas en el medio de enraizamiento después del proceso de etiolación, desarrollaron las raíces sin ningún problema. De las 25 plantas que se cultivaron, después del proceso de etiolación, en los dos medios de enraizamiento (MS+IBA), uno con una concentración de 0,5 ml/L de IBA y otro con una concentración de 1 ml/L de IBA, el 100% enraizó con un tamaño de raíz similar. Las plantas desarrollaron unas raíces equilibradas y de buen tamaño no observándose diferencias visuales entre las raíces en las dos concentraciones de IBA utilizadas en los medios de enraizamiento.



**Figura 6.** Plantas cultivadas en medio de enraizamiento 0,5 ml/l de IBA (derecha) y con 1 ml/L de IBA (izquierda), posterior a la etiolación. Cada bote incluye 4 plántulas.



**Figura 7.** Detalle del enraizamiento con 1ml/L de IBA.

*Aclimatación:* La aclimatación se realizó con las plántulas enraizadas en los dos medios. Se escogieron las 45 plántulas que enraizaron, y de estas han sobrevivido 39 en el proceso de aclimatación realizado. Por lo que se obtuvo una tasa de éxito del 86,7%.

El establecimiento de las condiciones de crecimiento en cuanto a su desarrollo aéreo, enraizamiento y posterior aclimatación fue realizado con un medio de crecimiento standard MS, una etiolación de dos días y una concentración en el medio de enraizamiento de IBA optima entre 0,5 y 1 ml/L y con una posterior aclimatación al invernáculo obteniéndose un rendimiento del 86,7%.

### *Respuesta al estrés salino*

El efecto de la salinidad, después de 21 días de tratamiento en los dos medios salinos, se aprecia de manera visual. Se observa un tamaño ligeramente inferior a mayor concentración de NaCl (Figuras 8-9), presentando asimismo síntomas de deshidratación y marchitez en la concentración de 100 mM de NaCl. Pero analizando los datos del porcentaje de la masa de las plántulas respecto a las planta control (Tabla 1) podemos observar cómo las plantas que crecen en medio con 50 mM de NaCl, se detecta una reducción, en aproximadamente un 6 %, de la cantidad de biomasa producida respecto a las plántulas control. En las plántulas que crecen en medio con 100 mM de NaCl se produce una reducción mucho mayor respecto a las plántulas control, aproximadamente un 40%, de la biomasa producida lo que nos indica un efecto tóxico que disminuye su tasa de crecimiento. Además las plántulas que crecen en medio de 100 mM de NaCl también presentan diferencias en su producción de masa respecto a las plántulas cultivadas en medio de 50 mM de NaCl, resultados similares a los obtenidos anteriormente (Miladinova et al. 2013).



**Figura 8.** Crecimiento de las plantas control (derecha) y cultivadas en un medio con una concentración de 50 mM de NaCl (izquierda) a las 4 semanas de crecimiento.



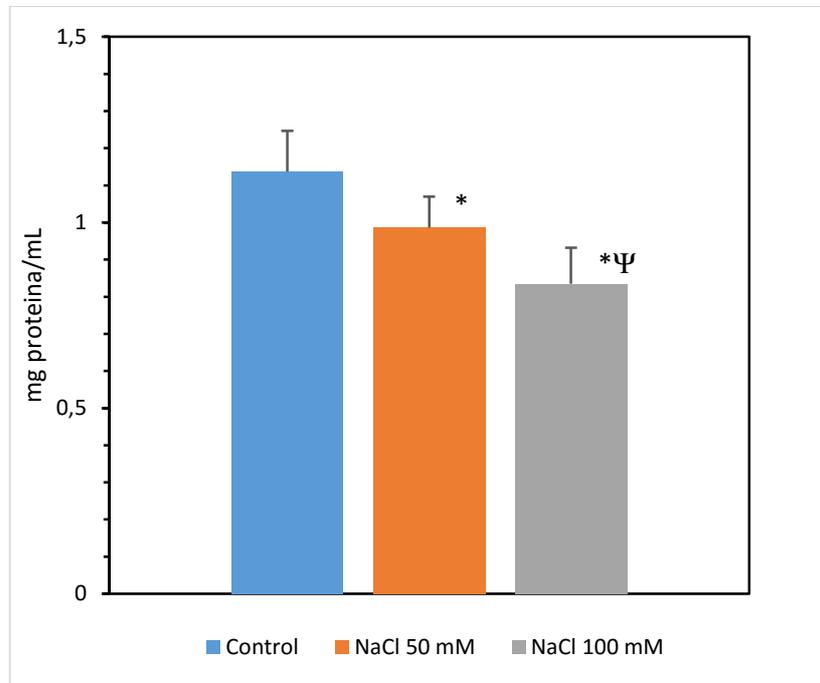
**Figura 9.** Crecimiento de las plantas cultivadas en un medio con una concentración de 50 mM de NaCl (izquierda) y cultivadas en un medio con una concentración de 100 mM de NaCl (derecha) a las 4 semanas de crecimiento.

