



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Manual de prácticas de laboratorio

Fisiología y Bioquímica Vegetal

Fernando **D**íaz de León **S**ánchez

David **D**íaz **P**ontones

Ma. de Lourdes **M**artínez **C**árdenas

Laura Josefina **P**érez **F**lores

Denise **R**addatz **M**ota

Fernando **R**ivera **C**abrera



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Dr. Salvador Vega y León
Rector General

Mtro. Norberto Manjarrez Álvarez
Secretario General

UNIDAD IZTAPALAPA

Dr. Javier Velázquez Moctezuma
Rector de Unidad

Dr. Miguel Ángel Gómez Fonseca
Secretario de Unidad

Dra. Edith Ponce Alquicira
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Dra. Milagros Huerta Coria
Coordinadora de Extensión Universitaria

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas
Jefe de la Sección de Producción Editorial

Primera Impresión 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina,
Del. Iztapalapa, C.P 09340, México D.F. Tel.: 5804 4600

Impreso y hecho en México/*Printed in Mexico*

Índice

Introducción	5
Germinación y vigor de las semillas	7
Efecto de la luz y temperatura en la germinación de semillas de tuna	15
Actividad de la α -amilasa durante la germinación y en respuesta a giberelinas	21
Potencial hídrico	29
Transporte de agua y transpiración	33
Nutrición mineral	37
Efecto de auxinas en el enraizamiento de ramas de hiedra	43
Pigmentos vegetales como indicadores de acidez o alcalinidad	47
Inhibición de la senescencia de flores de clavel	53
Inhibición de senescencia foliar	57
Anexo	69

Introducción

El Manual de Prácticas de Fisiología y Bioquímica Vegetal está elaborado con base en el programa de la UEA Fisiología y Bioquímica Vegetal del plan de estudios de la Licenciatura en Biología Experimental, recientemente aprobado por el Colegio Académico de nuestra institución y que entró en vigor en el trimestre 13-I.

Este manual está constituido por 10 prácticas de laboratorio que apoyan los temas relacionados con el crecimiento, desarrollo y metabolismo de la planta del programa de esta UEA. Dichas prácticas ilustran los temas de forma objetiva, permitiéndole al alumno investigar, procesar e interpretar los resultados obtenidos, reforzando el conocimiento teórico del alumno en los diferentes temas de Fisiología y Bioquímica Vegetal. Los materiales y equipos utilizados en el desarrollo de las prácticas aquí planteadas son de fácil acceso o de uso común.

Germinación y vigor de las semillas

Introducción

Las semillas constituyen dentro del ciclo de vida de las plantas, la unidad de dispersión y el medio de perpetuación de la especie, a la vez que son importantes como fuente alimenticia para el hombre y muchas otras especies. Las características de viabilidad y vigor de una especie de interés, pueden ser observadas en una curva de germinación o a través de otras técnicas, tales como la prueba de tinción con tetrazolio. El vigor es un atributo de las semillas viables capaces de germinar. Las pruebas de germinación y vigor se usan para evaluar los efectos del deterioro sobre el comportamiento de las semillas.

Para determinar el efecto de las condiciones ambientales en las semillas almacenadas, es útil producir un envejecimiento en ellas, el cual puede ser evaluado mediante pruebas de vigor y de germinación en comparación con un testigo sin tratar.

Objetivo general

Determinar la viabilidad y el vigor de los granos de maíz (*Zea mays* L.) sanos y envejecidos.

Objetivos particulares

Hacer una curva de germinación de los granos de maíz para determinar su viabilidad.

Determinar el efecto del estrés por calor en la viabilidad de las semillas de maíz.

Evaluar el vigor de un lote de granos de maíz mediante la prueba de tetrazolio.

Determinar el efecto del estrés por calor en el vigor de granos de maíz mediante la prueba de tetrazolio.

Materiales y métodos

Material por equipo

- 1 recipiente para siembra
- Hojas de papel filtro o toallas absorbentes
- 2 vasos de precipitados de 250 ml
- 3 navajas de costilla
- 5 tubos de ensayo grandes con tapón de rosca
- 1 gradilla
- 1 piceta
- Gasas de algodón o red de plástico

Material por grupo

- 2 parrillas eléctricas
- 2 termómetros
- 2 vasos de precipitados de 1 L
- 1 probeta de 1 L
- Blanqueador o cualquier otra solución de cloro comercial
- Marcador indeleble y cinta adhesiva para etiquetar
- Papel aluminio

Material biológico

100 granos de maíz (*Zea mays* L.) por equipo

Reactivos

Solución de 2,3,5-trifenil-tetrazolio al 1% p/v.

Cloruro de amonio (NH_4Cl)

Metodología

Tratamientos y siembra de semillas

24 HORAS ANTES DE LA PRÁCTICA

1. Preparar una solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % p/v; tomar 1 parte de blanqueador y diluirlo en 3 partes de agua destilada. Usar blanqueador comercial Cloralex o el Chinito; con una concentración de hipoclorito de sodio entre el 5 al 6% p/v de ingrediente activo (ver Anexo). Se seleccionarán 100 granos de maíz y se desinfectarán con la solución de hipoclorito de sodio 1.5% p/v durante 3 minutos. Posteriormente, se enjuagarán los granos de maíz con agua destilada hasta que desaparezca el olor a cloro.
2. Se separarán cuatro lotes de 25 granos cada uno. El lote 1 (T0) será el testigo, a los tres lotes restantes se les aplicarán los siguientes tratamientos de envejecimiento:

T1. Estrés por calor (tiempo corto)

Los granos se sumergirán dentro de una malla de gasa en agua caliente a 70 °C, durante 30 segundos. Posteriormente, se colocarán sobre papel absorbente para eliminar el exceso de agua y se dejarán enfriar a temperatura ambiente. El daño causado en las semillas por este método se basa en el efecto de las altas temperaturas en la desnaturalización de las proteínas.

T2. Estrés por calor (tiempo largo)

Los granos se colocarán dentro de una malla de gasa y se sumergirán en agua caliente a 70 °C, durante 2 minutos. Posteriormente, se colocarán sobre papel absorbente para eliminar el exceso de agua y se dejarán enfriar a temperatura ambiente.

T3. Inmersión en cloruro de amonio

Los granos se sumergirán en una solución de NH_4Cl al 4% p/v durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavarán con agua destilada y se colocarán sobre papel absorbente para eliminar el exceso de agua. El daño causado se basa en un aumento de la permeabilidad del pericarpio/testa y la acumulación de niveles tóxicos de la sal en el interior de la semilla.

3. Sembrar cada lote (15 granos por lote) entre hojas de toalla absorbente humedecidas (técnica con papel, envolviendo en forma de "taco"), etiquetar y dejar en la estufa a 25 °C (ver Anexo).

Medición de parámetros de vigor

Curva de germinación

1. Observar los granos sembrados cada 6 h a partir de las 12 h de iniciada la embibición hasta alcanzar las 72 h. Contar el número de granos que han germinado en cada tiempo. Calcular el porcentaje de germinación en cada observación mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Germinación (\%)} = (\text{Número de granos germinados} / \text{total de granos utilizados}) \times 100$$

2. Tabular y graficar los datos.

Velocidad de crecimiento de la radícula

1. A partir del momento de germinación (cuando la radícula haya roto el pericarpio y haya alcanzado por lo menos 3 mm de longitud) medir el crecimiento de la radícula cada 12 h en cada lote hasta alcanzar las 72 h.
2. Tabular los datos

Prueba de tetrazolio

1. Seleccionar 10 granos de maíz de cada uno de los lotes de tratamientos previamente utilizados (T0, T1, T2 y T3).
2. Cortar los granos de cada uno de los lotes (T0, T1, T2 y T3) longitudinalmente con la navaja de costilla, asegurándose de dejar expuesto el embrión (Ver Fig. 1).

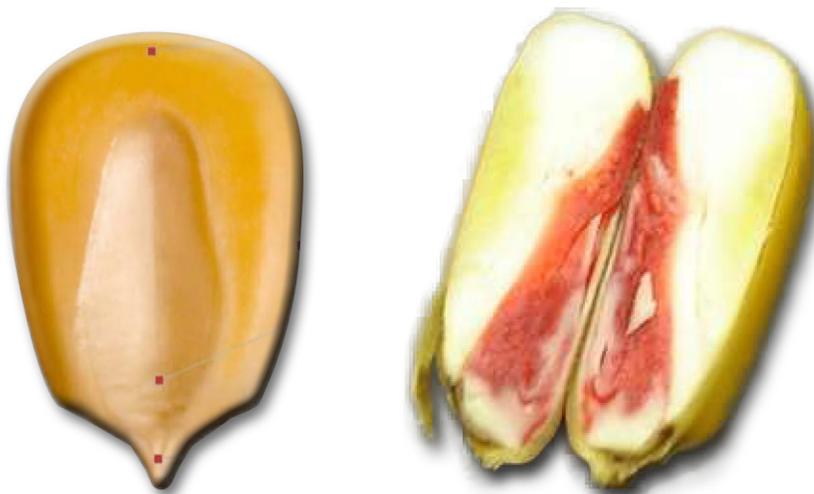


Figura 1. Corte longitudinal de una semilla de maíz.

3. Tomar los granos, descartar una mitad de cada uno y poner la otra mitad en un tubo de ensayo con suficiente solución de tetrazolio para cubrirlos y envolver completamente el tubo con papel negro. Hacer lo mismo con cada lote.
4. Dejar los tubos a temperatura ambiente durante una hora.
5. Examinar la superficie del corte buscando si hubo algún cambio de color. Si los granos están vivos, el reactivo se tornará de color rojo.
6. Contar el número de granos teñidos en cada caso (si no se completa la observación durante el horario del laboratorio, se pueden guardar en el refrigerador los tubos con los granos en tetrazolio para hacer más lentas las reacciones enzimáticas y observarlas al día siguiente).

Determinar el número de granos viables con la siguiente fórmula:

$$\text{viabilidad (\%)} = (\text{número de granos teñidos en rojo} / \text{número total de granos}) \times 100$$

Resultados

NOTA: para elaborar el reporte, se deben complementar todos los resultados con los de los otros equipos.

1. Construir una curva de germinación para todos los lotes graficando el porcentaje de granos germinados (y) contra el tiempo de imbibición en horas (x).
2. Señalar en la curva correspondiente el tiempo cuando se alcance el 50% de germinación en las semillas de cada lote (velocidad de germinación).
3. Graficar la longitud de la radícula (mm) contra el tiempo de germinación (h) para cada lote.
4. Comparar los resultados de los parámetros de vigor (curva de germinación y velocidad de crecimiento de la radícula), con los resultados de la prueba de tetrazolio.

