

**Efecto de la iluminación (tubos
fluorescentes o LEDs) de las cámaras de
cultivo sobre el cultivo *in vitro* de
plántulas de *Medicago arborea* L.**



Esther Cabrera Velasco

Departamento de Biología Vegetal I: Fisiología Vegetal

U.C.M.

Mención en Biotecnología

Tutoras: Luisa Martín Calvarro y Beatriz Pintos López

LUISA MARTÍN CALVARRO Y BEATRIZ PINTOS LÓPEZ, Profesor Titular y Profesor Contratado Doctor, respectivamente, del Departamento de Biología Vegetal I: Botánica y Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

Como **DIRECTORAS DEL TRABAJO FIN DE GRADO** presentado por **ESTHER CABRERA VELASCO** titulado “Efecto de la iluminación (tubos fluorescentes o LEDs) de las cámaras de cultivo sobre el cultivo *in vitro* de plántulas de *Medicago arborea* L.”

DAN EL VISTO BUENO a la memoria de TFG que se adjunta.

En Madrid, a 3 de julio de 2017.

Fdo. Luisa Martín Calvarro y Beatriz Pintos López

ÍNDICE.

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. MATERIAL Y MÉTODOS	5
3.1. Material vegetal.....	5
3.2. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Medicago arborea</i> L.....	5
3.2.1. Asepsia de semillas de <i>Medicago arborea</i> L.	5
3.2.2. Germinación de semillas de <i>Medicago arborea</i> L.....	5
3.2.3. Cultivo de plántulas de <i>Medicago arborea</i> L.	6
3.3. Tasa de germinación.....	6
3.4. Parámetros morfológicos	7
3.5. Parámetros indicadores de estrés.....	7
3.5.1. Parámetros fotosintéticos	7
3.5.1.1. Emisión de la fluorescencia de la clorofila a. Fluorómetro	7
3.5.1.2. Clorofilas (SPAD)	8
3.5.1.3. Pigmentos fotosintéticos	8
3.5.1.4. Proteínas	9
3.5.1.4.1. Extracción de proteínas	9
3.5.1.4.2. Cuantificación de proteínas.....	9
3.5.1.5. Malondialdehído	9
3.5.1.6. Actividad de enzimas involucradas en estrés oxidativo	10
3.5.1.6.1. Peroxidasa	10
3.5.1.6.2. Catalasa.....	11
3.5.1.6.3. Superóxido dismutasa	11
3.5.1.7. Metabolitos secundarios	11
3.5.1.7.1. Preparación de extractos etanólicos a partir de plántulas de <i>M.arborea</i> L.....	11

3.5.1.7.2. Análisis cuantitativo de flavonoides	12
3.5.1.7.2.1. Preparación de la recta patrón de quercetina.....	12
3.5.1.7.2.2. Cuantificación de flavonoides	12
3.5.1.7.3. Análisis cuantitativo de fenoles	13
3.5.1.7.3.1. Preparación de la recta patrón de ácido gálico.....	13
3.5.1.7.3.2. Cuantificación de fenoles.....	13
3.5.1.8. Determinación de la actividad antioxidante	14
3.6. Análisis estadístico	14
4. RESULTADOS	14
4.1. Tasa de germinación.....	14
4.2. Parámetros morfológicos	15
4.2.1. Longitud hipocotilo y raíz.....	15
4.2.2. Peso fresco radicular y de la parte aérea.....	16
4.3. Parámetros indicadores de estrés.....	17
4.3.1. Parámetros fotosintéticos.....	17
4.3.1.1. Emisión de fluorescencia de la clorofila a. Fluorómetro.....	17
4.3.1.2. Clorofilas (SPAD).....	18
4.3.1.3. Pigmentos fotosintéticos.....	18
4.3.2. Proteínas.....	19
4.3.3. Malondialdehído.....	19
4.3.4. Actividad de enzimas involucradas en estrés oxidativo.....	19
4.3.4.1. Peroxidasa.....	20
4.3.4.2. Catalasa.....	20
4.3.4.3. Superóxido dismutasa (SOD).....	20
4.3.5. Metabolitos secundarios.....	21
4.3.5.1. Análisis cuantitativo de flavonoides.....	21

4.3.5.1.1. Preparación de la recta patrón de flavonoides.....	21
4.3.5.1.2. Cuantificación de flavonoides.....	21
4.3.5.2. Análisis cuantitativo de fenoles.....	22
4.3.5.2.1. Preparación de la recta patrón de fenoles.....	22
4.3.5.2.2. Cuantificación de fenoles.....	22
4.3.6. Determinación de la actividad antioxidante.....	22
5. DISCUSIÓN.....	23
6. CONCLUSIONES.....	27
7. BIBLIOGRAFÍA.....	27

ABREVIATURAS.

4MN: 4-metoxi- α -naftol

Abs: absorbancia

CAT: catalasa

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

F₀: fluorescencia mínima

F_m: fluorescencia máxima

F_v: fluorescencia variable

LED: diodo emisor de luz

MDA: malondialdehido

MS: Murashige y Skoog

NBT: nitroblue tetrazolium

PAR: radiación fotosintéticamente activa

POX: peroxidasa

PSI: fotosistema I

PSII: fotosistema II

PVP: polovinilpirrolidona

ROS: especies reactivas de oxígeno.

SAB: seroalbúmina bovina

SOD: superóxido dismutasa

SPAD: Soil Plant Analysis Development

1. RESUMEN.

Debido a sus propiedades, las lámparas LED (diodo emisor de luz) utilizadas para la iluminación en la producción de plantas en invernaderos y sistemas de cultivo en interiores están reemplazando a los tipos de lámparas convencionales. En este trabajo, se analizó el efecto de dos sistemas de iluminación diferentes (LEDs y fluorescentes) en cámaras de cultivo *in vitro*, sobre las características morfológicas y parámetros que denotan la existencia de estrés oxidativo en el cultivo de plántulas de *Medicago arborea* L. La tasa de germinación de semillas, la longitud, el peso fresco y seco de la parte aérea de las plántulas no se vieron afectados por el tipo de iluminación de las cámaras de cultivo. Sin embargo, la longitud y el peso fresco de las raíces sí se vieron afectados. El contenido de pigmentos fotosintéticos, los valores de eficiencia fotoquímica del PSII (Fv/Fm), la fluorescencia mínima (F₀) y la fluorescencia máxima (Fm) mostraron diferencias en los dos sistemas de iluminación. Lo mismo ocurrió con los parámetros de estrés oxidativo tanto enzimáticos como no enzimáticos. Los resultados mostraron que el sistema de iluminación LED produce un estado de estrés en las plantas de *M. arborea*.

Palabras clave: metabolitos secundarios, LEDs, fluorescentes, alfalfa arbustiva, estrés oxidativo.

ABSTRACT.

Due to their properties, LED (light emitting diode) lamps used for lighting in the production of greenhouse plants and indoor cultivation systems are replacing conventional lamp types. In this study, the effect of two different lighting systems (LEDs and fluorescent) in *in vitro* culture chambers, on the morphological characteristics and parameters that denote the existence of oxidative stress in the culture of *Medicago arborea* L. were evaluated. Seed germination rate, length, fresh weight and dry weight of aerial part of the seedlings were not affected by the type of lighting of the culture chambers. However, length and weight of the roots were affected. The content of photosynthetic pigments, PSII (Fv / Fm), minimum fluorescence (F₀) and maximum fluorescence (Fm) values showed differences in the two lighting systems. The same happened with both enzymatic and non-enzymatic oxidative stress parameters. The results showed that the LED lighting system produces a state of stress in *M. arborea* plants.

Keywords: secondary metabolites, LEDs, fluorescents, shrub alfalfa, oxidative stress.

2. INTRODUCCIÓN.

Medicago arborea L. es una especie de fabácea perteneciente a la familia Leguminosae que crece de forma espontánea en muchas zonas de la Europa meridional, también se cultiva para uso forrajero y como planta ornamental. Tiene un gran interés para el sector agronómico por sus principales características: resistente a la sequía y ausencia de latencia durante estaciones marcadas, tales como verano e invierno.

La luz es uno de los factores más importantes que afectan al crecimiento, desarrollo y reproducción de plantas y hongos. En la actualidad, la mayoría de los invernaderos utilizan luces fluorescentes para la iluminación. En los últimos años, sin embargo, una nueva tecnología de luz, el diodo emisor de luz (LEDs), ha empezado a ser adoptado como fuente complementaria de luz para el cultivo. Y es que los LEDs producen una luz ultra brillante con una baja emisión de calor y un consumo de energía mínimo comparado con otras fuentes artificiales de iluminación tales como lámparas fluorescentes, lámparas de halogenuros metálicos y lámparas de sodio de alta presión que se usan en las cámaras de cultivo e invernaderos.

Una parte de las actuaciones encaminadas a mejorar la calidad de los cultivos, ha sido la realización de ensayos con fuentes de luz LEDs (Folta y Childers, 2008). Estos ensayos sobre todo se han realizado con productos hortícolas (Wojciechowska *et al.*, 2015).

La luz es la fuente de energía radiante que se utiliza para el proceso de fotosíntesis. Las plantas usan la radiación fotosintéticamente activa (PAR) que está en el rango entre 400 y 700 nm. Por lo tanto, la eficiencia de la fotosíntesis está influenciada por la calidad de la luz, o bien, la longitud de onda de la luz, la duración de la luz y la intensidad (Nhut *et al.*, 2002).

Por otro lado, las plantas experimentan estrés tanto biótico como abiótico que afecta a su crecimiento y desarrollo. El daño en los cloroplastos generados por la luz es la respuesta principal y más común de los factores de estrés que operan en condiciones de campo. El daño se debe a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) consecuencia del incremento en el traspaso de energía hacia moléculas de O₂ formando una serie de complejos que alteran el estatus redox del estroma y de la membrana tilacoidal, lo cual causa una bajada en la eficiencia de los fotosistemas (Murata *et al.*, 2007).

El estudio de pigmentos fotosintéticos es importante ya que informa, entre otras cosas, de la productividad y eventos de estrés. Las alteraciones en la composición de pigmentos fotosintéticos puede relacionarse con la fotoaclimatación (Richardson *et al.*, 2002).

Las clorofilas (a y b), pigmentos tetrapirrólicos, son componentes esenciales en el proceso de fotosíntesis y muy sensibles al estrés ambiental. Estos pigmentos son esenciales para la conversión de energía. La clorofila a está asociada a proteínas del centro de reacción y a los pigmentos antena del fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII). Además existen otros pigmentos accesorios en las plantas superiores, como los carotenoides (carotenos y xantofilas). La mayoría de los pigmentos sirven como antenas que colectan luz y transfieren la energía a los centros de reacción, además de cumplir otras funciones de protección. Por otro lado, las antocianinas son antioxidantes que protegen a la planta de la radiación ultravioleta.