**Tabla 1.** Masa de las plántulas sometidas a estrés salino durante 21 días expresado en porcentaje.

	<b>Control</b>	<b>50 mM NaCl</b>	<b>100 mM NaCl</b>
<b>Porcentaje de masa (%)</b>	100	94	61

Los resultados expuestos en la Figura 8, nos indican un efecto negativo estadísticamente significativo sobre la concentración de proteína en función de la concentración de NaCl del medio de cultivo. Los resultados obtenidos por Ayala-Astorga et al. (2010) en cultivos *in vitro* durante 15 y 30 días de *Paulownia imperialis* y *Paulownia fortunei*, en un medio de cultivo WPM (Woody Plant Medium, con un 30 g/L sucrosa, 8 g/L de agar y pH 5,8) conteniendo diferentes concentraciones de NaCl (0, 20, 40, 60, 80, y 160 mM). A los 15 días la concentración de proteína fue mayor en las plantas de *Paulownia imperialis* cultivadas en una concentración de 20 mM de NaCl, similar entre las concentraciones de 40 a 60 mM y presentaban una fuerte disminución a concentraciones de 160 mM de NaCl. Pero a los 30 días la concentración de proteína disminuyó significativamente en las plantas cultivadas con 80 mM de NaCl pero de forma extraordinaria aumentó en las plantas cultivadas con 160 mM de NaCl. Respecto al cultivo de *Paulownia fortunei* se observó que en las plantas cultivadas a mayores concentraciones de salinidad (80 y 160 mM) mostraron concentraciones más elevadas de proteína a los 15 días, mientras que las plantas cultivadas a concentraciones inferiores fueron similares a la plantas control. A los 30 días se observó de nuevo un aumento de la concentración de proteína en las plantas cultivadas con 160 mM de NaCl. Nuestros resultados son comparables a los producidos a los 15 días y a los 30 días en *Paulownia imperialis*. En este punto debemos señalar que existen claras diferencias entre el trabajo de Ayala-Astorga et al. (2010) respecto a nuestro trabajo, ya que nosotros no teníamos las plántulas enraizadas y el medio de cultivo era diferente, nuestro medio aportaba una cantidad cuatro veces mayor de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Müller et al. 2013).

## Proteínas totales



**Figura 8.** Concentración de proteína en el extracto vegetal de plántulas (1:4) (mg/mL) cultivadas durante 21 días en medio Control y en medio conteniendo 50 mM de NaCl, 100 mM de NaCl. ANOVA, \* $p < 0.05$  respecto a control y  $\Psi p < 0.05$  respecto a 50 mM mediante test t-de Student (n=6).

Debemos señalar que los resultados obtenidos por nosotros son contradictorios, si los comparamos con los de otros investigadores que utilizaron otras plantas. Hemos observado que hay una gran disparidad entre los autores, unos indican un efecto negativo en el contenido de proteína respecto al estrés salino, pero otros presentan resultados contrarios con un efecto positivo respecto al estrés salino. Los estudios se realizaron en diferentes tipos de plantas, herbáceas y no herbáceas, en diferentes medios de cultivo y tiempos de cultivo (Qados 2011).