Cuestionario

1. ¿Qué es germinación?
2. ¿Qué es vigor?
3. ¿Qué es viabilidad?
4. ¿Cómo afectan las condiciones ambientales de las semillas almacenadas el deterioro de las mismas?
5. La sal de tetrazolio es un indicador que por acción química o fotoquímica se reduce a un componente insoluble (trifenilformazán) de color rojo brillante. ¿Qué lo reduce en las semillas?

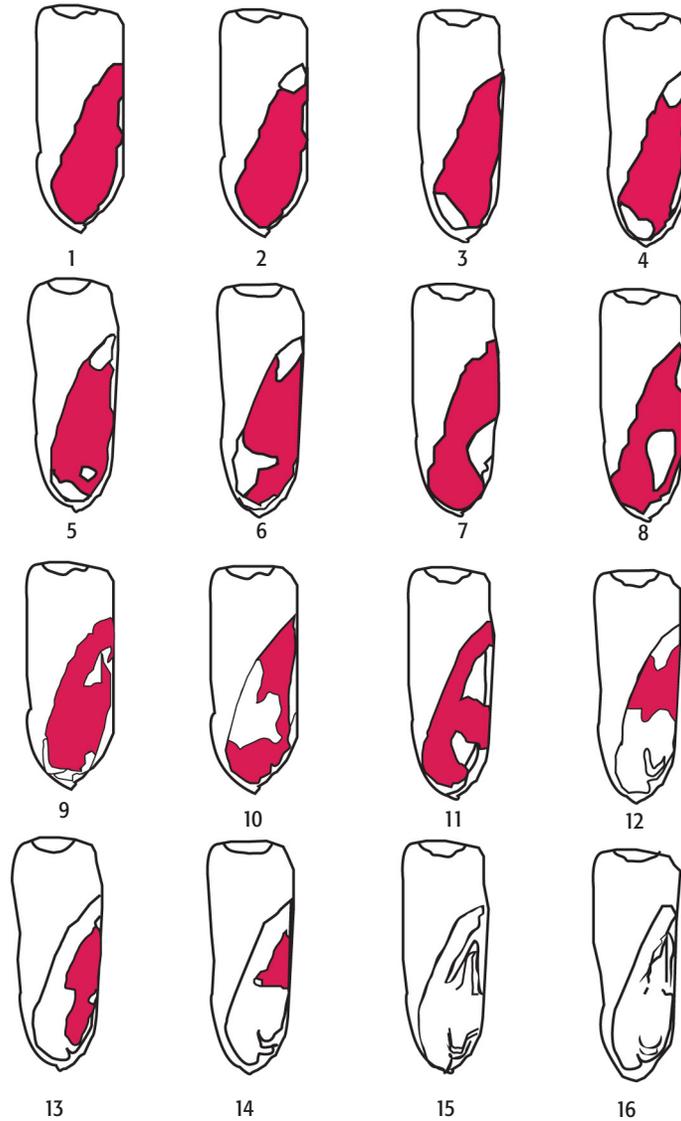
Bibliografía

-  Bidwell, R.G.S. 1993. Fisiología Vegetal. AGT Editor, S.A. México.
-  Salisbury, F.B y Ross, C. W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México D.F. México.
-  Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. 2000. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologist. USA.
-  Azcón-Bieto J. Y Talón, M. 2003. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. 1ª edición, España.
-  Nicolás, G., Bradford, K.J, Côme, D., Pritchard, H.W. 2003. The Biology of Seeds: Recent Research Advances. CABI Publishing.
-  Hopkins, W., Hüner N. 2004. Introduction to Plant Physiology. John Wiley 3ª edición USA.
-  Taiz, L., Zeiger, E. 2010. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc. 5ª edición USA.

Guía para la evaluación de la prueba de tetrazolio en maíz

Tomado de: Padilla, J.D. Prueba de viabilidad con tetrazolio. Laboratorio Central de Referencia. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas.

Maíz



1. VIABLE. El embrión completo se tiñe de un color rojo brillante.

2-4 VIABLE. Los extremos del escutelo no se tiñen.

5-6 VIABLE. Los extremos del escutelo no se tiñen; las partes no críticas de la radícula no se tiñen.

7-8 NO VIABLE. No se tiñe el área donde se originan las raíces seminales.

9 NO VIABLE. La plúmula no se tiñe.

10 NO VIABLE. La parte central del escutelo y el área donde se desarrollan las raíces seminales no se tiñen.

11 NO VIABLE. La plúmula y la radícula no se tiñen.

12 NO VIABLE. Las áreas sin tinción del escudete inferior y la de la radícula se extienden hasta la región donde no desarrollan las raíces seminales.

13 NO VIABLE. El escutelo no se tiñe.

14 NO VIABLE. El escutelo y la radícula no se tiñen.

15 NO VIABLE. La tinción es de color rosa muy débil.

16 NO VIABLE. Todo el embrión queda sin teñirse.

Efecto de la luz y temperatura en la germinación de semillas de tuna

NOTA: Esta práctica se realiza en varias sesiones.

Introducción

Las angiospermas son plantas que forman semillas, encontrándose dos tipos de semillas: las recalcitrantes y las ortodoxas. En las primeras, una vez que se alcanza la madurez se inicia el proceso de germinación; en las segundas, después de alcanzar la madurez se deshidratan y entran a un proceso de latencia permitiendo que sobrevivan en condiciones adversas, y germinando cuando se restablecen las condiciones óptimas de crecimiento. La semilla cuenta con los mecanismos necesarios para detectar los cambios ambientales e iniciar el proceso de germinación. Los factores ambientales que están involucrados en la estimulación del proceso germinativo son principalmente: la calidad e intensidad de la luz, su duración, la temperatura, la disponibilidad de agua y oxígeno, entre otros.

Objetivo general

Observar el efecto de la luz y temperatura en la germinación de semillas de tuna.

Objetivos particulares

1. Determinar el porcentaje de viabilidad de las semillas.
2. Determinar el efecto de la luz en el porcentaje de germinación.
3. Determinar el efecto de la temperatura en el porcentaje de germinación.

Materiales y métodos

Material por equipo

- 9 cajas de Petri
- 8 círculos de papel filtro
- 2 pinzas de disección
- 1 *navaja o bisturí
- 1 pipeta graduada de 10 ml
- 1 bulbo para pipeta
- 2 termómetros
- 1 mechero de gas o de alcohol
- *2 botellas de vidrio de 250 ml (pueden ser botellas de vidrio transparente de jugo)
- 2 tubos de ensayo
- 2 matraz volumétricos de 100 ml
- 1 espátula
- 3 vasos de precipitados de 100 ml
- 3 probeta de 100 ml
- *papel aluminio
- parafilm
- papel de estraza
- *tamiz
- *cubre bocas

Material por grupo

Autoclave

Refrigerador

Balanza analítica

Microscopio de Campo Claro

Material biológico

*fruto fresco u 80 semillas de tuna

Reactivos

Etanol

*Solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % p/v; tomar 1 parte de blanqueador y diluirlo en 3 partes de agua destilada. Usar blanqueador comercial Cloralex o el Chinito; con una concentración de hipoclorito de sodio entre el 5 al 6% p/v de ingrediente activo (ver Anexo).

Solución de cloruro de 2, 3, 5-trifenil-tetrazolio al 1% p/v, en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 (1g de tetrazolio en 100 ml de amortiguador de fosfato)

Amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7:

Solución A: disolver 0.7095 g de NaH_2PO_4 en 100 ml de agua.

Solución B: disolver 0.68995 g de Na_2HPO_4 mono hidratado en 100 ml de agua.

Tomar 40 ml de la solución A y mezclarlo con 60 ml de la solución B, verificar el pH en un potenciómetro.

Solución para aclarar tejidos:

20 ml de ácido láctico

20 ml de fenol

20 ml de glicerina

20 ml de agua

Agua destilada

*materiales proporcionados por el alumno.

Metodología

Sesión 1

A. Preparación del material.

1. Preparar las cajas de Petri con un círculo de papel filtro dentro de cada una, envolver en papel de estraza de dos en dos, y colocarles un trozo pequeño de cinta testigo.
2. Envolver las pinzas de disección en papel estraza y colocarle un trozo de cinta testigo.
3. A las botellas, agregar agua destilada hasta $\frac{3}{4}$ partes, cerrar y colocarles un capuchón de papel aluminio y cinta testigo.
4. A un vaso de precipitado cubrirle la boca con papel aluminio y ejercer presión con la palma de la mano, de forma que se selle, adicionar en los costados del vaso cinta para ajustar el papel aluminio y poner un trozo de cinta testigo.
5. Realizar el mismo procedimiento que en el paso 5 con una probeta de 100 ml.
6. Esterilizar el material en una autoclave durante 20 minutos a 1.2 Kg/cm².

B. Prueba de viabilidad por tinción con tetrazolio.

1. Extraer las semillas de los frutos, lavarlas en un tamiz bajo el chorro del agua.
2. Exponer el embrión mediante un corte longitudinal medial de la semilla (o mediante una punción en la región del micropilo), sumergir 10 semillas en la solución de Cloruro de 2, 3, 5-trifenil-tetrazolio al 1% p/v durante 1 a 60 minutos.
3. Si el tiempo excede el horario de la práctica, se recomienda tapar los tubos con parafilm e introducirlos en refrigeración a 7°C durante toda la noche y realizar las observaciones al día siguiente.
4. Lavar tres veces con agua destilada para extraer el excedente de colorante.
5. Aclarar las semillas sumergiéndolas en la solución aclarante de lactofenol durante 30 minutos.
6. Observar las semillas en un microscopio de campo claro.