El estrés oxidativo resulta de condiciones que promueven la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales, si están en exceso y no son eliminadas de la planta, pueden dañar permanentemente estructuras básicas para el mantenimiento de las funciones celulares normales (Azcón y Tobar 1998). El estrés afecta directa o indirectamente a casi todas las actividades de las plantas. En una situación general de estrés se generan muchas reacciones degenerativas tales como peroxidación lipídica (Blokhina *et al.*, 1999) y desnaturalización de proteínas (Gardner y Fridovich, 1991), debido a la producción de ROS tales como el anión radical superóxido y el peróxido de hidrógeno.

Las ROS también se generan en condiciones no estresantes, en reacciones fisiológicas enzimáticas y no enzimáticas (Skulachev, 1997) localizadas en estructuras tales como cloroplastos (Eltner, 1991) y mitocondrias (Turrens *et al.*, 1982). Las plantas regulan la concentración de estas moléculas mediante el uso de sistemas de defensa basados en enzimas y metabolitos antioxidantes permitiendo así a la célula vivir en condiciones de estrés oxidativo (Maldonado y Pahlich, 2004). Cuando estos sistemas fallan, se produce muerte celular (Prochazkova *et al.*, 2001).

Dentro de los sistemas basados en metabolitos antioxidantes que protegen estructuras y funciones celulares frente a concentraciones normales o excesivas de ROS, encontramos el glutatión (Jiménez *et al.*, 1998), ácido ascórbico (Smirnoff, 2000), tocoferoles (Kagan,

1989) y metabolitos secundarios que conforman el sistema antioxidante en plantas (Maldonado y Pahlich, 2004).

Esta síntesis de metabolitos secundarios puede cambiar debido a factores ambientales, fisiológicos, bioquímicos y genéticos con la luz siendo uno de los factores más influyentes (Kopsell *et al.*, 2004). Los cambios fisiológicos se activan por la exposición a diferentes longitudes de onda (Samuolien *et al.*, 2013).

Dentro de los metabolitos secundarios encontramos los compuestos fenólicos, uno de los grupos más ubicuos y que va a permitir a las plantas adaptarse a cambios ambientales bióticos y abióticos (Wink, 2010).

Los flavonoides son uno de los grupos más grandes de metabolitos secundarios de las plantas. Todos se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua.

La peroxidación lipídica daña los sistemas membranosos en donde el proceso de peroxidación lipídica se ha iniciado. Cuando la reacción en cadena no es detenida, a partir de lípidos poliinsaturados se generan productos degradados tales como hidrocarburos, alcoholes, dímeros entrecruzados y aldehídos. De éstos últimos, el malondialdehído (MDA) constituye un marcador característico de las reacciones de peroxidación lipídica y por lo tanto de estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 1989)

En determinadas situaciones de estrés la forma más eficiente y la principal para la detoxificación de las ROS la realizan los sistemas antioxidantes enzimáticos. Entre las enzimas que realizan esta función encontramos la superóxido-dismutasa (SOD), la catalasa y la peroxidasa.

La SOD está presente en los compartimentos subcelulares susceptibles al estrés oxidativo (Bowler *et al.*, 1992). SOD protege del estrés oxidativo catalizando la dismutación del radical superóxido a H_2O_2 y O_2 (Scandalias, 1993).

La catalasa cataliza la dismutación de H_2O_2 a O_2 y H_2O mediante una serie de reacciones en cadena, principalmente a nivel de membranas y citoplasmático (Elstner y Oswald, 1994). Es uno de los componentes más importantes de los mecanismos de defensa de la planta que existe en la mitocondria y en los peroxisomas (Gupta *et al.*, 2009). Elimina tanto el H_2O_2 generado en los peroxisomas por procesos oxidativos, como el producto de la dismutación del radical superóxido por SOD.

La peroxidasa cataliza una reacción de descomposición de H_2O_2 parecida a catalasa, también asociada con la membrana, pero principalmente al interior de compartimentos subcelulares tales como peroxisomas y mitocondrias (Sugimoto, 1997).

Hasta la fecha no hay estudios en los que se analice y compare el efecto de la iluminación con LED o con fluorescentes sobre plantas de cultivadas *in vitro*. Por todo ello, en este trabajo se han utilizado plántulas de *Medicago arborea* L., por ser una planta modelo de larga trayectoria en el departamento y tener un protocolo de cultivo *in vitro* bien conocido y optimizado (Martín *et al.*, 2000), en las que se ha estudiado el efecto de dos sistemas de iluminación diferentes (LED y fluorescentes) sobre las características morfológicas (longitud, peso fresco y seco del hipocotilo y raíz) de estas plántulas cultivadas *in vitro*. Además, se han evaluado otros parámetros que denotan la existencia o no de estrés en estas plántulas como son: pigmentos fotosintéticos (clorofila, carotenoides y antocianinas), proteínas, malondialdehído, actividad de enzimas involucradas en estrés oxidativo (SOD, catalasa y peroxidasa), metabolitos secundarios (fenoles y flavonoides), actividad antioxidante (mediante DPPH).

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Material vegetal

El material vegetal utilizado en este trabajo fueron plántulas cultivadas *in vitro* de *Medicago arborea* L. obtenidas a partir de semillas de una población silvestre en Burjasot (Valencia, España).

3.2. Cultivo *in vitro* de *Medicago arborea* L.

3.2.1. Asepsia de semillas de *Medicago arborea* L.

El método de asepsia de las semillas utilizadas, consistió en una desinfección superficial con las siguientes etapas: inmersión de las semillas en ácido sulfúrico concentrado durante 20 minutos. Previa eliminación del ácido sulfúrico, se aclaró con agua destilada estéril para eliminar los restos del ácido. Inmersión en una solución de hipoclorito sódico al 2,5% de cloro activo durante 15 minutos en una cámara de flujo laminar. Tres lavados sucesivos con agua destilada estéril para eliminar los restos de lejía antes de ser sembradas

3.2.2. Germinación de semillas de *Medicago arborea* L.

Las semillas fueron transferidas a tubos con medio de germinación, se puso una semilla por tubo (figura 1). El medio de germinación fue el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) diluido 1/4. La siembra se realizó en condiciones de esterilidad, en una cabina de flujo laminar y con material previamente autoclavado durante 20 minutos a 121°C y 1

atmosfera de presión. Una vez sembradas en los tubos, se dejan en oscuridad durante cuatro días en cámara de cultivo en condiciones controladas de temperatura (22 ± 1 °C).



Figura 1. Tubos con semillas sin germinar.

3.2.3. Cultivo de plántulas de *Medicago arborea* L.

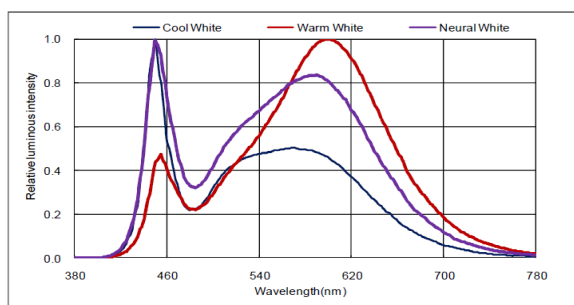
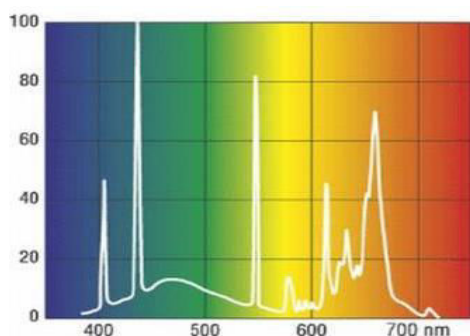


Figura 2. Espectro de la cámara con fluorescentes. Figura 3. Espectro de la cámara con LEDs.

Pasados los cuatro días, cuando las plántulas alcanzaron una altura de 3-4 cm aproximadamente, se pasan a las dos cámaras de crecimiento (luces fluorescentes y luces LEDs) para los correspondientes ensayos. La cámara de cultivo de luces fluorescentes está equipada en cada balda con 4 fluorescentes de luz blanca fría y 1 fluorescente Sylvania GroLux que tiene el siguiente espectro de emisión (figura 2). La cámara de cultivo de luces LEDs está equipada con 3 tiras de LEDs que proporcionan el siguiente espectro de emisión (figura 3). La densidad media de flujo de fotones sobre los cultivos fue de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La mitad de los tubos (48 tubos), se dejan incubando en la cámara de cultivo con fluorescentes a 22 ± 1 °C y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y la otra mitad (48 tubos) se dejan en la cámara de cultivo con luces LED en las mismas condiciones. Este procedimiento se repite tres veces más, con una separación entre las repeticiones de 2 semanas.

3.3. Tasa de germinación de semillas de *Medicago arborea* L.

El porcentaje de germinación de las semillas sembradas en las dos cámaras de cultivo ensayadas se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$\% \text{ germinación} = (\text{número de semillas germinadas} / \text{número de semillas totales}) * 100$

3.4. Parámetros morfológicos.

Después de 3 semanas de cultivo y una vez que las plántulas presentaban la primera hoja trifoliada, se realizaron las siguientes medidas: longitud del hipocotilo (cm), longitud de la raíz (cm), peso fresco de la parte aérea (gramos) y peso fresco de la raíz (gramos). Una vez hechas estas medidas se procede a la congelación a -20°C de las plántulas para su posterior liofilización. Una vez liofilizadas se muelen con ayuda de una espátula hasta obtener un polvo fino que se pesa para obtener así el peso seco (de la parte aérea y de la raíz) y se guardan a temperatura ambiente para su posterior utilización.

3.5. Parámetros indicadores de estrés

3.5.1. Parámetros fotosintéticos

3.5.1.1. Emisión de fluorescencia de la clorofila a. Fluorómetro.

Una de las herramientas más usadas para determinar el estado de los procesos fotoquímicos y el contenido de pigmentos fotosintéticos es el fluorómetro. Se realiza la medida de la emisión de fluorescencia de la clorofila a utilizando un fluorómetro FMS2 de Hansatech Instruments Ltd., Reino Unido. El fundamento del fluorómetro es el siguiente: una hoja de la planta que se analiza es adaptada a oscuridad, para oxidar completamente la cadena de transporte de electrones del PSII. Después del tiempo en oscuridad las hojas se exponen a un rayo de $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y así se produce un nivel mínimo de fluorescencia (F_0), luego la hoja es expuesta a pulsos cortos de luz actínica de alta densidad de flujo fotónico (cientos de $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de tal manera que se llega al máximo nivel de fluorescencia (F_m). La diferencia entre F_m y F_0 es definida como fluorescencia variable (F_v), y la relación de F_v/F_m puede ser usada para estimar la máxima eficacia fotosintética del fotosistema II. La relación F_v/F_m es un buen indicador de estrés en plantas expuestas a diversos estreses bióticos y abióticos (Maxwell y Jonson 2000).