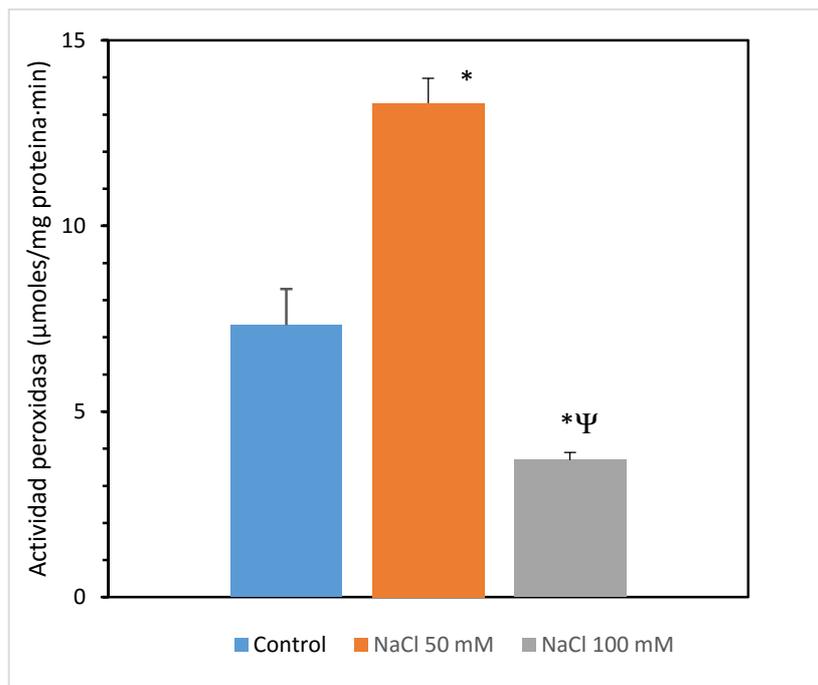
Una de las características que induce el estrés salino es la eliminación de los iones de potasio por parte de las raíces de las plantas, lo que provocaría un desequilibrio fisiológico al ser el potasio necesario para la síntesis de proteínas. La pérdida de potasio provocaría la disminución

del crecimiento y de su desarrollo (Chen et al. 2007) tal como hemos observado en la producción de biomasa. Si se prolonga el estrés podría afectar a la síntesis de proteínas y, finalmente, hacer que disminuya dicha síntesis (Caplan et al. 1990). Por otra parte, el aumento de la concentración de proteína observada por diversos autores podría deberse a los efectos osmóticos producidos por las elevadas concentraciones salinas externas. Otros autores indican que, para sobrevivir en situaciones de estrés, las plantas son capaces de acumular proteínas para proteger a las células de los efectos de estrés (Wang et al. 2003), pero seguramente este es un efecto agudo que no pueden mantenerse en el tiempo.

El análisis realizado por nosotros abarcaba a la totalidad de la plántula, pero sería necesario realizar un análisis más preciso en las diferentes regiones de la misma, hojas, tallo y raíces para poder determinar el efecto de la salinidad sobre las diferentes estructuras en plantas totalmente enraizadas.

#### *Actividad peroxidasa*

En la Figura 8 se muestra la actividad peroxidasa en los tres grupos experimentales estudiados. Las peroxidases son enzimas oxidorreductasas que utilizan el peróxido (oxígeno en estado de oxidación  $-1$ ) como oxidante y un sustrato reductor que es oxidado. Las peroxidases se encuentran localizadas en las vacuolas, citosol y pared celular, actuando sobre el  $H_2O_2$  producido por las plantas (Mitler 2002). Un exceso de  $H_2O_2$  crea problemas en las plantas, al ser el  $H_2O_2$  un potente inhibidor del ciclo de Calvin, y este reacciona durante su descomposición con todo tipo de moléculas estructurales y metabolitos tales como ADN, proteínas, lípidos y otras moléculas celulares esenciales como son los pigmentos (Shen et al. 1997 y Meloni et al. 2003).