Sesión 2

1. Limpiar el área donde se va a sembrar con agua y jabón, posteriormente pasar un algodón con cloro comercial (blanqueador).
2. Encender el mechero en la zona de trabajo.
3. Colocar el material para la desinfección superficial y siembra (semillas de tuna, vaso de precipitado estéril, probeta con la solución de hipoclorito de sodio, botellas con agua, cajas de Petri y pipeta con bulbo) en el área limpia.
4. Desinfectar superficialmente las semillas colocándolas en el vaso de precipitados estéril con una solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % p/v, durante 15 min (ver anexo).
5. Desechar la solución de hipoclorito de sodio y agregar agua estéril para enjuagar las semillas hasta que desaparezca el olor a cloro.
6. Agregar nuevamente agua estéril al vaso con las semillas y mantenerlas durante 5 min. Desechar el agua.
7. Junto a la flama, sembrar 10 semillas en cada caja de Petri, en total se tendrán 8 cajas de germinación.
8. Agregar 3 ml de agua destilada esterilizada, permitiendo que el papel filtro quede húmedo pero que no exceda la cantidad de agua.
9. Envolver cada una de las 8 cajas de Petri con las semillas con una película plástica transparente (egapack®). A 4 cajas colocarles encima de la película plástica papel aluminio (oscuridad) y dejar las otras cuatro 4 cajas solamente con la película plástica (luz).
10. Marcar las cajas con las semillas según la condición experimental del cuadro 1:

Cuadro 1

	Oscuridad	Luz
25°C	2 cajas	2 cajas
7°C	2 cajas	2 cajas

11. Incubar las cajas con las semillas durante una semana en cada temperatura.
12. Al finalizar el tiempo de incubación, determinar el número de semillas que han germinado (protrusión de la radícula a través de la testa).

Guía para reportar e interpretar los resultados

Cálculos

Después de observar la tinción con la sal de tetrazolio, calcule el porcentaje de las semillas viables:

$$\text{Semillas viables (\%)} = \frac{\text{Semillas teñidas} \times 100}{\text{Número total de semillas}}$$

Calcular el porcentaje de germinación:

$$\text{Semillas germinadas (\%)} = \frac{\text{Semillas germinadas} \times 100}{\text{Número total de semillas}}$$

Cuestionario

1. ¿Cuál es el principio de la técnica de viabilidad mediante el tetrazolio? ¿Qué tipo de compuestos pueden interactuar con el tetrazolio? ¿Cuántos tipos de tetrazolio existen en el mercado?
2. ¿Existe una correlación entre la cantidad de semillas teñidas con tetrazolio y las que germinaron?
3. ¿Qué impacto tiene el uso de esta prueba en la agronomía?
4. ¿Qué efectos tienen la luz y la temperatura en el proceso de germinación?

Resultados

Calcular los valores de porcentaje de germinación para cada tratamiento y colocarlos en el cuadro 2.

Cuadro 2

Germinación (%)*	Luz		Oscuridad	
	(25 °C)	(7 °C)	(25 °C)	(7 °C)

* La germinación expresada en porcentaje se obtiene del promedio de semillas germinadas en las 2 cajas de cada tratamiento.

Bibliografía

-  Larqué-Saavedra, A. 1980. Fisiología Vegetal Experimental, El Agua en las plantas. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
-  Moreno E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Cap 6 Pruebas de viabilidad con tetrazolio.
-  Black, H.D.; Brown, M.P. y Howell, G.L. 1991. Exercises in Plant Biology. Hunter Text Books. Winston-Salem.
-  Bidwell, R.G.S. 1993. Fisiología Vegetal. AGT Editor, S.A. México.
-  Salisbury, F.B y Ross, C. W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México D.F. México.
-  Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologist. USA.
-  Azcón-Bieto J. Y Talón, M. 2003. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. 1era edición, España.
-  Nicolás, G., Bradford, K.J, Côme, D., Pritchard, H.W. 2003. The Biology of Seeds: Recent Research Advances. CABI Publishing.
-  Hopkins, W., Hüner N. 2004. Introduction to Plant Physiology. 3a edición John Wiley USA.
-  Taiz, L., Zeiger, E. 2010. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc. 5ª edición USA.

Actividad de la α -amilasa durante la germinación y en respuesta a giberelinas

NOTA: Esta práctica se realiza en dos sesiones.

En la primera sesión se preparan las soluciones y la curva patrón. En la segunda sesión se hace la extracción de la enzima de las semillas germinadas y tratadas con giberelinas y se lleva a cabo la determinación de la actividad amilolítica.

Introducción

Una semilla madura está compuesta básicamente de tres partes: embrión, sustancias nutritivas de reserva y testa. Las sustancias nutritivas están constituidas por proteínas, lípidos y carbohidratos, en diversas proporciones. En cereales, el tejido de reserva es el endospermo, que almacena principalmente almidón. Al rehidratar una semilla (proceso de imbibición), los primeros procesos que se activan son: la respiración y durante la segunda fase de la imbibición, la inducción de la síntesis de hidrolasas como las amilasas, que hidrolizan al almidón y dan como producto final unidades de maltosa que serán utilizadas por el eje embrionario para crecer. Estas enzimas se inducen en la capa de aleurona por las hormonas giberelinas producidas por el embrión en germinación.

Objetivo general

Determinar la actividad de la α -amilasa durante la germinación de semillas de maíz.

Objetivos particulares

1. Usar el método de Nelson-Somogyi para determinar los azúcares reductores producidos por la hidrólisis de almidón.
2. Determinar los cambios en la actividad amilolítica en los distintos estadios de germinación y en respuesta a la aplicación de giberelinas exógenas.

Materiales y métodos

Material por equipo

- 1 mortero
- 3 tubos de centrifuga de 15 ml
- 6 pipetas graduadas de 1 ml
- 5 pipetas graduadas de 10 ml
- 1 piceta
- 20 tubos de ensayo de 15x150 mm
- 3 cajas de Petri de 9 cm de diámetro
- 1 vaso de precipitados de 500 ml
- 1 espectrofotómetro
- 1 parrilla
- 1 bisturí o navaja de un solo filo
- algodón
- marcador indeleble y cinta adhesiva para etiquetar.
- 3 pipetas Pasteur
- 1 bulbo

Material por grupo

2 termómetros

1 centrífuga

hielo

Material biológico

Granos de maíz (*Zea mays* L.)

Reactivos

Almidón

Cloruro de calcio

Carbonato de sodio anhidro

Tartrato doble de sodio y potasio

Bicarbonato de sodio

Sulfato de sodio anhidro

Ácido sulfúrico

Sulfato de cobre pentahidratado

Molibdato de amonio

Arsenato de sodio heptahidratado

Ácido succínico

Hidróxido de sodio

Maltosa

Agua destilada

Ácido giberélico

Cloranfenicol

Metodología

Primera sesión

1. Preparación de soluciones

Todas las soluciones se preparan con agua destilada. Los volúmenes a preparar cambian de acuerdo a las necesidades particulares, dependiendo del número de alumnos (y serán indicadas en clase por el profesor).

Amortiguador de succinato- CaCl_2 , pH 5

Ácido succínico 0.02 M

CaCl_2 0.02 N

Ajustar a pH 5 con NaOH 0.1 M

Aforar hasta el volumen indicado

Patrón de maltosa (500 g/ml)

Pesar 0.05 g de maltosa y aforar a 100ml con agua.

Solución de almidón (20 mg/ml). DEBE PREPARARSE EL MISMO DÍA EN QUE SE USARÁ.

Disolver 800mg de almidón soluble en 5 ml de agua destilada.

Agregarlo a 15 ml de agua hirviendo y dejarlo hervir un minuto.

Enfriarlo. Finalmente adicionarle 20 ml del amortiguador de succinato- CaCl_2 .

Preparar una solución 2×10^{-6} M de ácido giberélico adicionada con 100 mg/L de cloranfenicol.

Reactivo I

Mezclar 1 ml de la solución B con 25 ml de la solución A.

Debe prepararse unos minutos antes de efectuar la determinación.

Solución A: Tartrato doble de sodio y potasio.

Disolver 25 g de carbonato de sodio anhidro, 25 g de tartrato doble de sodio y potasio, 20 g de bicarbonato de sodio y 200 g de sulfato de sodio anhidro en 500ml de agua.

Aforar a 1 litro y filtrar.

Solución B: Sulfato cúprico.

Disolver 30 g de sulfato de cobre pentahidratado en 200 ml de agua que contengan 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Reactivo II

Disolver 25 g de molibdato de amonio en 450 ml de agua que contengan 21 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Por separado disolver 3 g de arsenato de sodio heptahidratado en 25 ml de agua y agregarlos a la solución anterior despacio y con agitación constante.

Aforar a 500 ml e incubar por una noche a 37 °C o en un baño de agua a 55° C durante 30 minutos.

2. Curva patrón. Elaborar la curva patrón para maltosa como se indica en el cuadro 1:

Cuadro 1

Tubos	1 (blanco)	2	3	4	5	6
Patrón de maltosa (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Agua (ml)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Incubar los tubos 10 min a 25°C						
Reactivo I (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubar 20 min en baño de agua hirviendo						
Enfriar a chorro de agua por 5 min						
Reactivo II (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Agitar vigorosamente						
Agua (ml)	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
Leer absorbancia a 520 nm						

Graficar absorbancia vs cantidad (μ g) de maltosa.

Segunda sesión

Actividades previas a la práctica

Siembra y tratamientos de los granos:

Seleccionar 30 granos de maíz procurando que tengan aproximadamente el mismo tamaño. Desinfectarlos superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% p/v* durante 3 minutos. Enjuagar con agua destilada hasta que desaparezca el olor a cloro.

*Solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % p/v; tomar 1 parte de blanqueador y diluirlo en 3 partes de agua destilada. Usar blanqueador comercial Cloralex o el Chinito; con una concentración de hipoclorito de sodio entre el 5 al 6% p/v de ingrediente activo (ver Anexo).

3 días antes de la práctica sembrar 10 granos en una hoja de toalla absorbente humedecida. Etiquetar.

3 días antes de la práctica imbibir de la misma manera otros 10 granos, transcurrido 1 día, hacer una incisión en la testa y aplicar a este grupo de granos el tratamiento con giberelinas durante 2 días.

3 horas antes de la práctica poner 10 granos a remojar en agua.

Preparación del extracto enzimático:

NOTA: Antes de iniciar la extracción tener listos los reactivos necesarios, así como los baños para incubar.

1. Seleccionar 2 granos de cada tiempo de imbibición.
2. Quitar a los granos el embrión o la plántula y escutelo con un bisturí o navaja dejando el endospermo almidonoso.
3. Pesar en una balanza analítica.

Preparar un extracto enzimático para cada tiempo de imbibición, de la siguiente manera:

1. Macerar el endospermo de los 2 granos en un mortero frío con 5 ml de la solución amortiguadora de succinato.
2. Vaciar el homogenado a un tubo de centrifuga y lavar el mortero con otros 5 ml, que posteriormente serán vertidos en el mismo tubo de centrifuga.
3. Centrifugar 20 min a 3000 rpm y separar el sobrenadante con una pipeta Pasteur en tubos limpios. Desechar la pastilla.
4. A partir de los sobrenadantes de los granos imbibidos por distintos tiempos, en tubos limpios preparar las siguientes diluciones usando el buffer de succinato (Cuadro 2).