Las medidas de fluorescencia se realizaron en un total de 18 plántulas, 9 de ellas cultivadas en la cámara con fluorescentes y 9 cultivadas en la cámara con LEDs. En cada planta la medida se realiza en la hoja primaria (figura 4). Se mantienen en oscuridad durante 30 minutos y transcurrido este tiempo se hacen las medidas de F_0 , F_m y F_v/F_m .



Figura 4. Pinzas de fluorómetro.

3.5.1.2. Clorofilas (SPAD)

Otra herramienta ampliamente utilizada para determinar el estado de los procesos fotoquímicos y el contenido de pigmentos fotosintéticos es el medidor de clorofila *in situ* (SPAD).

Se analizó el contenido de clorofila total presente en las hojas de las plántulas de *Medicago arborea* L. crecidas en las distintas condiciones de iluminación mediante un método no destructivo utilizando el SPAD-502. Los valores son calculados basándose en la cantidad de luz transmitida por la hoja en dos regiones de longitud de onda en las que la absorción de la clorofila es diferente. A 650 nm donde la clorofila tiene una absorción alta y no se ve afectada por los carotenos, y a 940 nm, donde la absorción por la clorofila es despreciable. Las medidas SPAD se calculan por diferencia de la transmitancia a través del tejido de la hoja a estas dos longitudes de onda.

Para hacer la medida de clorofilas *in situ*, mediante el SPAD, se seleccionaron 9 plantas crecidas en la cámara con fluorescentes y 9 plantas crecidas en la cámara con LEDs. De cada una de las 9 plantas se cogen los 3 folíolos de una hoja y se miden las unidades SPAD.

3.5.1.3. Pigmentos fotosintéticos

A partir de la hoja (3 folíolos) usada para las medidas con el SPAD se realiza la medida de pigmentos fotosintéticos mediante un método destructivo. Para ello, cada hoja se pone en un tubo de ensayo y se añade 4 ml de N, N-Dimetilformamida. Se deja en agitación durante 24 horas y se mide la absorbancia del extracto a cuatro longitudes de onda distintas (663,647, 537 y 470 nm).

Con los valores de absorbancia se calculan los valores de clorofila a, clorofila b, clorofilas totales, antocianinas y carotenoides mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Chl a } (\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}) = 0,01373 A_{663} - 0,000897 A_{537} - 0,003046 A_{647}$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}) = 0,02405 A_{647} - 0,004305 A_{537} - 0,005507 A_{663}$$

$$\text{Chl totales } (\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}) = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

$$\text{Antocianinas } (\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}) = 0.08173 A_{537} - 0,0069 A_{647} - 0,002228 A_{663}$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}) = (A_{470} * (\text{Chl a} + \text{Chl b}) - 9,479 * \text{Antocianinas}) / 119,26$$

3.5.1.4. Proteínas

3.5.1.4.1. Extracción de proteínas

Se preparan extractos proteicos que servirán para cuantificar proteínas y posteriormente para medir las actividades enzimáticas (peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa). Para ello, se toman 80 mg de material liofilizado de la parte aérea de plántulas de *M. arborea* L. crecidas en las dos condiciones de iluminación y se pone en un mortero en frío añadiendo 40 mg de PVP (polovinilpirrolidona) y 4 ml de tampón fosfato a pH 7,2. Se macera y se centrifuga a una velocidad de 18000 rpm durante 20 minutos en un centrifuga Beckman, obteniendo la fracción proteica soluble de albuminas.

El precipitado se homogeniza con 3 ml de cloruro sódico 1M y se centrifuga durante 20 minutos a 18000 rpm, obteniendo así la fracción proteica asociada a la pared correspondiente a las globulinas.

3.5.1.4.2. Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas totales presentes en cada una de las muestras se utilizó el método de Bradford para el cual se requiere la preparación de una recta patrón empleando la seroalbúmina bovina (SAB) en un rango de 2mg/ml a 20 mg/ml. Se realizan las medidas por triplicado. La ecuación de la recta obtenida fue: $y=0.038x+0.0694$ con un $R^2=0.9098$

La muestra de reacción lleva 795µl de agua, 200µl Bradford y 5µl de muestra. El blanco lleva 800µl de agua y 200µl de Bradford. Se mide la absorbancia a 595nm. Para calcular las proteínas totales se usa la anterior ecuación.

3.5.1.5. Malondialdehido (MDA)

Como marcador característico de las reacciones de peroxidación lipídica se cuantifica el contenido de malondialdehido (MDA) en la parte aérea de las plántulas de alfalfa arbustiva cultivada en las dos cámaras de cultivo ensayadas. Esta medida se efectúa sobre

plántulas recién recolectadas. Para ello, se parte de 200 mg de parte aérea que se tritura en un mortero con 3 ml de ácido tricloroacético al 10%. Se centrifuga a 12000 rpm durante 10 min y se recoge el sobrenadante al que se añade 2 ml de ácido tiobarbitúrico al 0,6%. A continuación se calienta en un baño termostatizado a 100° C durante 15 minutos y pasado ese tiempo se enfría rápidamente en hielo hasta temperatura ambiente. Se vuelve a centrifugar y se mide la absorbancia a 450, 532 y 600 nm. Para cuantificar el MDA se usa la siguiente formula: $MDA (\mu\text{mol l}^{-1}) = 6,45 (OD532 - OD600) - (0,56 * OD450)$

3.5.1.6. Actividad de enzimas involucradas en estrés oxidativo

3.5.1.6.1. Peroxidasa (POX) (EC 1.11.1.7)

La actividad peroxidasa (EC 1.11.1.7) se determina mediante el método descrito por Ferrer *et al.* (1990), con ciertas modificaciones. La técnica se fundamenta en el viraje de color que se produce cuando la peroxidasa junto con un compuesto fenólico (en este caso el 4MN), en presencia de H₂O₂, oxida el 4MN, que da como resultado un compuesto de color azul.

Se ha determinado la actividad enzimática Peroxidasa en las fracciones proteicas de albúminas y globulinas. La mezcla de reacción consiste en: 10µl de muestra, 979µl de tampón tris clorhídrico pH 5, 50 mM; 0,33µl de H₂O₂ 10 mM y 10µl de 4MN (4-metoxi- α -naftol) para la muestra de albuminas y 25µl de muestra, 964µl tampón tris clorhídrico pH 5, 50mM; 0.33µl de H₂O₂ 10 mM y 10µl de 4MN para la muestra de globulinas. El blanco solo lleva tampón. Se hicieron 3 controles por muestra: Control 1: lleva el tampón el H₂O₂ y la muestra. Control 2: lleva el tampón el 4MN y la muestra. Control 3: lleva el tampón el H₂O₂ y el 4MN.

Las medidas se realizaron a 493nm durante 4 minutos, de manera que lo que tenemos es la absorbancia/min. Para hallar la actividad a través de las medidas de absorbancia se utilizó la fórmula: $nkat/ ml = [(Abs/ \epsilon/1000) /V (ml)] * 16.67$

Donde nkat son nanokatales, una unidad de actividad enzimática, ϵ es el coeficiente de extinción molar en $M^{-1}.cm^{-1}$, que en este caso el coeficiente de extinción (ϵ) del 4MN es $21000 M^{-1}cm^{-1}$ y V el volumen. Una vez obtenidos los nka/ml se relaciona con los mg/ml de proteínas para tener nka/mg proteína

3.5.1.6.2. Catalasa (CAT) (EC. 1.16.1.6)

La actividad catalasa se determinó mediante el método descrito por Muñoz y Barceló (1996), por el cual se mide la disminución de absorbancia a 293 nm. La actividad enzimática se expresa en nkat/mg de proteína; con un coeficiente de extinción (ϵ) de $67 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Este método se basa en la reducción del peróxido de hidrógeno a agua + oxígeno ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$). Se ha determinado la actividad enzimática Catalasa en las fracciones proteicas de albúminas y globulinas. La mezcla problema lleva $10\mu\text{l}$ de H_2O_2 2M, $100\mu\text{l}$ muestra y $890\mu\text{l}$ de tampón fosfato 50mM pH 7. Además se preparó un control con $100\mu\text{l}$ de muestra y 1,6 ml de tampón. El blanco lleva solamente el tampón fosfato 50mM pH 7. -Se mide la absorbancia a 240 nm durante 2 minutos.

3.5.1.6.3. Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1)

Se basa en que el NBT (nitroblue tetrazolium) es reducido por el ion superóxido a Blue formazan (de color azul).

Se ha determinado la actividad enzimática Superóxido dismutasa en las fracciones proteicas de albúminas y globulinas. La mezcla de reacción consistió en 3 ml de tampón fosfato 50Mm pH 7.8, EDTA 0.1 mM, metionina 13mM, NBT $75\mu\text{M}$, riboflavina $2\mu\text{M}$ y $10\mu\text{l}$ del extracto proteico de cada tratamiento. El tubo control no lleva extracto y el blanco no lleva ni extracto ni riboflavina. Se mide la absorbancia a 560nm a tiempo 0 y se iluminan los tubos de manera uniforme con una lámpara fluorescente, midiendo a los 20 minutos la absorbancia. Cada muestra se realizó por triplicado.

Una unidad enzimática de SOD es el volumen del extracto para el cual se inhibe la fotorreducción del NBT en un 50%

$$\% \text{ inhibición} = [(\text{Abs control} - \text{Abs problema}) * 100] / \text{Abs control}$$

U/ml = $(\% \text{ inhibición} / 50 * \text{volumen extracto}) * \text{DF}$, siendo DF el factor de dilución.

3.5.1.7. Metabolitos secundarios

3.5.1.7.1. Preparación de extractos etanólicos a partir de plántulas de *Medicago arborea* L.

Los extractos etanólicos de los distintos tratamientos se obtuvieron homogeneizando 120 mg de plántulas liofilizadas de alfalfa arbustiva molidos en 8 ml de etanol al 80% y

mantenidos durante 48 horas en una estufa en oscuridad a 24°C. Posteriormente, se ponen en un baño con agitación a 60°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, los extractos fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue recogido y mantenido en refrigeración y es el extracto sobre el que se realizaron las medidas de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante. Se llevaron a cabo 3 extracciones de cada uno de los tratamientos.

3.5.1.7.2. Análisis cuantitativo de flavonoides

El contenido de flavonoides totales fue determinado mediante colorimetría según el método descrito por Lock *et al.* (2006) con alguna modificación. La cantidad de flavonoides fue expresada en equivalentes de quercetina (mg de quercetina/ g de peso seco de biomasa), interpolando los valores de absorbancia en una recta patrón de quercetina.

3.5.1.7.2.1. Preparación de la recta patrón de quercetina

Se preparó una solución madre de quercetina pesando 5mg de quercetina en un matraz aforado de 10ml y se añade etanol al 80% hasta enrasar a ese volumen. A partir de la solución madre se realizaron diluciones hasta obtener las siguientes concentraciones finales de quercetina: 1.25, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 y 20 mg/L de quercetina.