**Figura 8.** Actividad peroxidasa en el extracto vegetal de plántulas respecto a la proteína total ( $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg}$  proteína) cultivadas durante 21 días en medio Control y en medio conteniendo 50 mM de NaCl, 100 mM de NaCl. ANOVA, \* $p < 0.05$  respecto a control y  $^{\Psi}p < 0.05$  respecto a 50 mM mediante test t-de Student. (n=3)

Los niveles de la actividad antioxidante enzimática en condiciones de estrés salino es muy variable entre las especies de plantas e incluso entre variedades de una misma especie (Bartoli et al. 1999). Por ello la efectividad de la actividad antioxidante capaz de neutralizar las ROS producidas dependerá tanto de la intensidad del estrés salino como de la capacidad y la etapa de desarrollo de la planta en el momento en que se produce dicho estrés.

En el experimento, los datos obtenidos muestran un incremento de la actividad peroxidasa en las plántulas cultivadas en un medio con 50 mM de NaCl respecto a las plántulas control (Figura 8). Sin embargo, esta actividad disminuye de forma significativa en las plántulas cultivadas en un medio con 100 mM de NaCl tanto respecto a las plántulas control como respecto a las cultivadas en un medio con 50 mM de NaCl. Este hecho nos indica que los efectos de la salinidad superan los sistemas reguladores de respuesta a estrés de la planta, produciéndose ya efectos tóxicos como se demuestra en un menor crecimiento y en el aspecto de dichas plántulas. Como hemos señalado en la Introducción, en presencia de estrés salino las plantas presentan una tendencia a incrementar la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y en consecuencia se deben poner en marcha todos los mecanismos para evitar sus efectos, entre ellos incrementar la actividad de las peroxidases. Debemos señalar que nuestros resultados son comparables a los resultados

obtenidos en otras especies por otros autores (El-Mashad et al. 2012), en donde demuestran un incremento de la actividad peroxidasa al ir incrementando el estrés salino hasta llegar a un máximo, a partir del cual la actividad va disminuyendo progresivamente. Por ello podríamos indicar que inicialmente se produce un proceso de adaptación al estrés salino mediante los mecanismos disponibles, pero cuando dicho estrés es superior a la capacidad de respuesta la actividad disminuiría de forma progresiva. Por ello, no es fácil establecer indicadores válidos para la tolerancia a la sal ya que existen considerables variaciones en la producción de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos como respuesta al estrés salino presentándose una gran variación intra-especie y también de acuerdo al estado de desarrollo de la planta (Ashraf 2004).

#### *Peroxidación lipídica*

La concentración de MDA en *Paulownia* aumento significativamente (Tabla 2) en las plántulas cultivadas al incrementar la concentración de NaCl del medio de cultivo. A 50 mM NaCl, la concentración de MDA aumento aproximadamente un 3,5 respecto al valor de las plántulas control y los valores continuaron aumentando en las plántulas cultivadas con 100 mM de NaCl. Estos resultados son consistentes con los experimentos realizados con *Allium L.*, donde la peroxidación lipídica aumentó con la salinidad (El-Baky et al. 2003), o en *Vigna unguiculata* donde se observó un aumento en las plantas cultivadas con 200 mM de NaCl (Cavalcanti et al. 2004) al igual que en plantas de *Carrizo citrange* cultivadas con 30, 60, y 90 mM NaCl (Arbona et al. 2003).

**Tabla 2.** Estimación de la peroxidación lipídica mediante el método MDA-TBARS en plántulas sometidas a estrés salino durante 21 días expresado como media de la concentración de MDA respecto a peso de planta  $\pm$  ESM (n=3) (ANOVA, \*p<0.05 respecto a Control mediante test t-de Student).