Cuadro 2

Tiempo de imbibición (días)	Dilución
0	Sin diluir
0	1 a 10
3	Sin diluir
3	1 a 10
3	1 a 100
3 + GA	Sin diluir
3 + GA	1 a 10
3 + GA	1 a 100

Para los ensayos se tomará posteriormente una alícuota de 0.25 ml de las diluciones de la muestra.

5. Curva problema

Realizar la reacción enzimática y la determinación de azúcares reductores totales que se obtienen por la hidrólisis enzimática del almidón en los extractos de embriones de maíz, como se indica en el cuadro 3.

Cuadro 3

Tiempo de imbibición (días)	0		3		3 + GA	
Tubos	7	8	9	10	11	12
	Sin diluir	1 A 10	1 A 10	1 A 100	1 A 10	1 A 100
Diluciones del extracto (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Solución de almidón (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Incubar 10 min a 25°C						
Reactivo I (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubar 20 min en baño de agua hirviendo						
Enfriar al chorro de agua por 5 min						
Reactivo II (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Agitar vigorosamente						
Agua (ml)	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
Leer absorbancia a 520 nm						

Nota: Se utilizará como blanco el buffer de succinato.

Guía para reportar e interpretar los resultados

Cálculos para obtener la actividad de α -amilasa.

Tomando en cuenta las diluciones, las alícuotas tomadas y los valores que caen dentro de su curva patrón, calcular las unidades (U) de actividad de alfa-amilasa en: $\mu\text{g de maltosa/min / g de peso fresco}$ para cada tiempo de imbibición.

Se obtienen los microgramos de maltosa de acuerdo a la ecuación de la curva patrón:

$$x = (y-b)/m$$

Donde y= absorbancia de la muestra, x= los microgramos de maltosa y m la pendiente de la recta.

X $\mu\text{g de maltosa}$ corresponden a un tiempo de reacción de 10 minutos, (tiempo de incubación) entonces para un minuto:

$$X \mu\text{g maltosa}/10 \text{ min} = \text{X} \mu\text{g maltosa}/\text{min}$$

X $\mu\text{g maltosa}/\text{min}$ están en un volumen de 0.25 ml (tamaño de la alícuota) entonces para calcularlo por ml:

$$(X \mu\text{g malt}/\text{min}) / 0.25\text{ml} = \mu\text{g de maltosa}/\text{min}/\text{ml}$$

Para obtener las U de cada repetición se considera que una unidad de actividad de alfa-amilasa $1U = 50 \mu\text{g maltosa produ-cida}/\text{min}/\text{ml de extracto}$, entonces:

$$(\mu\text{g de maltosa}/\text{min}/\text{ml})/50 = \text{U repetición}$$

Finalmente se calculan las unidades (U) por gramo de peso fresco:

$$\text{Unidades}/\text{peso del endospermo} = \text{U}/\text{g de peso fresco}$$

Resultados

1. Calcular los μg de maltosa en cada una de las alícuotas usadas en la curva patrón.
2. Graficar la curva patrón de maltosa. (y = absorbancia vs x = μg de maltosa). Indicar además la ecuación de la recta y el valor de R .
3. Calcular los μg de maltosa en cada una de las muestras problema.
4. Calcular la actividad de la enzima α -amilasa (siguiendo las instrucciones mencionadas previamente)
5. Tabular y graficar la actividad de la enzima vs tiempo de imbibición (y = U de actividad de alfa-amilasa/ g de peso fresco vs x = días de imbibición).

Cuestionario previo a la práctica

1. ¿Cómo se induce la síntesis de α -amilasa durante la germinación?
2. ¿Cuál es la función de los cotiledones? ¿Es la misma en todas las plantas?
3. ¿Qué función juega la testa en la velocidad de absorción de agua?

Bibliografía

-  Manual de Prácticas de Bioquímica I y II 1980. Facultad de Química UNAM.
-  Damian, L.M., Morales, J. & Pérez Flores, L.J. 1988. Experimentos de Fisiología Vegetal UAM-Iztapalapa.
-  Bidwell, R.G.S. 1993. Fisiología Vegetal. AGT Editor, S.A. México.
-  Salisbury, F.B y Ross, C. W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México D.F. México.
-  Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. 2000. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologist. USA.
-  Azcón-Bieto J. Y Talón, M. 2003. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. 1ª edición, España.
-  Nicolás, G., Bradford, K.J, Côme, D., Pritchard, H.W. 2003. The Biology of Seeds: Recent Research Advances. CABI Publishing.
-  Hopkins, W., Hüner N. 2004. Introduction to Plant Physiology. 3ª edición John Wiley USA.
-  Taiz, L., Zeiger, E. 2010. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc. 5ª edición USA.

Potencial hídrico

Introducción

El potencial hídrico de un sistema o parte de éste, es equivalente al potencial químico del agua comparado con el potencial químico del agua pura, el cual es igual a cero a presión atmosférica y a temperatura ambiente. Una solución acuosa a presión atmosférica tiene un potencial de agua negativo. El potencial de agua en plantas tiene tres componentes principales, el potencial osmótico, el potencial mátrico y el potencial de presión. Las moléculas de agua difunden en respuesta a los gradientes del potencial de agua, de un potencial mayor a un potencial menor.

Objetivo general

Determinar el potencial hídrico de un tejido vegetal.

Objetivos particulares

Determinar los cambios en el peso de los tejidos de papa colocados en soluciones con diferentes concentraciones de sacarosa.

Determinar el potencial hídrico en tejidos de papa colocados en soluciones con diferentes concentraciones de sacarosa.

Materiales y métodos

Material por equipo

30 tubos de ensayo 16 x 150 mm
1 pinza de disección
1 aguja de disección
1 gradilla para 40 tubos
2 pipetas graduadas de 10 ml
1 propipeta
15 pipetas Pasteur con bulbo
1 piceta con agua destilada
regla metálica
1 hoja blanca
1 navaja de costilla
1 plumón indeleble
7 vasos de precipitados de 100 mL
1 probeta de 100 mL

Material por grupo

balanza analítica
Sacabocados
Papel higiénico
Cinta adhesiva para etiquetar

Material biológico (proporcionado por el alumno)

Papa (*Solanum tuberosum*)

Reactivos

Sacarosa

Azul de metileno

Agua destilada

Metodología

1. Preparar las siguientes soluciones de sacarosa conforme al cuadro 1.

Cuadro. 1. Soluciones de sacarosa de molalidad creciente.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solución de sacarosa (Concentración Molal)	0 (Agua destilada)	0.05	0.10	0.20	0.25	0.30	0.4	0.5	0.6	0.7

2. Dividir los tubos de ensayo en dos series de 10 tubos cada una. (serie A y serie B).
3. Numerarlos del 1 al 10. Agregar a cada tubo de cada serie 10 ml de cada solución de sacarosa de concentración molal creciente (Cuadro 1).
4. Serie A. Agregar a cada tubo una gota de la solución concentrada de azul de metileno tapar los tubos con parafilm y agitar.
5. Serie B. Extraer 28 cilindros de papa de 1 x 1 cm, sólo si es necesario semisecarlos con papel absorbente, pesar cada cilindro y colocar dos de ellos en cada uno de los tubos de la serie B, cuidando que queden dentro de la solución. *Evitar maltratar o desecar los tejidos del material biológico durante el experimento. Es decir que se debe trabajar rápidamente pesarlos y colocarlos en los tubos.*

Dejar reposar de 1 a 1 hora 30 minutos.

6. Transcurrido este tiempo, retirar cuidadosamente los cilindros con las pinzas y secar **ÚNICAMENTE** el exceso de líquido superficial con papel absorbente. Posteriormente, pesar los cilindros.
7. Verificar qué le ocurrió a la concentración de las soluciones, introduciendo una gota de las soluciones de la serie A con azul de metileno, en el tubo respectivo de la serie B. Observar lo que ocurre con la gota.

NOTA: Agregar la gota de la solución de la serie A en la serie B (después de sacar el tejido) con sumo cuidado evitando que salga con fuerza de la pipeta.

Guía para reportar e interpretar los resultados

Calcular el potencial osmótico de cada una de las soluciones de sacarosa con la siguiente fórmula:

$$\Psi_s = -i m R T$$

Donde:

m = molalidad de la solución

i = constante que considera la ionización del soluto en la solución. Para solutos no ionizables como la sacarosa, manitol y glucosa, $i = 1$

R = constante de los gases [0.00831 kg MPa/K mol]

T = temperatura (°K).

Resultados

1. Graficar la diferencia de peso de los cilindros de papa (Δ peso= peso final-peso inicial) contra Ψ_s de la solución. El punto de intersección (aquel en que no hay ganancia ni pérdida de peso), indica el potencial de agua del tejido.
2. Menciona ¿cuál es la molalidad de la solución en que no hay flujo neto de agua entre la solución y el tejido de la papa?

Cuestionario previo a la práctica

1. Explica el concepto de potencial hídrico.
2. Explica ¿cuál es la diferencia entre difusión y ósmosis?
3. ¿Cuáles son los dos métodos que se usan en esta práctica para medir el potencial hídrico?
4. Acerca de la *Metodología*. Explica: ¿Qué hipótesis plantearías para este experimento?

Bibliografía

-  Damian, L.M., Morales, J. & Pérez Flores, L.J. 1988. Experimentos de Fisiología Vegetal UAM-Iztapalapa.
-  Bidwell, R.G.S. 1993. Fisiología Vegetal. AGT Editor, S.A. México.
-  Salisbury, F.B y Ross, C. W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México D.F. México.
-  Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologist. USA.
-  Azcón-Bieto J. Y Talón, M. 2003. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. 1ª edición, España.
-  Nicolás, G., Bradford, K.J, Côme, D., Pritchard, H.W. 2003. *The Biology of Seeds: Recent Research Advances*. CABI Publishing.
-  Hopkins, W., Hüner N. 2004. *Introduction to Plant Physiology*. 3ª edición John Wiley USA.
-  Práctica virtual de Potencial de Agua: http://www.neosci.com/demos/10-1041_Cell%20Processes/Labs_WaterPotential.swf
-  Taiz, L., Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc. 5ª edición USA.