La mezcla de reacción consistió en X mL de la solución madre de quercetina, 200µl de acetato potásico 1M, 200µl nitrato de aluminio al 10% siendo X: 25, 50, 100, 150, 200,250, 300, 350 y 400 µl de la solución madre de quercetina, llevándose finalmente a un volumen de 10 mL con etanol al 80%. Además se hizo un blanco que llevaba 200 µl de acetato potásico 1M, 200 µl nitrato de aluminio al 10% y 8,6 ml de etanol al 80%. La mezcla de reacción se mantuvo en oscuridad durante 40 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se mide la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro. El proceso se realizó por triplicado.

3.5.1.7.2.2. Cuantificación de flavonoides en los extractos etanólicos de plántulas de *Medicago arborea* L.

Para la cuantificación de flavonoides totales expresados como mg de quercetina, se tomaron 500 µl del extracto etanólico obtenido de plántulas de *Medicago arborea* L. a los que fueron añadidos 100µl de acetato potásico 1M, 100µl de nitrato de aluminio al 10% y por ultimo 4,3 ml de etanol al 80%. La solución fue agitada adecuadamente y se dejó

reposar 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Además se prepara un blanco que lleva 500 µl del extracto problema y 4,5ml etanol al 80%. Transcurrido este tiempo se mide la absorbancia a 415 nm. Para calcular la concentración de flavonoides expresados como quercetina en los extractos problemas se utilizó la ecuación de la recta patrón obtenida previamente. La cuantificación se realiza por triplicado en cada tratamiento.

3.5.1.7.3. Análisis cuantitativo de fenoles

Para determinar la cantidad de fenoles de los extractos etanólicos se utilizó la técnica colorimétrica propuesta por Singleton y Rossi (1965) con alguna modificación. La cantidad de fenoles fue expresada como equivalentes de ácido gálico (mg ácido gálico/g peso seco biomasa) interpolando los valores de absorbancias en una recta patrón de ácido gálico.

3.5.1.7.3.1. Preparación de la recta patrón de ácido gálico

Para la elaboración de la recta patrón se preparó una solución madre de ácido gálico de 25 g/L en un volumen de 100 ml de etanol al 80 %. A partir de esta solución madre de ácido gálico se realizaron diluciones hasta obtener las concentraciones finales de 0.0063, 0.0125, 0.025, 0.0375, 0.05, 0.0625, 0.075, 0.1 mg/ml de ácido gálico.

Para la mezcla de reacción se pone 500µl de cada una de las diluciones, 3ml de carbonato sódico al 7,5% y 500µl del reactivo de Folin-Ciocalteu 1N. Se agita y se deja incubar 10 minutos en un baño a 50°C en agitación y en oscuridad. Finalmente se mide la absorbancia a 760 nm. El proceso se realizó por triplicado.

3.5.1.7.3.2. Cuantificación de fenoles en los extractos etanólicos de plántulas de *Medicago arborea* L.

Para la cuantificación de fenoles totales expresados como mg de ácido gálico, se parte de extractos diluidos 1:4. De cada tratamiento se hacen 3 repeticiones. La mezcla de reacción consta de 500µl del extracto diluido, 3ml de carbonato sódico al 7,5% y 500µl de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N. Se agita y se incuba durante 10 minutos en un baño a 50°C con agitación y en oscuridad. Finalmente se mide la absorbancia a 760 nm. Para calcular la concentración de fenoles totales expresados como ácido gálico en los extractos problemas se utilizó la ecuación de la recta patrón obtenida previamente. La cuantificación se realiza por triplicado en cada tratamiento.

3.5.1.8. Determinación de la actividad antioxidante (DPPH)

Para medir la capacidad antioxidante de cada uno de los extractos se utilizó el método del DPPH descrito por Brand-Williams *et al.* (1995). El 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) es un radical orgánico, nitrogenado y estable. Presenta un color violeta intenso que disminuye en presencia de un antioxidante, de modo que se puede determinar la actividad antioxidante de la muestra, midiendo el grado de reducción de la absorbancia a 517 nm. El porcentaje de reducción del DPPH se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Absorbancia control} - \text{absorbancia muestra})}{\text{Absorbancia control}} * 100 = \% \text{ reducción DPPH}$$

El método consiste en la preparación de una solución stock de DPPH 6×10^{-5} M disuelta en etanol al 80%. De esta solución se toman 4 ml a los que se les añaden 200 μ l de agua destilada y se mide la absorbancia a 517nm para determinar la concentración inicial de DPPH (control). Posteriormente, de cada extracto se tomaron 200 μ l a los que se le añaden 4 ml de DPPH 6×10^{-5} M. El blanco se preparó con 4 ml de etanol al 80%. Se agita bien y se deja incubar durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente se mide la absorbancia a 517 nm. La cuantificación se realiza por triplicado en cada tratamiento.

3.6. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos en los experimentos realizados consistió en el análisis de la varianza mediante la realización de una ANOVA simple, con la que se estableció si existía una diferencia significativa entre los distintos tratamientos, a la vez que nos aseguraba la inexistencia de datos aberrantes. Para dividir los resultados en grupos homogéneos se recurrió a una prueba de múltiples rangos, considerando un nivel de significación de 0,05. Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS (versión Centurion XVI).

4. RESULTADOS.

4.1. Tasa de germinación.

En primer lugar ha sido evaluada la tasa de germinación de las semillas de *Medicago arborea* L. en las dos cámaras de cultivo ensayadas (de fluorescentes y de LEDs). Como se puede apreciar en la figura 5, no se aprecian diferencias significativas ($p=1.00$) en el

porcentaje de germinación de las semillas sembradas en estas dos cámaras de cultivo, siendo el porcentaje de germinación en ambos casos próximo al 100%.

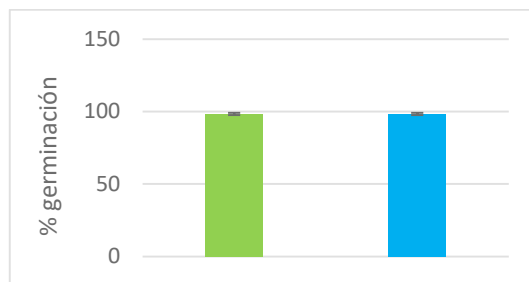


Figura 5. Porcentaje de germinación de semillas de *M. arborea* sembradas en cámaras con fluorescentes (verde) y con LEDs (azúl)

4.2. Parámetros morfológicos.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en cuanto al efecto de dos sistemas de iluminación diferentes (LED y fluorescentes) sobre las características morfológicas (longitud, peso fresco y seco del hipocotilo y raíz) de plántulas de *Medicago arborea* L. cultivadas *in vitro*.

4.2.1. Longitud hipocotilo y raíz principal.

En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos para la medida de la parte aérea (hipocotilo) y de la raíz de las plántulas crecidas durante 90 días (figura 6). No se observan diferencias significativas ($p= 0.704$) respecto a la longitud del hipocotilo de las plantas cultivadas con fluorescentes y de las plantas cultivadas con LEDs. Sin embargo, en el caso de las raíces, sí aparecen diferencias significativas ($p= 0.004$) en la longitud de la raíz de las plántulas que han crecido en cámaras de cultivo con fluorescentes respecto a las crecidas en cámaras con LEDs, siendo la longitud de la raíz de estas plántulas 1,15 veces mayor que la de las plántulas crecidas en cámaras con LEDs.



Figura 6. Plántulas de *Medicago arborea* L. después de 90 días de cultivo

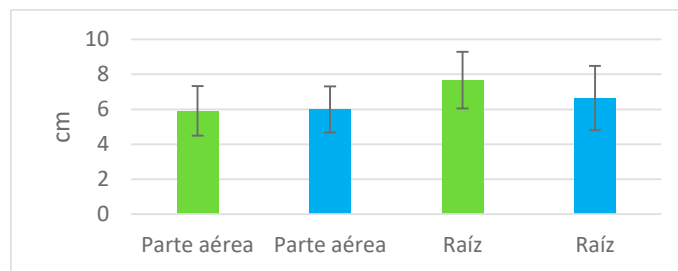


Figura 7. Longitud de la parte aérea y raíz de plántulas de *M. arborea* cultivadas en cámaras con fluorescentes (verdes) y con LEDs (azul)

4.2.2. Peso fresco radicular y de la parte aérea.

Se ha cuantificado tanto el peso fresco como el peso seco de la raíz y de la parte aérea de las plántulas de alfalfa arbórea crecidas tanto en cámaras de cultivo de fluorescentes como en cámaras de cultivo de LEDs. Los resultados se muestran en las figuras 8 y 9.

En cuanto a la medida de peso fresco de la parte aérea no se encuentran diferencias significativas ($p=0.228$) entre los dos tratamientos (fluorescentes y LEDs) (figura 8). Sin embargo, en el caso de la raíz si se encuentran diferencias significativas entre los dos tipos de iluminación, siendo el peso fresco de las raíces de las plántulas crecidas en cámaras con luces fluorescentes 1,3 veces superior al de las raíces de plántulas crecidas en cámaras con LEDs.

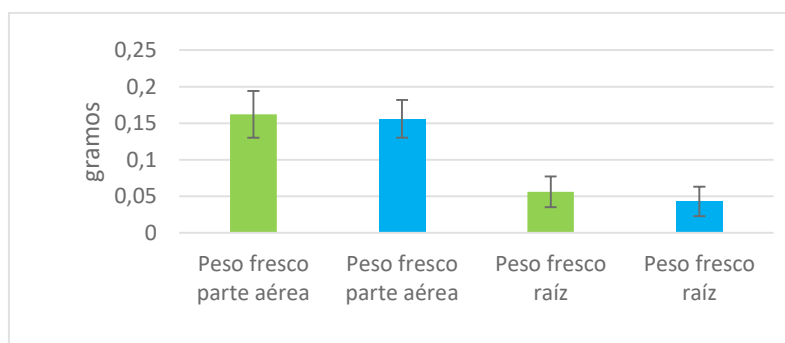


Figura 8. Peso fresco y peso seco de la parte aérea y de la raíz de plántulas *M. arborea* cultivadas en cámaras con fluorescentes (verde) y con LED (azul)

En cuanto a la medida del peso seco, la situación es opuesta, apreciándose en este caso diferencias significativas ($p=0.260$) sólo entre el peso seco de la parte aérea de las plántulas cultivadas en cámaras con fluorescentes y el de las plantas cultivadas en cámaras con LEDs. En la raíz no se encuentran diferencias significativas en cuanto al peso seco (figura 9).