	Control	50 mM NaCl	100 mM NaCl
MDA (nmol/g planta)	13,6 $\pm$ 13,4	42,6 $\pm$ 04,5*	69,1 $\pm$ 44,7*

La peroxidación lipídica es una de los principales mecanismos moleculares implicados en el daño oxidativo a las estructuras celulares y puede conducir a la muerte celular. Esta peroxidación

afectará a las membranas biológicas induciendo cambios en sus propiedades fisicoquímicas pudiendo alterar la función de los lípidos y las proteínas de las mismas como son, por ejemplo, la estructura, la fluidez, la flexibilidad y la permeabilidad selectiva de las membranas celulares. Por ello podríamos señalar que hay dos consecuencias al proceso de peroxidación, daños estructurales con consecuencias funcionales y generación de productos secundarios de la degradación de los lípidos que conducen a la interacción con otras moléculas proteínas, hidratos de carbono,...). Estos efectos se producirán en la mayoría de las membranas celulares, incluyendo cloroplastos, mitocondrias, microsomas, peroxisomas y membrana plasmática (Bhattacharjee 2005).

## CONCLUSIONES

Las conclusiones del trabajo realizado fueron:

1. La asepsia del material vegetal, recolectado *ex vitro* de *Paulownia sp.*, para su propagación *in vitro* es difícil, debido a las propias características de los explantos, lo que dificulta la acción de antisépticos y fungicidas.
2. Una vez establecido el cultivo *in vitro*, *Paulownia* se multiplicó y mantuvo fácilmente. Siendo su enraizamiento y aclimatación exitosos con un porcentaje del 86,7%.
3. *Paulownia sp.* baja su crecimiento *in vitro* al incrementar la concentración salina en el medio de cultivo. La masa producida disminuyó un 6% a 50 mM y un 40% a 100 mM de NaCl.
4. La producción de proteína soluble disminuyó a medida que se incrementó la concentración salina del medio de cultivo en condiciones *in vitro*.
5. La actividad peroxidasa aumentó al incrementar la concentración salina en el medio de cultivo a 50 mM, pero dicha actividad disminuyó en un medio de cultivo con 100 mM de NaCl.
6. Los daños de peroxidación sobre la membrana celular aumentó al incrementar el estrés salino.
7. En conjunto se observó una buena respuesta al estrés salino en un medio de cultivo con una concentración de 50 mM de NaCl en condiciones *in vitro*.
8. Las plantas de *Paulownia sp* sufrieron daños importantes en su desarrollo en un medio de cultivo con una concentración de 100 mM de NaCl en condiciones *in vitro*.