Transporte de agua y transpiración

Introducción

Para que los organismos vivos, entre ellos las plantas, funcionen con normalidad requieren tener un aporte adecuado de agua. El agua es una molécula necesaria en la mayoría de los procesos metabólicos celulares, actúa como solvente de los solutos y contribuye a dar forma a las células, tejidos y órganos. En las plantas vasculares el agua se absorbe del suelo a través de las raíces, posteriormente, se conduce por los elementos conductores del xilema junto con minerales disueltos y una parte de ella es eliminada por evaporación a través de los estomas de las hojas proceso que se denomina transpiración.

Objetivo general

observar el transporte de agua en tallos y la transpiración en hojas.

Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de la luz en la velocidad de transporte del agua en tallos.
2. Determinar el efecto de la luz en la transpiración en hojas.

Materiales y métodos

Material por equipo

Vaso de precipitados de 100 ml
 Portaobjetos
 Cubreobjetos
 Papel filtro
 *Navaja
 Microscopio de contraste de fases
 Parrilla eléctrica
 *1 lámpara de escritorio con un foco de 75 watts
 *1 regla

Material por grupo

1 Probeta de 100 ml
 1 Probeta de 250 ml
 1 Vaso de precipitados de 100 ml

Material biológico

*2 tallos de apio o poro con sus respectivas hojas por equipo
 *Planta en maceta por equipo (Nota: La noche anterior a la práctica se debe regar la tierra de la maceta evitando mojar la parte aérea de la planta).

Reactivos

Azul de metileno
 Cloruro de cobalto (CoCl₂)
 *material proporcionado por el alumno.

Metodología

A. Preparación de las soluciones

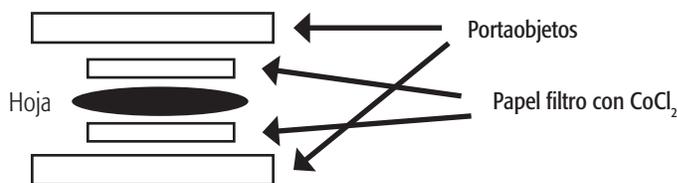
1. En una probeta de 100 ml preparar una solución de CoCl_2 al 5% p/v, verterlo en un vaso de precipitados de 100 ml.
2. En una probeta de 250 ml preparar una solución de azul de metileno al 1% p/v, verter 50 ml en un vaso de precipitados por equipo.

B. Transporte de agua y solutos a través del tallo.

1. Bajo el chorro del agua cortar la base del tallo de apio eliminando la raíz e introducirlo en un vaso de precipitados con la solución de azul de metileno al 1% p/v.
2. Colocar a 30 cm de distancia de la lámpara el tallo de apio sumergido parcialmente en la solución de azul de metileno y colocar otro tallo en presencia de azul de metileno en completa oscuridad. Mantenerlos en los tratamientos durante 15 minutos.
3. Al finalizar el tiempo, determinar la distancia que recorrió el colorante por el tallo en ambas condiciones; tomando como inicio la base del tallo.
4. Realizar un corte longitudinal en ambos tallos y medir hasta la distancia del tallo que se tiñó con el colorante.
5. Cada 0.5 cm realizar cortes transversales a mano de la sección teñida del tallo para ambas condiciones experimentales y observarlas al microscopio de contraste de fase e identificar el haz vascular

C. Determinación de la Transpiración a través de los estomas de las hojas.

1. Sumergir papel filtro de 4 cm² (2X2 cm) en la solución de CoCl_2 , secarlos con calor en la parrilla eléctrica.
2. De la planta que se encuentra en la maceta; escoger unas cuantas hojas (la mitad de las que cuenta la planta) y colocar en cada una de ellas dos recuadros de papel filtro impregnado en CoCl_2 , uno por cada lado de la hoja, cubrir los recuadros externamente por ambos lados con portaobjetos y prensar con una pinza (ver esquema).
3. Puede realizarse con las plantas de apio o poro con raíz, siempre y cuando desde el día anterior éstas estén sumergidas en agua.
4. Irradiar la planta a 30 cm de distancia de la fuente de luz durante 15 a 30 minutos y hacer observaciones del color de los recuadros de papel filtro cada minuto.



Guía para reportar e interpretar los resultados

1. Haga un esquemas de los cortes longitudinal y transversales del tallo del apio y señale la zona donde se observa el colorante.
2. Calcule la velocidad promedio de ascenso del agua para cada una de las condiciones experimentales (luz y oscuridad) usando la siguiente ecuación:

$$V = \text{distancia/tiempo}$$

3. Compare la velocidad de transporte del colorante y asocie la estructura por la que se realiza el transporte.
4. Determine el tiempo en que los recuadros de papel filtro viraron de color.
5. Explique el cambio de coloración de los recuadros de CoCl_2 y que proceso fisiológico se está determinando con esta parte de la práctica.

Cuestionario

1. ¿Cuál es el principio del uso del CoCl_2 para determinar la transpiración?
2. ¿De una explicación del movimiento del colorante a través del tallo? ¿Qué importancia tiene la irradiación a las hojas de la planta y el movimiento del colorante?
3. ¿A través de que estructuras del tallo se mueven el colorante y el agua en el experimento realizado?
4. ¿Qué relación existe entre el cambio de color del papel con CoCl_2 y el movimiento del colorante a través del tallo?
5. Explique los conceptos de difusión y flujo de masas y su correlación con las observaciones realizadas en estos experimentos.

Bibliografía

-  Larqué-Saavedra, A. 1980. Fisiología Vegetal Experimental, El Agua en las plantas. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
-  Black, H.D.; Brown, M.P. y Howell, G.L. 1991. Exercises in Plant Biology. Hunter Text Books. Winston-Salem.
-  Bidwell, R.G.S. 1993. Fisiología Vegetal. AGT Editor, S.A. México.
-  Salisbury, F.B y Ross, C. W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México D.F. México.
-  Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologist. USA.
-  Azcón-Bieto J. Y Talón, M. 2003. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. 1era edición, España.
-  Nicolás, G., Bradford, K.J, Côme, D., Pritchard, H.W. 2003. The Biology of Seeds: Recent Research Advances. CABI Publishing.
-  Hopkins, W., Hüner N. 2004. Introduction to Plant Physiology. 3a edición John Wiley USA.
-  Taiz, L., Zeiger, E. 2010. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc. 5ª edición USA.

Nutrición mineral

NOTA: Esta práctica se realiza en varias sesiones. En la primera sesión se preparan las soluciones y se siembran las semillas en agrolita. En la segunda sesión se hacen los cultivos hidropónicos y en sesiones posteriores se realizan las observaciones.

Introducción

Además del carbono y el oxígeno que se incorporan al organismo vegetal a través de las hojas, las plantas requieren para su metabolismo de otros elementos que provienen del suelo. Dependiendo de la cantidad requerida por la planta los nutrientes se dividen en macro y microelementos. Para determinar si un elemento es esencial para las plantas debe cumplir los siguientes criterios: si el elemento no se proporciona a la planta, ésta no completa su ciclo vital o no se reproduce normalmente, el elemento debe formar parte de alguna estructura o molécula esencial para la planta y además su efecto debe ser directo.

Objetivo general

Determinar el efecto de micronutrientes, macronutrientes y metales tóxicos en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Objetivos particulares

1. Realizar cultivos hidropónicos para observar los síntomas de la deficiencia de nutrientes en monocotiledóneas y dicotiledóneas.
2. Realizar cultivos hidropónicos para observar el efecto tóxico del Cobre en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Primera sesión

Preparación de soluciones y siembra.

Materiales y métodos

Material por equipo

1 Espátula
1 Parrilla con agitación magnética
1 barra magnética
1 vaso de precipitados de 250 ml.
1 matraz aforado de 100 ml
1 pipeta Pasteur con bulbo
1 piceta
Frascos ámbar
Charolas para siembra
Agrolita estéril

Material por grupo

Balanza
Autoclave

Material biológico

Granos de maíz (*Zea mays* L.)

Semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*)

Reactivos

Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)

Nitrato de calcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$]

Nitrato de potasio (KNO_3)

Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Fosfato de potasio (KH_2PO_4)

Cloruro de calcio (CaCl_2)

Cloruro de potasio (KCl)

Sulfato de hierro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Etiléndiamina tetraacetato de sodio (Na_2EDTA)

Hidróxido de sodio (NaOH)

Cloruro de manganeso (MnCl_2)

Ácido bórico (H_3BO_3)

Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Ácido molibdico (H_2MoO_4)

Etanol al 70 % v/v

*Solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % p/v; tomar 1 parte de blanqueador y diluirlo en 3 partes de agua destilada. Usar blanqueador comercial Cloralex o el Chinito; con una concentración de hipoclorito de sodio entre el 5 al 6% p/v de ingrediente activo (ver Anexo).

Agua destilada estéril

Metodología

Siembra

1. Seleccionar 30 granos de maíz y 30 semillas de frijol, lavar con etanol al 70% v/v por 40 s en agitación y desinfectar superficialmente con la solución de hipoclorito de sodio al 1.5% p/v durante 3 minutos. Enjuagar con agua destilada estéril hasta que desaparezca el olor a cloro.
2. Sembrar las semillas en cama de agrolita (ver Anexo Esquema de Trabajo en el Laboratorio).
3. Regar las plantas cada tercer día, por 15 días.

Preparación de soluciones

1. Preparar las soluciones nutritivas necesarias conforme a lo indicado en el cuadro 1. Los reactivos son grado analítico. Usar agua desionizada en las soluciones para que los elementos provengan únicamente de las soluciones nutritivas. Posteriormente, esterilizar las soluciones en autoclave a 120 lbs de presión por 20 minutos. Almacenar en frascos ámbar hasta su uso.
2. Para preparar la solución nutritiva completa y con deficiencia de distintos elementos a partir de las soluciones madres, agregar las cantidades indicadas en el cuadro 2 y aforar a 1 L usando agua desionizada estéril.
3. Para el tratamiento de toxicidad, preparar una solución nutritiva completa como se indica en el cuadro 2 y agregar 1 ml de CuSO_4 al 0.01 M.

Cuadro 1. Soluciones madre (Hoagland modificada)

Solución	Compuesto	Concentración
A	Ca (NO ₃) ₂ •4H ₂ O	1 molar
B	KNO ₃	1 molar
C	MgSO ₄ •7H ₂ O	1 molar
D	KH ₄ PO ₄	1 molar
E	Fe con quelante ^o	5000 ppm de Fe
F	Micronutrientos ^{oo}	
G	CaCl ₂	1 molar
H	Kcl	1 molar

^o La solución de Fe con quelante contiene 25 g de FeSO₄•7H₂O, 26g de Na₂EDTA; 14 g de NaOH en 1 L de agua desionizada.