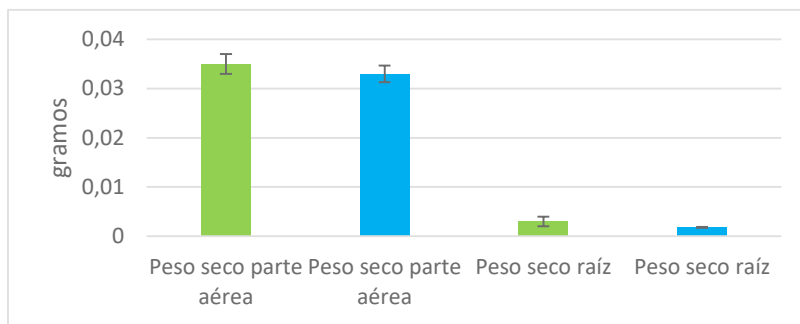


Figura 9. Peso seco de la parte aérea y de la raíz de plántulas de *M. arborea* cultivadas en cámaras con fluorescentes (verde) y con LEDs (azul)

4.3. Parámetros indicadores de estrés.

Se ha evaluado también el efecto de los dos sistemas de iluminación diferentes (LEDs y fluorescentes) en plántulas de *Medicago arborea* L. cultivadas *in vitro* sobre parámetros que denotan la existencia o no de estrés, como son: pigmentos fotosintéticos (clorofila, carotenoides y antocianinas), proteínas, malondialdehído (MDA), actividad de enzimas involucradas en estrés oxidativo (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa), metabolitos secundarios (fenoles y flavonoides) y actividad antioxidante (mediante DPPH).

4.3.1. Parámetros fotosintéticos.

4.3.1.1. Emisión de fluorescencia de la clorofila a. Fluorómetro.

La medida de la emisión de la fluorescencia de la clorofila a se realizó mediante el método detallado en el apartado 3.5.1.1. Los resultados obtenidos con el fluorómetro se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Diferencias en F_0 , F_m y eficiencia fotoquímica del PSII en *M. arborea* cultivadas con cámaras con fluorescentes y LEDs.

	F_0	F_m	F_v/F_m
Fluorescentes	330,45± 97,1a	1372,48± 237,59 a	0,767±0,048 a
LED	380,2± 81,1 b	1442,67± 219,21 a	0,741±0,04 b

Las diferentes letras muestran diferencias significativas con un nivel de significación 0,05.

La medida del parámetro fluorescencia mínima (F_0) arroja valores significativamente diferentes ($p = 0.0321$) entre los dos tipos de iluminación (tabla 1) con valores 1,15 veces mayor en las plantas cultivadas en cámaras con LEDs que en las plantas cultivadas en cámaras con fluorescentes. No existen, sin embargo, diferencias significativas ($p = 0.235$) en la fluorescencia máxima (F_m) entre las plantas cultivadas en cámaras con LEDs y plantas cultivadas en cámaras con fluorescentes (tabla 1). Finalmente la relación entre fluorescencia variable (F_v) y fluorescencia máxima (F_v/F_m) es 1,02 veces mayor y

significativamente diferente en las plántulas cultivadas en cámaras con fluorescentes en comparación con las cultivadas en cámaras con el de LEDs.

4.3.1.2. Clorofila (SPAD)

En la figura 10 se muestran los valores de clorofilas por el método no destructivo (SPAD), tal como se detalla en el apartado 3.5.1.2. La cantidad de clorofilas medida con SPAD es 1,13 veces mayor en las hojas de las plantas crecidas en cámaras de cultivo con LEDs que en la de las plántulas crecidas en cámaras con fluorescentes, observándose diferencias significativas ($p=0.0003$) entre ambos sistemas.

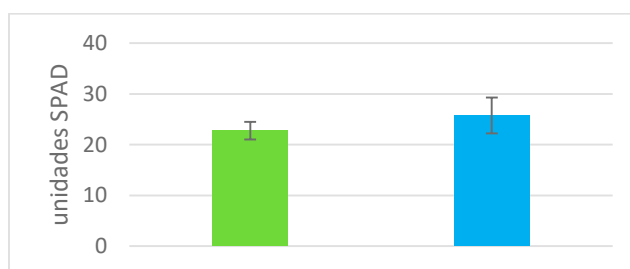


Figura 10. Unidades SPAD de las hojas de plántulas de *M. arborea* cultivadas en cámaras con fluorescentes (verde) y con LEDs (azul)

4.3.1.3. Pigmentos fotosintéticos

En la figura 11 se muestra el contenido de distintos pigmentos fotosintéticos (clorofilas, antocianinas y carotenoides) en las hojas de plántulas de *Medicago arborea* crecidas bajo las dos condiciones de iluminación (fluorescentes y LEDs) Como se observa, existen diferencias significativas en cuanto al contenido de clorofila a (Chl a) ($p= 0.022$), clorofila b (Chl b) ($p= 0.033$), clorofilas totales ($p= 0.0001$) y carotenoides ($p= 0.0001$) entre los dos tipos de iluminación, con valores 1,2, 1,17 , 1,42 y 1,83 veces superiores respectivamente en el caso de las plantas cultivadas en cámaras con fluorescentes. Las antocianinas, sin embargo, no muestran diferencias significativas ($p=0.458$) entre las dos fuentes de iluminación (fluorescentes y LEDs)

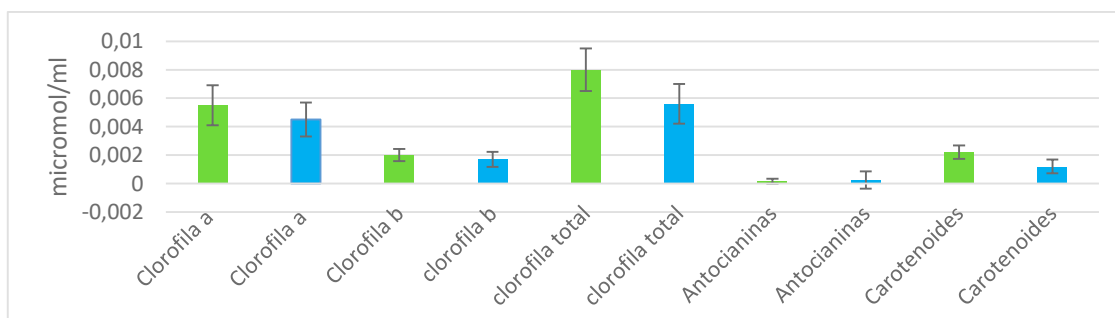


Figura 11. Cantidad de pigmentos (clorofila a, clorofila b, clorofilas totales, antocianinas y carotenoides), expresados en $\mu\text{mol/ml}$, extraídas de las hojas de plántulas de *M. arborea* cultivadas en cámaras con fluorescentes (verde) y con LEDs (azul)

4.3.2. Proteínas.

El contenido proteico total de albúminas y globulinas en los extractos de las plántulas de *Medicago* crecidas bajo los distintos tipos de iluminación se muestra en la figura 12.

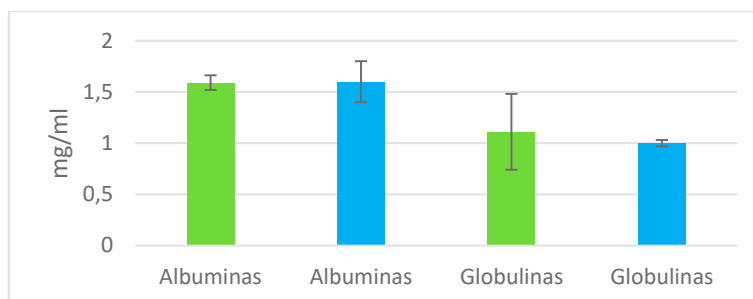


Figura 12. Cantidad de proteínas (mg/ml) de la parte aérea de plántulas de *M. arborea* cultivados en cámaras con fluorescentes (verde) y con LEDs (azul)

Se puede observar que no hay diferencias significativas ($p = 0.853$) en el contenido de albuminas entre los dos tipos de iluminación, lo mismo ocurre con el contenido de globulinas, donde se obtiene un p-valor de 0.466.

Sin embargo, la comparación entre el contenido de albuminas y globulinas arroja una diferencia significativa ($p < 0.0001$), habiendo más contenido de albuminas en los dos tratamientos que de globulinas.

4.3.3. Malondialdehído (MDA)

La medida de malondialdehído se determinó mediante el método detallado en el apartado 3.5.1.5.

En la figura 13 se muestra el contenido de malondialdehído ($\mu\text{mol/l}$) extraído de la parte aérea de plántulas de *M. arborea* cultivadas en cámaras con fluorescentes y con LEDs. Como podemos observar, aunque se encuentran valores superiores en la cantidad de malondialdehído en plantas crecidas en LEDs no hay diferencias significativas ($p=0.171$) entre las fuentes de iluminación.

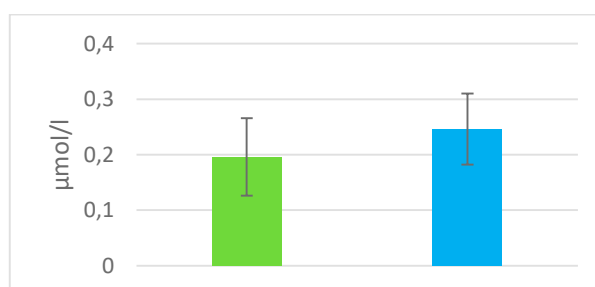


Figura 13. Contenido de malondialdehído ($\mu\text{mol/l}$) extraídas de la parte aérea de plántulas de *M. arborea* cultivadas en cámaras con fluorescente (verde) y con LEDs (azul)

4.3.4. Actividad de enzimas involucradas en estrés oxidativo.

4.3.4.1. Peroxidasa (POX)

La actividad peroxidasa se expresa en términos de nka/mg de proteína. La valoración de la actividad POX en la fracción de albúminas y globulinas extraídas de plántulas de *M. arborea* cultivadas en cámaras con fluorescentes y LEDs se puede observar en la figura 14. Esta actividad peroxidasa es significativamente superior en la fracción de albúminas que en la de globulinas en los dos tipos de iluminación. La actividad POX tanto en globulinas como en albúminas es significativamente superiores en las plántulas crecidas en cámaras de cultivo de LEDs.

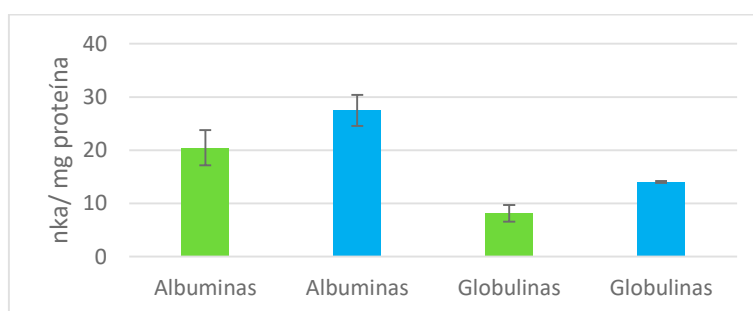


Figura 14. Actividad de la enzima peroxidasa en la fracción de albúminas y globulinas extraída de plántulas de *M. arborea* cultivados en cámaras con fluorescentes (verde) y con LEDs (azul)

4.3.4.2. Catalasa (CAT)

Con respecto a la actividad CAT es muy baja o indetectable en los extractos proteicos de las plántulas crecidas en las dos cámaras de cultivo ensayadas.