## Bibliografía

- Arab, M. M., Yadollahi, A., Shojaeiyan, A., Shokri, S., & Ghoghaj, S. M. (2014). Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on in vitro multiplication of G× N15 (hybrid of almond× peach) vegetative rootstock. *J. Gen. Engin. Biotech.*, 12(2), 81-87.
- Arbona, V., Flors, V., Jacas, J., García-Agustín, P., & Gómez-Cadenas, A. (2003). Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant cell physiol.*, 44(4), 388-394.
- Ashraf, M. P. J. C., & Harris, P. J. C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci.*, 166(1), 3-16.
- Ashraf, M. P. J. C., & Foolad, M. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Experim. Botany*, 59:206-216.
- Ayala-Astorga, G. I., & Alcaraz-Meléndez, L. (2010). Salinity effects on protein content, lipid peroxidation, pigments, and proline in *Paulownia imperialis* (Siebold & Zuccarini) and *Paulownia fortunei* (Seemann & Hemsley) grown in vitro. *Elec. J. Biotech.*, 13(5), 13-14.
- Bartoli, C. G., Simontacchi, M., Tambussi, E., Beltrano, J., Montaldi, E., & Puntarulo, S. (1999). Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. *J. Expe. Botany*, 50(332), 375-383.
- Bhattacharjee, S. (2005). Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal. *Curr. Sci. India*, 89, 1113-1121.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2), 248-254.
- Bremer, B., Bremer, K., Chase, M., Fay, M., Reveal, J., Soltis, D., Soltis, P. & Stevens, P. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical J. Linnean Soc.* 161(2), 105-121.
- Burger, D. W., Liu, L., & Wu, L. (1985). Rapid micropropagation of *Paulownia tomentosa*. *HortScience*, 20(4), 760-761.
- Cakmak, I., & Horst, W. J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.*, 83: 463-468.
- Caplan, A., Claes, B., Dekeyser, R., & Van Montagu, M. (1990). Salinity and drought stress in rice. In *The Impact of Biotechnology on Agriculture* (pp. 391-402). Springer. Netherlands.
- Carillo, P., Annunziata, M. G., Pontecorvo, G., Fuggi, A., & Woodrow, P. (2011). Salinity stress and salt tolerance. In *Abiotic Stress Plants-Mechanisms and Adaptation*. A. K. Shanker and B. Venkateswar Ed. (pp. 21-38). InTech. Croatia.
- Cavalcanti, F. R., Oliveira, J. T. A., Martins-Miranda, A. S., Viégas, R. A., & Silveira, J. A. G. (2004). Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *New Phytologist*, 163(3), 563-571.
- Chen, Z., Cui, T. A., Zhou, M., Twomey, A., Naidu, B. P., & Shabala, S. (2007). Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. *J. Expe. Botany*, 58(15-16), 4245-4255.
- Davies, P. (1987). *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Martinus Nijhoff Publishers. Netherlands.
- De Klerk, G. J., Ter Brugge, J., & Marinova, S. (1997). Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation in vitro in *Malus 'Jork 9'*. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.*, 49(1), 39-44.
- Doumett, S., Lamperi, L., Checchini, L., Azzarello, E., Mugnai, S., Mancuso, S., Petruzzelli G. & Del Bubba, M. (2008). Heavy metal distribution between contaminated soil and *Paulownia tomentosa*, in a pilot-scale assisted phytoremediation study: influence of different complexing agents. *Chemosphere*, 72(10), 1481-1490.
- El-Baky, A., Hanaa, H., Amal, A., & Hussein, M. M. (2003). Influence of salinity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and electrophoretic patterns of protein and isoenzymes in leaves of some onion cultivars. *Asian J. Plant Sci.*, 2(8), 633-638.