^{oo} La solución de microelementos (Mn, B, Zn Cu Mo) tiene la siguiente composición: 1.81 g de MnCl₂, 2.86 g de H₃BO₃; 0.22 g de ZnSO₄•7H₂O; 0.88 g de CuSO₄•5H₂O y 0.09 g de H₂MoO₄ en 1 L de agua destilada.

Segunda sesión

Cultivos hidropónicos.

Materiales y métodos

Material por equipo

5 botellas de 1 L de boca estrecha, pintadas exteriormente de negro o forradas con papel aluminio

1 cuchara desechable

1 navaja de un solo filo

1 vaso de precipitados de 500 ml

1 matraz volumétrico de 1000 ml

3 pipetas de 5 ml

3 pipetas de 1 ml

1 propipeta

Algodón y gasa estéril

Regla

Tijeras

Bolsas pequeñas de papel de estraza

Papel absorbente

Plumón indeleble

Material por grupo

Estufa

Reactivos

Agua desionizada estéril

A partir de las soluciones preparadas en la sesión 1 preparar las soluciones nutritivas necesarias conforme el cuadro 2

Cuadro 2. Preparación de soluciones nutritivas

Soluciones nutritivas	Cantidades en ml de soluciones madres para 1l de solución nutritiva							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Completa	5	5	2	1	1	1	---	---
Sin N	---	---	2	1	1	1	5	5
Sin P	5	5	2	---	1	1	---	1
Sin Fe	5	5	2	1	---	1	---	---
Sin Microelementos	5	5	2	1	1	---	---	---

Tratamientos

1. Iniciar los tratamientos cuando aparezcan las primeras hojas en las plántulas de frijol y se haya separado el segundo internodo de las plántulas de maíz.
2. Seleccionar las plántulas necesarias del mismo tamaño. Eliminar los cotiledones de las plantas de frijol con una navaja.
3. Remover la agrolita alrededor de la planta con una cuchara y extraer la planta cuidadosamente para no dañar las raíces.
4. Retirar la agrolita adherida a las raíces de las plantas con agua destilada estéril.
5. Envolver el tallo con algodón estéril cubierto por una gasa estéril para sostener las plantas en la boca de la botella, las raíces de las plantas deben estar sumergidas en la solución nutritiva pero el algodón no debe humedecerse para evitar el ataque de las bacterias (Fig. 1).

NOTA: la extracción se realiza hasta el momento de colocar las plantas en la solución nutritiva. No dejar las raíces al aire por más de unos minutos para evitar que la planta se dañe.

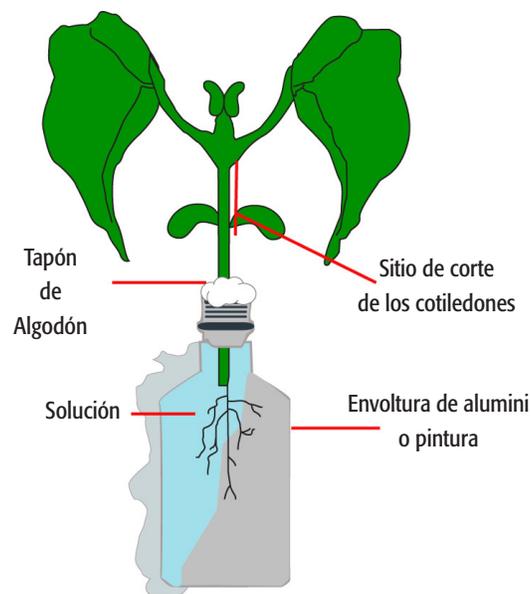


Figura 1. Planta en cultivo hidropónico.

Resultados

1. Observar las plantas durante 3 semanas. Procurar que las raíces estén siempre sumergidas, en caso contrario completar el volumen con agua destilada estéril.
2. Anotar cualquier cambio de aspecto o coloración en el tallo y las hojas. Anotar si los cambios ocurren en las hojas nuevas o viejas, en toda la superficie o sólo en un sector (ápice o base); entre las nervaduras o a lo largo de los bordes.
3. Marcar con plumón indeleble el tallo al nivel del algodón y a partir de esa línea realizar medidas de altura de las plantas. Medir al inicio del tratamiento y después, cada tercer día. Al final del experimento graficar el crecimiento como altura (cm) vs tiempo (días).
4. Al final del tratamiento cortar los tallos, hojas y raíces, lavarlos con agua destilada. Si hay algas o impurezas lavarlas con HCl al 1% v/v y después con agua destilada. Secar las partes de la planta con papel absorbente.
5. Pesar las partes de la planta por separado (peso fresco)
6. Guardar las partes de la planta en bolsas de papel y secar a 70 °C por 48 h o hasta que alcance peso constante (peso seco).
7. Registrar los resultados y las observaciones en el cuadro 3 anexa y graficarlos como promedio de peso fresco o peso seco (g) vs el tiempo de los distintos tratamientos.

Cuestionario previo a la práctica

1. ¿Cuáles son los criterios para que un elemento se considere esencial para la planta?
2. Menciona los elementos que se ha demostrado son esenciales para el desarrollo de la planta.
3. Ilustre mediante un esquema los conceptos de zona de deficiencia, concentración crítica y zona de toxicidad de un nutriente en el crecimiento de la planta.
4. ¿Cuáles son los síntomas de deficiencia de los siguientes elementos: N, P, Fe?
5. ¿Qué es un cultivo hidropónico y por qué se usa en esta práctica?

Cuadro 3 Fecha _____ Planta _____

	Tratamiento					
	Completa	Sin N	Sin P	Sin Fe	Sin Micronutrientes	Con Cu
Longitud del tallo						
Diámetro del tallo						
Nº de hojas						
Área foliar						
Observaciones						

Bibliografía

- Fernández, G. y Johnston M. 1986. Fisiología Vegetal Experimental. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica.
- Damian, L.M., Morales, J. & Pérez Flores, L.J. 1988. Experimentos de Fisiología Vegetal UAM-Iztapalapa.
- Bidwell, R.G.S. 1993. Fisiología Vegetal. AGT Editor, S.A. México.
- Salisbury, F.B y Ross, C. W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México D.F. México.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologist. USA.
- Azcón-Bieto J. Y Talón, M. 2003. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. 1ª edición, España.
- Nicolás, G., Bradford, K.J, Côme, D., Pritchard, H.W. 2003. The Biology of Seeds: Recent Research Advances. CABI Publishing.
- Hopkins, W., Hüner N. 2004. Introduction to Plant Physiology. 3ª edición John Wiley USA.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2010. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc. 5ª edición USA.

Efecto de auxinas en el enraizamiento de ramas de hiedra

Introducción

Las auxinas son reguladores del crecimiento vegetal que se ha demostrado que estimulan el desarrollo de raíces. Administradas de forma exógena pueden promover la formación y elongación de raíces. Sin embargo, esto sucede a concentraciones bajas de hormonas pues en dosis altas la combinación de auxinas endógenas y exógenas puede inhibir el crecimiento.

Objetivo general

Determinar el efecto de la aplicación de auxinas exógenas en la inducción de raíces.

Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto diferentes concentraciones de ácido indol butírico (AIB) en el número de raíces en tallos de hiedra.
2. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de auxinas (ácido indol butírico o AIB) en la velocidad de crecimiento de raíces en tallos de hiedra.

Materiales y métodos

Material por equipo

3 matraces volumétricos de 100ml
 3 matraces Erlenmeyer de 100 ml
 3 vasos de precipitados de 10 ml
 1 pipeta Pasteur
 4 frascos de 250ml
 *Papel aluminio
 *Regla graduada en milímetros
 Navaja
 Parrilla con agitación magnética
 Agitador magnético (mosca)

Material biológico

*20 ramas de hiedra con 7 hojas cada una

Reactivos

Ácido indol butírico (AIB)
 NaOH 1N
 Agua destilada

*Solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % p/v (usar blanqueador comercial Cloralex o el Chinito; con una concentración de hipoclorito de sodio entre el 5 al 6% p/v; tomar 1 parte de blanqueador y diluirlo en 3 partes de agua destilada; ver Anexo).

*material proporcionado por el alumno

Metodología

Preparar 100 ml de las siguientes concentraciones de AIB:

0 (testigo sin auxinas)
 0.1 mg l⁻¹ AIB

0.5 mg l⁻¹ AIB

1.0 mg l⁻¹ AIB

1. Preparar solución patrón. Agregar naoh 1n gota a gota a 1mg de aib hasta disolver, inmediatamente se agrega agua destilada y aforar a 100 ml. Colocar 25ml de solución de aib en una probeta y aforar a 250ml, verter en un frasco de 250 ml limpio. Repetir con 12.5 ml y 2.5 ml de solución patrón de aib para otros dos frascos, además de 250 ml de agua para el frasco patrón.
2. Lavar cuidadosamente las ramas de hiedra con agua jabonosa y enjuagar con una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% P/v, volver a enjuagar con agua destilada.
- * Solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % P/v; tomar 1 parte de blanqueador y diluirlo en 3 partes de agua destilada. Usar blanqueador comercial cloralex o el chinito; con una concentración de hipoclorito de sodio entre el 5 al 6% p/v de ingrediente activo (ver anexo).
3. Cortar las hojas de la base de cada una de las ramas con una navaja.
4. Colocar 5 ramas en cada uno de los frascos envueltos con papel aluminio.
5. Revisar cada semana durante dos semanas, para observar el desarrollo de raíces, contar y medir las que se hayan formado. Registrar los resultados en los cuadros 1 y 2.

Resultados

Cuadro 1.- Número de raíces promedio por tratamiento

Semana	AIB (mg l ⁻¹)			
	0	0.1	0.5	1.0
1				
2				

Cuadro 2.- Longitud promedio final de las raíces por tratamiento

Semana	AIB (mg l ⁻¹)			
	0	0.1	0.5	1.0
2				

Cuestionario

1. ¿Cuál es el efecto que tiene las auxinas en la formación de la raíz?
2. Explica el mecanismo de acción de la fitohormona en el proceso de alargamiento de la raíz.
3. Compara los resultados obtenidos entre las dosis usadas y relacionalos a la longitud y número de raíces.

Bibliografía

-  Fernández, G., Johnston, M. 1986. Fisiología Vegetal Experimental. Instituto Panamericano de Cooperación para la Agricultura. Costa Rica.
-  Bidwell, R.G.S. 1993. Fisiología Vegetal. AGT Editor, S.A. México.
-  Salisbury, F.B y Ross, C. W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México D.F. México.
-  Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologist. USA.
-  Azcón-Bieto J. Y Talón, M. 2003. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. 1era edición, España.
-  Nicolás, G., Bradford, K.J, Côme, D., Pritchard, H.W. 2003. The Biology of Seeds: Recent Research Advances. CABI Publishing.
-  Hopkins, W., Hüner N. 2004. Introduction to Plant Physiology. 3a edición John Wiley USA.
-  Taiz, L., Zeiger, E. 2010. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc. 5ª edición USA.