4.3.4.3. Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad SOD medida tanto en la fracción de albúminas como en la de globulinas, es significativamente diferente y mayor (1.49 y 1.64 veces respectivamente) en las plantas cultivadas en cámaras con LEDs que en las cámaras con fluorescentes como se puede apreciar en la figura 15. La actividad SOD tanto en globulinas como en albúminas es significativamente superiores en las plántulas crecidas en cámaras de cultivo de LEDs.

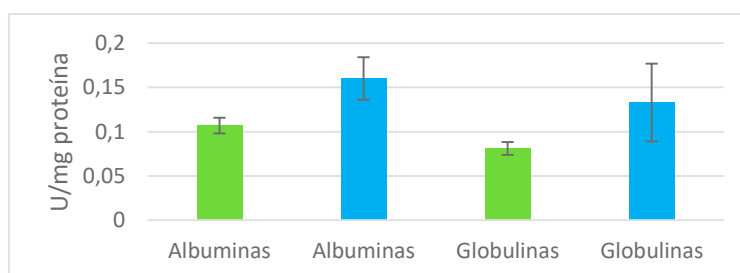


Figura 15. Actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) en la fracción de albúminas y globulinas extraída de plántulas de *M. arborea* cultivadas en cámaras con fluorescentes (verde) y con LEDs (azul).

4.3.5. Metabolitos secundarios

4.3.5.1. Análisis cuantitativo de flavonoides

4.3.5.1.1. Preparación de la recta patrón de flavonoides

Para la cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales se realizó la recta patrón respectiva, mediante la metodología descrita en el apartado 3.5.1.7.2.1. de la memoria. En la figura 16 se presenta la ecuación de la recta obtenida y el coeficiente de correlación lineal ($R^2=0,9913$).

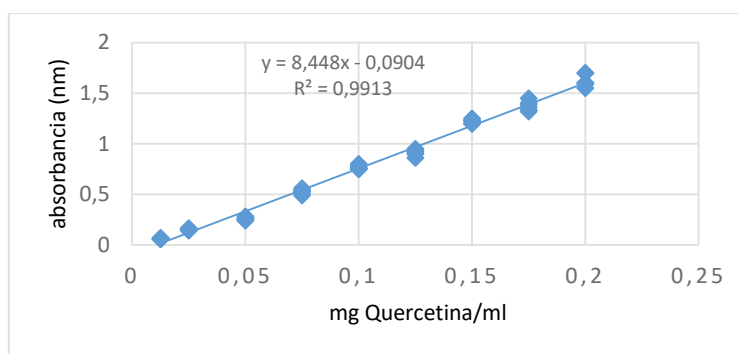


Figura 16. Recta patrón para cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales (quercetina) a 415 nm

4.3.5.1.2. Cuantificación de flavonoides (quercetina).

La determinación del contenido de flavonoides en la parte aérea de las plántulas de *Medicago arborea* crecidas en las dos cámaras de cultivo ensayadas (fluorescentes y LEDs) se realizó a partir de los extractos etanólicos según el procedimiento descrito en el apartado 3.5.1.7.2.2.

Los resultados obtenidos han sido expresados como mg de quercetina por gramo de peso seco y se muestran en la figura 17. Se pueden observar diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre los tipos de iluminación (LEDs y fluorescentes). La cantidad de flavonoides totales es 1,12 veces mayor en los extractos de plántulas cultivadas en cámaras con luces LEDs que en los extractos de plántulas crecidas en la cámara con fluorescentes.

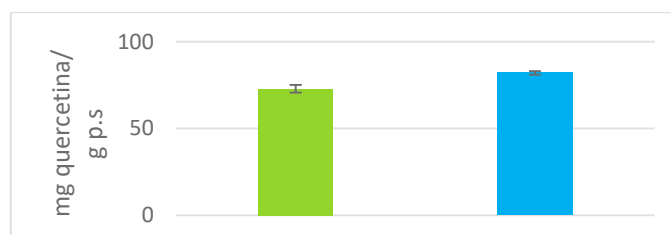


Figura 17. Contenido de flavonoides expresado como quercetina en los extractos etanólicos de plántulas de *M. arborea* cultivadas en cámaras con fluorescentes (verde) y con LEDs (azul)

4.3.5.2. Análisis cuantitativo de fenoles

4.3.5.2.1. Preparación de la recta patrón de fenoles

Para la cuantificación espectrofotométrica de fenoles totales se realizó la recta patrón respectiva, mediante la metodología descrita en el apartado 3.5.1.7.3.1 de la memoria. En la figura 18 se presenta la ecuación de la recta obtenida y el coeficiente de correlación lineal ($R^2=0,9822$).

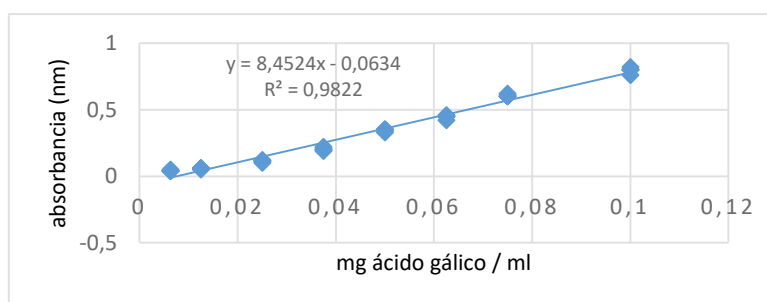


Figura 18. Recta patrón para cuantificación espectrofotométrica de fenoles totales (ácido gálico) a 760 nm

4.3.5.2.2. Cuantificación de fenoles (ácido gálico).

La determinación del contenido de flavonoides en la parte aérea de las plántulas de *Medicago arborea* crecidas en las dos cámaras de cultivo ensayadas (fluorescentes y LEDs) se realizó a partir de los extractos etanólicos según el procedimiento descrito en el apartado 3.5.1.7.3.2.

Los resultados obtenidos han sido expresados como mg de ácido gálico por gramo de peso seco y se muestran en la figura 19. Se pueden observar diferencias significativas ($p=0.0001$) entre los tipos de iluminación (LEDs y fluorescentes). La cantidad de fenoles totales es 1.3 veces mayor en los extractos de plántulas cultivadas en cámaras con luces LEDs que en los extractos de plántulas crecidas en la cámara con fluorescentes.

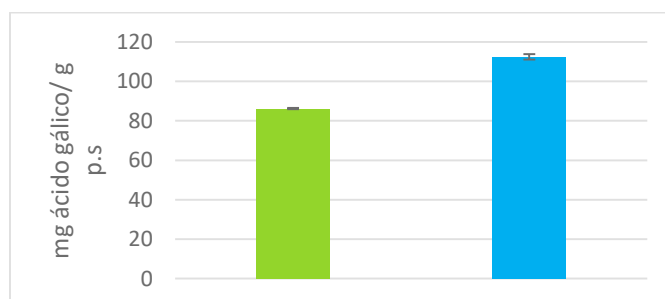


Figura 19. Contenido de fenoles totales, expresados como ácido gálico en los extractos etanólicos de plántulas de *M. arborea* cultivadas en cámaras con fluorescentes (verde) y con LEDs (azul)

4.3.6. Determinación de la actividad antioxidante (DPPH)

La determinación de la actividad o capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de las plántulas de *Medicago arborea* L. se llevó a cabo según el método DPPH descrito en

el apartado 3.5.1.8. Dicho procedimiento permite determinar la capacidad de neutralizar radicales libres por parte de un sustrato problema. Los resultados han sido expresados como porcentaje de reducción del DPPH y se muestran en la figura 20. Aquí podemos observar que existen diferencias significativas ($p < 0.0001$) en los extractos de las plántulas crecidas en cámara de cultivo diferentes en cuanto a la capacidad antioxidante siendo ésta significativamente mayor (% de reducción del DPPH 1.5 veces mayor) en la cámara de cultivo de LEDs.

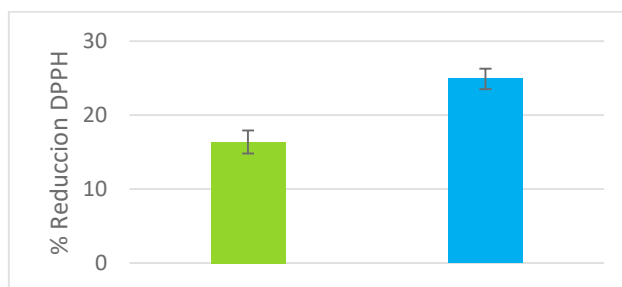


Figura 20. Porcentaje de reducción del DPPH en extractos etanólicos de plántulas de *M. arborea* cultivadas en cámaras con fluorescentes (verde) y con LEDs (azul)

5. DISCUSIÓN.

El efecto de la calidad de la luz difiere según la especie, la etapa de desarrollo y las condiciones ambientales de las plantas (Kurilcik *et al.*, 2008)

El espectro de luz afecta fuertemente el crecimiento y desarrollo de las plantas (Whitelam y Halliday, 2007). Hasta ahora se han aplicado muchas distribuciones espectrales diferentes para caracterizar el efecto de los LEDs en numerosas plantas (Chen *et al.*, 2014). Rocha *et al.* (2015) observaron una mayor longitud del hipocotilo en cultivos en patata con luces LEDs que con fluorescentes. Kim *et al.* (2004) y Rocha *et al.* (2010) ya habían observado plántulas de mayor longitud de crisantemo y fresa cuando se cultivaban bajo LEDs rojos que bajo otras fuentes de luz. En nuestro caso, no se encontraron diferencias en la longitud del hipocotilo, peso fresco y peso seco de la parte aérea y en el peso seco de la raíz entre el tratamiento con LEDs y fluorescentes. Sin embargo, se obtuvieron mayores valores de longitud y peso fresco de las raíces de las plantas cultivadas con fluorescentes.

El cultivo de *M. arborea* con iluminación LEDs, podría generar un estrés que se pone en manifiesto en las distintas medidas que se han llevado tanto de marcadores de daños oxidativo (MDA), como de metabólicos secundarios y actividades enzimáticas antioxidantes. Con el desarrollo del estrés, generado por la iluminación LEDs, en el

cloroplasto resulta limitante la generación de poder reductor (NADPH), convirtiendo al O_2 en aceptor de electrones, lo que deriva en un aumento en la generación de ROS. Estas moléculas conducen a la disminución de la eficiencia fotosintética en un proceso conocido como fotoinhibición, disminuyendo la producción de energía por parte de la planta. Sin embargo, las ROS también actúan como señales que inducen vías de defensa para regular las concentraciones de estas moléculas (Fernández, 2006). Estos mecanismos incluyen SOD, peroxidasa y catalasa, además de los mecanismos no enzimáticos.

El análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila a se realizó como una de las medidas para ver este posible estrés generado por el tipo de iluminación. Los valores de máxima eficiencia fotoquímica de PSII (Fv/Fm) muestran un valor significativamente más bajo luces LEDs. Este valor bajo en la máxima eficiencia fotosintética del PSII es un síndrome de estrés (Prieto *et al.*, 2009). La relación Fv/Fm se usa como indicador del rendimiento fotosintético máximo (Maxwell & Johnson, 2000). El parámetro F_0 es otro indicador del estrés de las plantas (Fracheboud *et al.*, 2004), muestra los niveles de fluorescencia cuando el conjunto aceptor de electrones de la plastoquinona está completamente oxidado. Representa la emisión de moléculas de clorofila a excitada antes de que la excitación pase a los centros de reacción y es independiente de los eventos fotoquímicos. Puede considerarse como una estimación del tamaño relativo de la antena del complejo PSII (Krause & Weiss, 1991). En nuestro trabajo, obtuvimos un valor significativamente más alto de F_0 en las plantas cultivadas en LEDs en comparación con las plantas cultivadas con fluorescentes. Este aumento es característico de la destrucción de los centros de reacción PSII (de la proteína D1 y otros componentes del centro de reacción) o deterioro de la transferencia de la energía de excitación de las antenas a los centros de reacción en las plantas superiores (Björkman & Demmig, 1987).

La medida de SPAD y la cantidad de clorofila medida con métodos destructivos muestran resultados contrarios, mientras que la medida de clorofila con SPAD es significativamente mayor con LEDs, la cantidad de clorofilas medidas con métodos destructivos es significativamente mayor con fluorescentes, al igual que la cantidad de carotenoides. Yi *et al.*, (2014) obtuvieron mayores concentraciones de carotenoides con luces fluorescentes que con LEDs rojos y rojo lejano. Las clorofilas son un indicador de salud y productividad de los cultivos y, además, el contenido de clorofila se ha usado como índice de la capacidad fotosintética (Bowyer & Leegood, 1997). Las tasas fotosintéticas están positivamente correlacionadas con las concentraciones de clorofila en las hojas. Por tanto, la reducción en el contenido en clorofilas puede ser considerada como

una respuesta de las plantas al estrés (Tenga *et al.*, 1989). Lo que concuerda con nuestro trabajo ya que en el tratamiento con LEDs es donde se muestra menor cantidad de clorofilas y valores de fluorescencia típicos de estado de estrés.

Este estrés abiótico generado por la iluminación puede observarse también en los valores significativamente más altos de metabolitos secundarios en las cámaras con LEDs que pueden suponer protección frente al estrés (Mittler 2002). Esto se hace especialmente visible con las medidas de actividad DPPH y contenido de metabolitos implicados en la respuesta no enzimática al estrés oxidativo. Estos valores más altos nos indican dos cosas, por un lado que el cultivo de plántulas de *M.arborea* en cámaras con LEDs implica un mayor estrés que lleva a la activación de los mecanismos de defensa de las células. Lattanzio *et al.* (2006) demuestran la producción de compuestos fenólicos como mecanismos de protección. Por otro lado, esta acumulación muestra que los LEDs generan un enriquecimiento en compuestos fitoquímicos (Liu, 2003). Estas mayores concentraciones de fenoles y flavonoides se produce en respuestas a la luz azul (Ouzounis *et al.*, 2014; Taulavuori, 2017). Bantis *et al.* (2016) observaron la acumulación de compuestos fenólicos en la albahaca al iluminarla con LEDs con alta proporción de luz azul. Pero no solo la luz azul produce este aumento en compuestos fotoquímicos, las proporciones específicas entre la luz azul y roja son importantes en algunas especies. Wu & Lin (2012) comprobaron que en *Protea cynaroides* la cantidad de compuestos fenólicos era mayor al iluminar con una combinación de luces LEDs rojas y azules. Además en muchos estudios, el aumento de los fenoles bajo luz azul, se acopla con el aumento de la actividad antioxidante como en *Kalanchoe pinnata* (Nascimento *et al.*, 2013). De forma similar, la luz azul aumenta el contenido de fenoles totales y flavonoides y las actividades de las enzimas antioxidantes en la hoja y la raíz de distintas plantas medicinales (Taulavuori, 2017). Lo mismo ocurre en otras especies al combinar la luz azul con la roja. Bian *et al.*, (2016) vieron que la combinación de luz roja y azul aumentaba la concentración de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en la lechuga.

Por otro lado, la luz azul también produce la acumulación de antocianinas en los frutos de arándanos, pertenecientes al grupo de los flavonoides (Zoratti *et al.*, 2014). Esto también se vio en el kale chino, donde la luz azul indujo la acumulación de antocianinas junto con los flavonoides y el aumento de la actividad antioxidante (Qian *et al.*, 2016). En nuestro caso, no vemos diferencias significativas en el contenido de antocianinas sin embargo, en las cámaras con LEDs el contenido de antocianinas es ligeramente superior, lo que concuerda con los estudios citados.

Por otra parte, en los mecanismos de defensa enzimáticos, vemos que en la actividad SOD y peroxidasa es mayor en el tratamiento con LEDs. Sin embargo, no se observa apenas actividad de la catalasa en ninguno de los tratamientos. El balance entre la actividad celular de SOD, peroxidasa (y/o CAT) es considerado crucial para mantener en estado estacionario el nivel de O_2 y H_2O_2 (Fernández, 2006). Puede ser que no se encuentre apenas actividad catalasa por que el H_2O_2 se esté eliminando por la peroxidasa.

Finalmente, el MDA, uno de los productos finales de la peroxidación de lípidos, es una medida indirecta del daño celular inducido por el estrés oxidativo (Reyes *et al.*, 2012). No se han observado diferencias significativas en el contenido de MDA. Sin embargo, el contenido de MDA en plántulas cultivadas con LEDs es ligeramente mayor; lo que puede interpretarse como que hay mayor estrés oxidativo en el tratamiento con LED. Cho y Seo (2005) también encontraron que en condiciones de estrés, los contenidos de H_2O_2 y MDA eran mayores en relación a controles sin estrés y esto es consecuente con el aumento de las actividades enzimáticas antioxidantes SOD y peroxidasa.

En nuestro estudio se observó una respuesta diferencial en el crecimiento de las raíces en relación con el mecanismo regulador de la respuesta antioxidante inducida por la luz y ROS. Las actividades de las enzimas antioxidantes (peroxidasa y SOD) y los metabolitos secundarios antioxidantes fueron mayores en el tratamiento con LEDs. Esto muestra que las plantas están usando sus recursos para defenderse frente al estrés generado por la iluminación. Además, la actividad peroxidasa está relacionada con la degradación de auxinas, hormonas que tienen un papel central en la formación de raíces adventicias Blakesley (1994). Esta degradación de las auxinas por la peroxidasa ocurre a mayor velocidad en presencia de fenoles y agua oxigenada, al final los menores niveles de auxinas afecta al crecimiento de la raíz. Banque *et al.*, (2010) llegaron a la conclusión de que la eliminación del H_2O_2 es esencial para el crecimiento de las raíces. En este mismo estudio obtuvieron resultados similares a los nuestros donde la iluminación con LEDs induce mayores niveles de peroxidasa para mitigar los efectos tóxicos del H_2O_2 . Estudios con luces ultravioletas (con longitud de onda de 404 nm) muestran también un aumento en la acumulación de compuestos fenólicos que llevan a una disminución en el crecimiento de la raíz. Hay por lo tanto, una relación inversa entre el contenido de compuestos fenólicos y el crecimiento radicular (Batish *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos, pueden explicarse en función del espectro de las distintas cámaras. Mientras que la cámara con fluorescentes presenta los picos de absorción del

azul, rojo y verde, en la cámara con LEDs el pico del verde no se alcanza de forma adecuada. Wu *et al.* (2007) postulan que la emisión del espectro de luz roja está cerca del punto de máxima absorción por las clorofilas y los fitocromos y es importante para el desarrollo del aparato fotosintético y para la acumulación de almidón y que la luz azul es relevante para el desarrollo del cloroplasto, la formación de clorofilas y la apertura de los estomas. Sin embargo, la luz verde se considera un tipo de energía menos relevante para la fotosíntesis debido a su bajo coeficiente de absorción (Kim *et al.*, 2004).

6. CONCLUSIONES

- La iluminación en cámaras de cultivo con LEDs genera mayor estrés oxidativo que la iluminación con luces fluorescentes en el cultivo *in vitro* de *M. arborea* L.
- La iluminación de las cámaras de cultivo (con fluorescentes o LEDs) no afecta ni a la longitud del hipocotilo de las plántulas de *M. arborea* L. cultivadas *in vitro*, ni a la biomasa de la parte aérea. Sin embargo, si afecta de forma significativa a la longitud de las raíces siendo mayor en las plántulas cultivadas en cámaras de cultivo con LEDs.
- La cantidad de pigmentos fotosintéticos al igual que la eficiencia del fotosistema II, es mayor en las plántulas cultivadas en cámaras con fluorescentes que con LEDs.
- Los mayores valores de MDA, aunque no significativos, encontrados en plántulas cultivadas en cámaras de cultivo con LEDs son una muestra del estrés que produce este tipo de iluminación sobre las plántulas cultivadas *in vitro*
- Las plántulas de alfalfa arbórea cultivadas *in vitro* en cámaras con luces LEDs presentan una activación de los mecanismos de defensa tanto enzimáticos como no enzimáticos mayores que en las plántulas cultivadas con luces fluorescentes.
- La menor longitud de las raíces de las plántulas cultivadas en cámaras con LEDs podría ser debida a que las plántulas usen los recursos que tiene para defenderse del estrés y no para su desarrollo.
- El cultivo *in vitro* en cámaras de cultivo con luces LEDs interesa para cultivos donde el objetivo sea aumentar los compuestos fitoquímicos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Azcón, R., & Tobar, R. 1998. Activity of nitrate reductase and glutamine synthetase in shoot of mycorrhizal *Allium cepa*. Effect of drought stress. *Plant Science*, 133: 1-8.
2. Bantis, F., Ouzounis, T., & Radoglou, K. 2016. Artificial LED lighting enhances growth characteristics and total phenolic content of *Ocimum basilicum*, but variably affects transplant success. *Scientia Horticulturae*, 198: 277-283.