- El-Mashad, A. A. A., & Mohamed, H. I. (2012). Brassinolide alleviates salt stress and increases antioxidant activity of cowpea plants (*Vigna sinensis*). *Protoplasma*, 249(3), 625-635.
- Ferl, R., & Paul, A. L. (2015). Genome organization and expression. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B. B., Gruissem, W., Vickers, K., & Jones, R. L. (Eds.). Wiley Blackwell. United States.
- Ferrer, M. A., & Ros Barceló, A. (1999). Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant, Cell Environ.*, 22(7), 891-897.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.*, 119:355-364.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 48:909-930.
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 125(1), 189-198.
- Hernández, J. A., Clemente-Moreno, M. J., Díaz-Vivancos, P., & Piqueras, A. (2013). Tratamientos para incrementar el vigor de plantas leñosas en condiciones *in vitro* y su método de aplicación. Patente Esp. núm. solicitud 201130888.
- Hernandez, M. J., Sixto H., Ciria, P., Carrasco J. & Cañellas I. (2008). *Paulownia* plantations for bioenergy in Spain. 16<sup>th</sup> European Biomass Conference and Exhibition. Valencia.
- Hernández, O. A. C., Sahagún, A. R., Domínguez, J. M. R., & Garay, B. R. (2006). Organogénesis indirecta y enraizamiento *in vitro* de *Paulownia elongata*. *e-Gnosis*, 4.
- Instituto Geológico y Minero de España. (2004). *El estado de las aguas subterráneas en el archipiélago Balear. Isla de Mallorca. Año 2.004*. Informe interno DG Recursos Hídricos. Govern de les Illes Balears.
- Jain, S. M., & Häggman, H. (Eds.). (2007). *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Springer Science & Business Media. Netherlands.
- Kalaycioglu, H., Deniz, I. & Hizirolu, S. (2005). Some of the properties of particleboard made from *Paulownia*. *J. Wood Sci.*, 51:410-414.
- López-García, J. M., & Mateos Ruiz, R. M. (2003). La intrusión marina en los acuíferos de la isla de Mallorca. *Tecnología de la Intrusión de Agua de Mar en Acuíferos costeros: Países Mediterráneos*. Instituto Geológico y Minero de España, 1, 383-392.
- Macci, C., Doni, S., Peruzzi, E., Ceccanti, B., & Masciandaro, G. (2012). Bioremediation of polluted soil through the combined application of plants, earthworms and organic matter. *J. Environ. Monit.*, 14: 2710-2717.
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1), 83-95.
- Meloni, D. A., Oliva, M. A., Martínez, C. A., & Cambraia, J. (2003). Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environ. Exp. Botany*, 49:69-76.
- Miladinova, K., Ivanova, K., Georgieva, T., Geneva, M., & Markovska, Y. (2013). The salinity effect on morphology and pigments content in three *Paulownia* clones grown ex-vitro. *Bulgarian J. Agricul. Sci.*, 19(2), 52-56.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7(9), 405-410.
- Müller, A., Volmer, K., Mishra-Knyrim, M., & Polle, A. (2013). Growing poplars for research with and without mycorrhizas. *Frontiers Plant Sci.*, 4, 332.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59:651-681.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15(3), 473-497.
- Qados, A. M. A. (2011). Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). *J. Saudi Soc. Agric. Sci.*, 10(1), 7-15.
- Robinson, B. H., Mills, T. M., Petit, D., Fung, L. E., Green, S. R., & Clothier, B. E. (2000). Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant and Soil*, 227(1-2), 301-306.
- San Miguel Ayanz, A (1985) Producción de plantitas y crecimiento de *Paulownia tomentosa*. Ed. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Spain.
- Shen, B., Jensen, R. G., & Bohnert, H. J. (1997). Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol.*, 115(2), 527-532.
- Sikkema, R., Steiner, M., Junginger, M., Hiegl, W., Hansen, M. T., & Faaij, A. (2011). The European wood pellet markets: current status and prospects for 2020. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 5(3), 250-278.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R. O. N., & Miller, G. A. D. (2012). ROS and redox signalling in the

response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell Environ.*, 35:259-270.

Temple, M. D., Perrone, G. G., & Dawes, I. W. (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell. Biol.*, 15(6), 319-326.

Tzvetkova, N., Miladinova, K., Ivanova, K., Georgieva, T., Geneva, M., & Markovska, Y. (2015). Possibility for using of two Paulownia lines as a tool for remediation of heavy metal contaminated soil. *J. Environ. Biol.*, 36(1), 145.

Wang, J., Li, W., Zhang, C., & Ke, S. (2010). Physiological responses and detoxification mechanisms to Pb, Zn, Cu and Cd in young seedlings of Paulownia fortunei. *J. Environ. Sci.*, 22(12), 1916-1922.

Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.

Yadav, N. K., Vaidya, B. N., Henderson, K., Lee, J. F., Stewart, W. M., Dhekney, S. A., & Joshee, N. (2013). A review of Paulownia biotechnology: a short rotation, fast growing multipurpose bioenergy tree. *Am. J. Plant Sci.*, 4(11), 2070.

Zaerr, J. B., & Mapes, M. O. (1982). Action of growth regulators. In *Tissue culture in forestry* (pp. 231-255). Springer Netherlands.

Zhu, Z. H., Chao, C. J., Lu, X. Y., & Xiong, Y. G. (1986). *Paulownia in China: cultivation and utilization*. Zhu, Asian Network for Biological Science and International Development Research Centre, Chinese Academy of Forestry. China.

Zuazo, V. H. D., Bocanegra, J. A. J., Torres, F. P., Pleguezuelo, C. R. R., & Martínez, J. R. F. (2013). Biomass yield potential of Paulownia trees in a semi-arid Mediterranean environment (S Spain). *Int. J. of Renew. Energy Res. (IJRER)*, 3(4), 789-793.