Pigmentos vegetales como indicadores de acidez o alcalinidad

Introducción

El color de las flores se debe básicamente a su contenido y proporción de pigmentos, entre los que se encuentran: flavonoides, betalainas antocianinas y antoxantinas. Las antocianinas son rojas en medio ácido, púrpuras en medio neutro y azules en medio básico. Por otra parte, las antoxantinas son amarillas en medio básico. La proporción en que se encuentre la mezcla de estos pigmentos hace que las flores tengan distintos colores. Estos colores pueden cambiar en función de las condiciones del entorno. El principal uso de los pigmentos vegetales se encuentra en la industria alimentaria, aunque también se han utilizado como indicadores de pH naturales cuya obtención es más económica en comparación con los indicadores sintéticos. Un indicador ácido-base es una sustancia que permite medir el pH de un medio ya que presenta un equilibrio (ácido base) en el que la forma molecular protonada (InH) y la forma desprotonada (In^-), presentan distinto color, por lo que el color que tome la disolución al añadir unas gotitas de indicador dependerá del pH de la disolución en la que dicha sustancia se encuentre diluida.

Objetivo general

Obtener pigmentos a partir de fuentes vegetales y determinar su color a diferente pH.

Objetivos particulares

1. Obtener pigmentos acuosos a partir de fuentes vegetales (flores, hojas, entre otros).
2. Utilizando una titulación ácido-base determinar los cambios de color de los pigmentos vegetales a diferente pH.
3. Determinar el pH de diferentes alimentos y productos de uso común mediante los pigmentos aislados.

Materiales y métodos

Material por equipo

- 1 piceta con agua destilada
- 1 espátula
- 2 pipetas graduadas de 5 ml
- 1 propipeta
- 2 vasos de precipitados de 500 ml
- 1 vasos de precipitados de 250 ml
- 1 vasos de precipitados de 50 ml
- 2 tubos de ensayo grandes con tapón de rosca
- 16 tubos de ensayo
- 1 gradilla
- 1 parrilla
- 1 agitador magnético
- 1 potenciómetro
- 1 soporte universal
- 1 bureta graduada
- Tijeras
- 1 hoja blanca tamaño carta

Material por grupo

- 1 balanza analítica

Material biológico (proporcionado por el alumno)

Col morada (repollo rojo)

Flores de bugambilia color morado-fucsia

Otros materiales vegetales coloridos.

Jugo de limón, jugo de manzana, vinagre blanco, "Sal de uvas picot" o "Alka-Seltzer", leche, detergente líquido (sin color), refresco de limón y bicarbonato de sodio.

Reactivos

Agua destilada

Soluciones amortiguadoras de pH 4, 7 y 10

Ácido clorhídrico (0.1 M)

Hidróxido de sodio (0.1 M)

Metodología

Obtención de pigmentos vegetales (extracto acuoso)

1. Pesar en una balanza analítica 50 g de col morada y 20 g de pétalos de bugambilia.
2. Con las tijeras cortar la col morada y los pétalos de bugambilia en pedazos pequeños y colocar cada muestra en un vaso de precipitados de 500 ml.
3. Agregar 250 ml de agua destilada a cada vaso de precipitados con la muestra y hervir durante 10 min.
4. Dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente.
5. Recuperar la solución acuosa (la cual contiene los pigmentos vegetales) de cada muestra filtrarla y colocarla en un tubo de ensayo grande previamente etiquetado.

Titulación de pigmentos vegetales

1. Colocar 10 ml del extracto acuoso en un vaso de precipitados de 50 ml.
2. Colocar el vaso sobre una base magnética e introducir con cuidado el agitador magnético para mantener agitación constante.
3. Colocar la solución de NaOH (0.1 M) en la bureta.
4. Calibrar el potenciómetro con las soluciones amortiguadoras de pH 4, 7 y 10.
5. Colocar el electrodo dentro del vaso que contiene el extracto, evitando que toque las paredes del vaso y verificando que esté dentro del líquido.
6. Medir el pH inicial del extracto, anotar el color que presenta y tomar una fotografía.
7. Iniciar la titulación adicionando volúmenes de 0.1 ml de NaOH lentamente, midiendo el pH en cada adición y describiendo el color del extracto.
8. Tomar fotografías del color del extracto cuando el pH cambie en una unidad y cuando se presente un cambio de color.
9. Adicionar tanto NaOH como sea necesario, hasta alcanzar un pH de 12.
10. Colocar la solución de HCl (0.1 M) en la bureta.
11. Colocar otros 10 ml del extracto de pigmentos acuoso en un vaso de precipitados de 50 ml.
12. Iniciar una nueva titulación adicionando volúmenes de 0.1 ml de HCl lentamente, midiendo el pH en cada adición y describiendo el color del extracto.
13. Tomar fotografías del color del extracto cuando el pH cambie en una unidad y cuando se presente un cambio de color.
14. Adicionar tanto HCl como sea necesario, hasta alcanzar un pH de 2.

Determinación del pH en diferentes productos y alimentos

1. Colocar 3 ml de una de las muestras (producto o alimento) en un tubo de ensayo y adicionar lentamente 3 ml del extracto de col morada, agitar ligeramente y anotar lo observado. Tomar una fotografía antes y después de adicionar el extracto.
2. Repetir el paso anterior con el extracto de bugambilia.
3. Repetir los pasos 1 y 2 con las muestras (producto o alimento) restantes.

NOTA: Colocar una hoja blanca debajo o detrás de los tubos de ensayo para observar la variación de color de las muestras (producto o alimento).

Resultados

1. Hacer la gráfica de la curva de titulación de los pigmentos vegetales.
2. Elaborar un cuadro de los colores de los pigmentos vegetales a diferentes pH y colocar las fotos de los colores de los pigmentos que se tomaron durante su titulación en el pH correspondiente.
3. Comparar las fotos que se tomaron para la determinación del pH de diferentes productos y alimentos con la tabla de titulación de los pigmentos vegetales, para determinar el pH de cada una de las muestras.
4. Elaborar un cuadro que indique si la muestra (producto o alimento) es ácida o básica y que pH tiene.

Cuestionario previo a la práctica

1. ¿Cuáles son los pigmentos vegetales más abundantes y qué función tienen en las plantas?
2. ¿De qué depende el color que presentan las flores?
3. ¿Qué es la cianidina, en dónde se encuentra y qué color presenta en un medio ácido y medio básico?
4. ¿En qué consiste el método de titulación?
5. ¿En qué momento de una titulación se da el viraje y por qué?
6. ¿Cuáles son los indicadores de pH sintéticos más utilizados?

Bibliografía

-  Bidwell, R.G.S. 1993. Fisiología Vegetal. AGT Editor, México.
-  Salisbury, F.B y Ross, C. W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial
-  Iberoamérica. México D.F. México.
-  Azcón-Bieto J. Y Talón, M. 2003. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. 1era edición, España.
-  Ferrufino M, Lima R, Ledezma C, León C. "Obtención de indicadores ácido - base a partir de sustancias naturales (vegetales) y determinación de sus rangos de pH", <<http://www.univalle.edu/publicaciones/journal/journal19/pagina04.htm>>, (20 Mayo 2012).
-  El cuaderno de por qué biotecnología. "Cuaderno No. 72 Biotecnología Ornamental", Edición No. 72 (<http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=72>).

Inhibición de la senescencia de flores de clavel

Introducción

El incremento en la producción de etileno induce la respiración climatérica y la senescencia en flores cortadas de clavel. Para la biosíntesis del etileno se requiere la formación de su precursor ácido 1- aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). La síntesis del ACC y por lo tanto del etileno se inhibe en presencia de tiosulfato de plata (STS), incrementando la vida postcosecha de las flores cortadas.

Objetivo general

Inhibir la senescencia de flores cortadas de clavel por exposición a tiosulfato de plata.

Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto del STS en la inhibición de la senescencia de flores cortadas de clavel mediante la medición del diámetro de la corola.
2. Registrar síntomas de senescencia (cambios de coloración, marchitez, entre otros) en la corola de flores cortadas de clavel.

Materiales y métodos

Material por equipo (proporcionado por los alumnos)

Papel aluminio

1 Navaja

2 floreros

Material por grupo

2 matraces Erlenmeyer de 250 ml

2 matraces volumétricos de 250ml

1 matraz Erlenmeyer de 500ml

1 parrilla con agitación magnética

1 agitador magnético

1 botella con aspersor

Material biológico

12 flores cortadas de clavel con botón semi-abierto

Reactivos

Nitrato de plata AgNO_3

Tiosulfato de sodio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Agua destilada

Metodología

Preparar las siguientes soluciones:

250ml de AgNO_3 8mM

250 ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 32mM1.

Verter las dos soluciones a un matraz Erlenmeyer de 500 ml y mezclar con agitación rápida.

2. Pasar la mezcla de las soluciones a la botella con aspersor la cual debe estar envuelta con papel aluminio (para evitar la exposición a la luz).
3. Cortar la base de los tallos de las flores bajo el chorro del agua.
4. Colocar 6 flores en cada florero con agua.
5. Asperjar con la solución de tiosulfato de plata las corolas de las flores únicamente de un florero. Al otro no se le asperja (testigo).

Resultados

1. Medir el diámetro de las corolas al inicio y en cada día. Obtener el promedio y la desviación estándar (DE), registrar los resultados en el cuadro 1 y graficarlos.

Cuadro 1

Días	Diámetro promedio \pm DE	Diámetro promedio \pm DE
	Testigo	+STS
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		

2. Registrar diariamente los síntomas de senescencia para cada lote (testigo y +STS) y compararlos.

Cuestionario

1. ¿Qué es el climaterio?.
2. Describa la biosíntesis del etileno.
3. ¿Cuál es el efecto del etileno en la maduración de la flor o el fruto?.