3. Baque, M. A., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. 2010. Induction mechanism of adventitious root from leaf explants of *Morinda citrifolia* as affected by auxin and light quality. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(1): 71-80.
4. Batish, D.R., Singh, H.P., Kaur, S., Kohli, K.R., & Yadav, S.S. 2008. Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*). *J. Plant Physiol*, 165:297–305.
5. Bian, Z. H., Cheng, R. F., Yang, Q. C., Wang, J., & Lu, C. 2016. Continuous light from red, blue, and green light-emitting diodes reduces nitrate content and enhances phytochemical concentrations and antioxidant capacity in lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 141(2): 186-195
6. Bjorkman, O., & Demmig, B. 1987. Photon yield for O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170:489–504
7. Blakesley, D. 1994. Auxin metabolism and adventitious root initiation. *Basic life sciences*, 62: 143-143.
8. Blokhina, O. B., Fagerstedt, K. V., & Chirkova, T. V. 1999. Relationships between lipid peroxidation and anoxia tolerance in a range of species during post-anoxic reoxygenation. *Physiologia Plantarum*, 105(4): 625-632.
9. Bowler, C., Montagu, M. V., & Inze, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual review of plant biology*, 43(1): 83-116.
10. Bowyer, J. R., & Leegood, R. C. 1997. Plant biochemistry. *Plant biochemistry*.
11. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1): 25-30.
12. Chen, X. L., Guo, W. Z., Xue, X. Z., Wang, L. C., & Qiao, X. J. 2014. Growth and quality responses of ‘Green Oak Leaf’ lettuce as affected by monochromatic or mixed radiation provided by fluorescent lamp (FL) and light-emitting diode (LED). *Scientia Horticulturae*, 172: 168-175.
13. Cho, U.H., & Seo N.H. 2005. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science*, 168 (1): 113-120
14. Elstner, E. 1991. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. *Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism.*, 6: 13-26.
15. Elstner, E. F., & Osswald, W. 1994. Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, 102: 131-154.
16. Fernández, C. 2006. Cuantificación de los sistemas antioxidantes en raíces de *Nothofagus dombeyi* (MIRB.) OERST. micorrizadas bajo condiciones de estrés hídrico. *Tesis de Licenciatura*, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
17. Ferrer, M.A., Calderón, A. A., Muñoz, R., & Ros Barcerló, A. 1990. 4-Methoxy- α -naphthol as a specific substrate for kinetic, zymographic and cytochemical studies on plant peroxidase activities. *Phytochemical analysis*, 1(2): 63-69.
18. Folta, K.M., & Childers, K.S. 2008. Light as a growth regulator: controlling plant biology with narrow band width solid-state lighting systems. *HortScience*, 43: 1957–1964.
19. Fracheboud, Y., Jompuk, C., Ribaut, J.M., Stamp, P., & Leipner, J. 2004. Genetic analysis of cold-tolerance of photosynthesis in maize. *Plant Molecular Biology* 56:241–253.
20. Gardner, P. R., & Fridovich, I. 1991. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (3):1478-1483.
21. Gupta, M., Sharma P., Sarin N.B., & Sinha, A.K. 2009. Differential response of arsenic stress in two varieties of *Brassica juncea* L. *Chemosphere*, 74: 1201-1208
22. Halliwell, B., & Gutteridge, J. 1989. *Free radicals in biology and medicine*. 543 págs. Clarendon Press. Oxford, UK.
23. Jiménez, A., Hernández, J. A., Pastori, G., del Río, L. A., & Sevilla, F. 1998. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant physiology*, 118(4): 1327-1335.

24. Kagan, V. E. 1989. Tocopherol stabilizes membrane against phospholipase A, free fatty acids, and lysophospholipids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 570(1): 121-135.
25. Kim, H.H., Goins, G.D., Wheeler, R.M., & Sager, J.C. 2004. Green-light supplementation for enhanced lettuce growth under red- and blue-light-emitting diodes. *HortScience*, 39: 1617–1622.
26. Kopsell, D. A., Kopsell, D. E., Lefsrud, M. G., Curran-Celentano, J., & Dukach, L. E. 2004. Variation in lutein, β -carotene, and chlorophyll concentrations among *Brassica oleracea* cultivars and seasons. *HortScience*, 39(2): 361-364
27. Krause, G. H., & Weiss, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis; the basics. *Annual Review of Plant Physiology* 42:313–349
28. Kurilcik, A., Canova, M. R., Dapkuniene, S., Zilinskaite, S., Kurilcik, G., Tamulaitis, G., Duchovskis, P., & Zukauskas, A. 2008. *In vitro* culture of Chrysanthemum plantlets using light emitting diodes. *Cent Eur J Biol* 3:161–167
29. Lattanzio, V., Lattanzio, V. M., & Cardinali, A. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*, 661: 23-67.
30. Liu, R. H. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American journal of clinical nutrition*, 78(3): 517S-520S.
31. Lock, O., Cabello, I., & Doroteo, V.H. 2006. Analysis of flavonoids in plants. [en línea]. Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Ciencias, Sección Química. Lima, Perú
32. Maldonado, C., & Pahlich, E. 2004. Dinámica autogenerativa del sistema antioxidativo en plantas. *Fisiología ecológica en plantas*. 27-41.
33. Martín, J.P., Pintos, B., Rebordinos, I., Villalobos, N., Guerra, H., & Martín, L. 2000. Embryogenic response in different *Medicago arborea* L. explants depending on cytokinin/auxin balances. *Journal of Plant Physiology*, 156: 801-804
34. Maxwell, K., & Johnson, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51:659–668
35. Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9): 405-410.
36. Muñoz, R., & Ros Barceló, A. 1996. En *Handbook of Food Analysis*. Ed. Leo M.L. págs. 331-330. Mollet. Hogeschool Gent Ghent, Belgium.
37. Murashige, T., & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3): 473-497
38. Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., & Allakhverdiev, S.I. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(6): 414-421.
39. Nascimento, L., Leal-Costa, M. V., Coutinho, M. A., & Tavares, E. S. 2013. Increased antioxidant activity and changes in phenolic profile of *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon (*Crassulaceae*) specimens grown under supplemental blue light. *Photochemistry and photobiology*, 89(2): 391-399.
40. Nhut, D.T., Hong, L.T.A., Watanabe, H., Goi, M., & Tanaka, M. 2002. Growth of banana plantlets cultured *in vitro* under red and blue light-emitting diode (LED) irradiation source. *Acta Horticulturae*, 575:117–124.
41. Ouzounis, T., Fretté, X., Rosenqvist, E., & Ottosen, C. 2014. Spectral effects of supplementary lighting on the secondary metabolites in roses, chrysanthemums, and campanulas. *Journal of Plant Physiology*, 171: 1491–1499.
42. Prieto, P., Peñuelas, J., Llusia, J., Asensio, D., & Estiarte, M. 2009. Effects of long-term experimental night-time warming and drought on photosynthesis, Fv/Fm and stomatal conductance in the dominant species of a Mediterranean shrubland. *Acta Physiol Plant* 31:729–739
43. Prochazkova, D., Sairam, R. K., Srivastava, G. C., & Singh, D. V. 2001. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*, 161(4): 765-771.

44. Qian, H., Liu, T., Deng, M., Miao, H., Cai, C., Shen, W., & Wang, Q. 2016. Effects of light quality on main health-promoting compounds and antioxidant capacity of Chinese kale sprouts. *Food chemistry*, 196: 1232-1238
45. Reyes, Y., Martinez, L., Rosabal, L., Mazorra, L. M., Pieters, A., & Núñez-Vázquez, M. 2012. Efecto de la 24-epibrasinólida en el crecimiento, los niveles de prolina y de malondialdehído de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) sometidas a estrés salino. *Cultivos Tropicales*, 33(1): 19-27.
46. Richardson, A. D., Duigan, S.P., & Berlyn, G.P. 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*, 153: 185–194.
47. Rocha, P. S. G., de Oliveira, R. P., & Scivittaro, W. B. 2015. New light sources for *in vitro* potato micropropagation. *Bioscience Journal*, 31(5).
48. Rocha, P. S. G., Oliveira, R. P., Scivittaro, W. B., & Santos, U. L. 2010. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. *Ciência Rural*, 40: 1922-1928.
49. Samuolienė, G., Brazaitytė, A., Sirtautas, R., Viršilė, A., Sakalauskaitė, J., Sakalauskienė, S., & Duchovskis, P. 2013. LED illumination affects bioactive compounds in romaine baby leaf lettuce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13): 3286-3291.
50. Scandalias, J. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 101: 7-72
51. Singleton V. L., & Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3): 144-158.
52. Skulachev, V.P. 1997. Membrane-linked systems preventing superoxide formation. *Bioscience reports*, 17(3): 347-366.
53. Smirnoff, N. 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current opinion in plant biology*, 3(3): 229-235.
54. Sugimoto, M. 1997. Molecular cloning and characterisation of a cDNA encoding putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from spinach. *Bioscience, Biotech. and Biochem.* 61: 1379-13891
55. Taulavuori, E., Taulavuori, K., Holopainen, J. K., Julkunen-Tiitto, R., Acar, C., & Dincer, I. 2017. Targeted use of LEDs in improvement of production efficiency through phytochemical enrichment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
56. Tenga, A. Z., Marie, B. A., & Ormrod, D. P. 1989. Leaf greenness meter to assess ozone injury to tomato leaves. *HortScience (USA)*.
57. Turrens, J. F., Freeman, B. A., & Crapo, J. D. 1982. Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 217(2): 411-421
58. Whitelam, G., & Halliday, K., 2007. *Light and Plant Development*. 313 págs. Blackwell Publishing. Oxford.
59. Wink, M., 2010. *Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. Annual Plant Reviews*. 410 págs. Wiley-Blackwell, Oxford.
60. Wojciechowska, R., Długosz-Grochowska, O., Kolton, A., & Żupnik, M. 2015. Effects of LED supplemental lighting on yield and some quality parameters of lamb's lettuce grown in two winter cycles. *Scientia Horticulturae*, 187: 80-86.
61. Wu, H. C., & Lin, C. C. 2012. Red light-emitting diode light irradiation improves root and leaf formation in difficult-to-propagate *Protea cynaroides* L. plantlets *in vitro*. *HortScience*, 47(10): 1490-1494.
62. Wu, MC., Hou, CY., Jiang, CM., Wang, YT., Wang, CY., Chen, HH., & Chang, HM. 2007. A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings. *Food Chemistry*, 101(4): 1753-1758.
63. Yi, Z. L., Huang, W. F., Ren, Y., Onac, E., Zhou, G. F., Peng, S., & Li, H. H. 2014. LED lights increase bioactive substances at low energy costs in culturing fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Scientia Horticulturae*, 175: 139-143
64. Zoratti, L., Sarala, M., Carvalho, E., Karppinen, K., Martens, S., Giongo, L., & Jaakola, L. 2014. Monochromatic light increases anthocyanin content during fruit development in bilberry. *BMC plant biology*, 14(1): 377.