Bibliografía

-  Buffer G, Mor Y, Reid MS, Yang SF. 1980. Changes in 1-aminociclopropane-1-carboxylic-acid content of cut carnation flowers in relation to their senescence. *Planta* 150: 439-442.
-  Bidwell, R.G.S. 1993. *Fisiología Vegetal*. AGT Editor, S.A. México.
-  Salisbury, F.B y Ross, C. W. 1994. *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica. México D.F. México.
-  Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologist. USA.
-  Azcón-Bieto J. Y Talón, M. 2003. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. 1era edición, España.
-  Nicolás, G., Bradford, K.J, Côme, D., Pritchard, H.W. 2003. *The Biology of Seeds: Recent Research Advances*. CABI Publishing.
-  Hopkins, W., Hüner N. 2004. *Introduction to Plant Physiology*. 3a edición John Wiley USA.
-  Taiz, L., Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc. 5ª edición USA.

Inhibición de senescencia foliar

Introducción

La senescencia o envejecimiento es la fase del crecimiento vegetal que se extiende desde la plena madurez hasta la muerte real y se caracteriza por la acumulación de productos metabólicos y pérdida de peso seco. La senescencia de las hojas se pone de manifiesto por la presencia de clorosis (color amarillo debido a la pérdida de clorofilas), que tiene lugar antes de la abscisión o bien antes del marchitamiento y muerte de aquellas hojas que no sufren abscisión. La senescencia foliar es un proceso genéticamente programado en el que ocurre una reducción del metabolismo fotosintético aunado a la disminución del contenido de clorofilas y a la reubicación de diversos metabolitos fuera de las hojas. La senescencia foliar es regulada por las hormonas citocininas. En el presente experimento se estudiará la influencia de las citocininas en la capacidad de retención de clorofilas.

Objetivo general

Determinar el efecto de las citocininas en la pérdida de clorofila como parte del proceso de senescencia en hojas de maíz.

Objetivos particulares

1. Determinar la pérdida de clorofila durante el proceso de senescencia en hojas de maíz.
2. Observar el efecto de la bencil adenina en la degradación de la clorofila en hojas de maíz.

Materiales y métodos

Material por equipo

- 14 Cajas de Petri
- 14 tubos de ensayo con rosca
- 1 gradilla
- 1 espátula
- 1 pinza de disección
- 1 cristizador de 50x100
- 1 gradilla para ebullición
- 2 celdas para espectrofotómetro
- 1 vaso de precipitados de 250 ml
- 1 espectrofotómetro
- 1 parrilla eléctrica
- *1 rollo de papel aluminio
- * material proporcionado por el alumno

Material por grupo

- 1 balanza analítica

Material biológico

- Granos de maíz (*Zea mays* L.)

Reactivos

- Etanol absoluto
- N'-benciladenina

Metodología

Preparación de soluciones:

Solución de etanol al 80% v/v

800 ml de etanol

200 ml de agua

Solución de N'-benciladenina (20µg/ml)

Pesar 2 mg de cinetina (N'-benciladenina) en una balanza analítica y aforar a 100 ml.

Nota: Para preparar la cinetina, es necesario agregar unas gotas de KOH al 30% p/v, hasta que esté totalmente disuelta la cinetina. Esta operación debe realizarse en un volumen máximo de 5 ml y luego aforar a la marca de 100 ml.

Siembra y preparación de muestras

Actividades previas a la práctica

1. Quince días antes del experimento poner a germinar 25 semillas de maíz sobre un soporte de agrolita (ver Anexo).
2. Suplementar con luz de día (fotoperíodo natural de 12 h aproximadamente). Regar cada tercer día.

Día de la práctica

1. Seleccionar las 10 plantas que sean más uniformes.
2. Cortar todas las plantas al ras del soporte de agrolita.
3. Inmediatamente después de la cosecha, separar las plántulas en 3 series de 2 plantas. Cortar las hojas de cada serie y pesarlas en una balanza analítica.
4. Utilizar 2 series de 2 plantas cada una para la determinación inicial de clorofila.

Preparar una serie de cajas de Petri de acuerdo al siguiente cuadro 1:

Cuadro 1

Caja	1	2	3
ml de cinetina	0	5	10
ml de agua destilada	10	5	0

NOTA: Es recomendable preparar cada una de las mezclas anteriores en un tubo de ensayo y luego adicionarlas a las cajas de Petri.

1. Colocar en cada una de las cajas de Petri una serie de las hojas procedentes de las 2 plantitas.
2. Sellar la caja de Petri con papel parafilm para evitar la desecación y forrar con papel aluminio.
3. Guardar las cajas de Petri durante 2 a 4 días a temperatura ambiente en oscuridad. El tiempo se seleccionará dependiendo del día de laboratorio.

Extracción y determinación de clorofila

1. Colocar las series de hojas procedentes de 2 plantas en tubos de ensayo forrados totalmente con papel aluminio. Cada tubo deberá contener 10 ml de etanol al 80% v/v.
2. Ebullición por espacio de 10 min tapando el tubo con una canica para extraer las clorofilas.

3. Llevar el extracto a 10 ml con etanol 80% v/v en caso de que éste haya sufrido evaporación para lo cual es recomendable indicar el volumen de 10 ml con un marcador antes de llevar a cabo la ebullición de los tubos.
4. Leer la absorbancia de cada tubo a 665 y 649 nm contra un blanco de etanol al 80% v/v.

Guía para reportar e interpretar los resultados

Cálculos:

1. Expresar el contenido de clorofila al tiempo cero como mg de clorofila por gramo de peso fresco utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Clorofila } a = 12.7 (A_{663}) - 2.69(A_{645})x \frac{V}{1000 x pf}$$

$$\text{Clorofila } b = 22.9 (A_{645}) - 4.68(A_{663})x \frac{V}{1000 x pf}$$

$$\text{Clorofila total} = 20.2 (A_{645}) + 8.02 (A_{663})x \frac{V}{1000 x pf}$$

Donde:

A = absorbancia del extracto de clorofila leída a la longitud de onda indicada en el subíndice.

V = volumen final del extracto clorofila en acetona 80%.v/v.

pf = peso fresco en gramos del tejido extraído.

2. Expresar el contenido de clorofila al final del tratamiento (2 a 4 días) como mg de clorofila por gramo de peso fresco.

Resultados

Graficar el porcentaje de clorofila retenida contra la concentración de cinetina.

Cuestionario previo a la práctica

1. Define el fenómeno de senescencia.
2. Describe un método alternativo para cuantificar la senescencia.
3. Explica qué sucedería si en lugar de usar cinetina, se usara ácido giberélico.

Bibliografía

-  Vernon, L. P. (1960) Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. *Anal. Chem.* 32: 1144-1150.
-  Fernández, G. Y Johnston, M. 1986. *Fisiología Vegetal Experimental*. IICA, San José, Costa Rica.
-  Azcon-Bieto, J. y Talon M. 1993. *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Interamericana McGraw-Hill, Madrid, España.
-  Bidwell, R.G.S. 1993. *Fisiología Vegetal*. AGT Editor, S.A. México.
-  Salisbury, F.B y Ross, C. W. 1994. *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica. México D.F. México.
-  Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologist. USA.
-  Nicolás, G., Bradford, KJ, Côme, D., Pritchard, H.W. 2003. *The Biology of Seeds: Recent Research Advances*. CABI Publishing.
-  Hopkins, W., Hüner N. 2004. *Introduction to Plant Physiology*. 3a edición John Wiley USA.
-  Taiz, L., Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc. 5ª edición USA.

Síntesis de almidón mediante la fotosíntesis

Esta práctica se realizará en 2 sesiones.

Introducción

Los organismos fotosintéticos productores de O_2 usan energía lumínica, CO_2 y agua para producir la materia orgánica necesaria para su alimentación. El O_2 que liberan se forma con átomos provenientes del agua. La fotosíntesis se realiza en dos etapas: la lumínica, en la que se utiliza la energía de la luz para sintetizar ATP y NADPH, y la fijadora de carbono (Ciclo de Calvin), que utiliza los productos de la primera etapa para la producción de azúcares (glucosa, fructosa). El gliceraldehído fosfato producido por el ciclo de Calvin se integra en glucosa o fructosa. Las células vegetales usan estas sustancias para elaborar almidón, celulosa y sacarosa. Todas las células utilizan azúcares para la elaboración de otros carbohidratos, lípidos y aminoácidos.

Objetivo general

Comprobar la síntesis de almidón mediante el proceso de fotosíntesis.

Objetivo particular

Evaluar mediante la aplicación de lugol la presencia de almidón por el proceso de fotosíntesis en hojas de geranio.

Primera sesión

Materiales y métodos

Material por equipo

Papel aluminio.

20 – 30 clips para hojas de papel.

Material Biológico (proporcionado por el alumno)

1 planta de geranio chica (en maceta, en buenas condiciones fisiológicas y con gran superficie foliar) por equipo.

Metodología

Aplicación del tratamiento a la planta de geranio:

1. A la planta de geranio, se le cubrirán las hojas (haz y envés) con papel aluminio, cubriendo SOLAMENTE la mitad de la hoja. Sujetar con un clip el aluminio puesto en cada una de las hojas.
2. Colocar la planta en condiciones de luz durante 7 días.

Segunda sesión

Materiales y métodos

Material por equipo

1 Parrilla

1 vaso de precipitados de 100 ml

2 vasos de precipitados de 500 ml

1 pipeta Pasteur con bulbo

1 espátula

1 varilla de vidrio

3 cajas de Petri

Fécula de maíz (1 – 2 cucharadas) (proporcionado por el alumno)

Media cartulina color blanco (proporcionado por el alumno)

Reactivos

Agua destilada

Alcohol etílico

Lugol

Metodología

Control positivo (método de detección de almidón):

1. Colocar en un vaso de precipitados de 100 ml, una cucharada pequeña de fécula de maíz (almidón de maíz).
2. Adicionar agua destilada y agitar hasta que se disuelva la fécula de maíz.
3. Agregar 5 gotas de lugol.
4. Observar el color que toma la muestra y anotar.

Prueba de almidón en hojas de geranio:

1. Retirar el aluminio y los clips de las hojas de geranio
2. Colocar las hojas de geranio en 1 vaso de precipitados de 500 ml.
3. Adicionar etanol hasta que las hojas queden totalmente sumergidas y poner a hervir aproximadamente 3 min o hasta que se elimine la coloración de las hojas de geranio. Las hojas tomarán un color de verde oscuro a verde claro.

4. Retirar las hojas de geranio del etanol y secarlas con papel absorbente cuidando no dañar las hojas.
5. En un vaso de precipitados de 500 ml, colocar 50 ml de agua destilada y adicionar lugol hasta que la solución tenga un color roizo oscuro. Agitar.
6. Colocar las hojas decoloradas en la solución de lugol durante 30 min.
7. Retirar las hojas de la solución de lugol, enjuagar con agua destilada y colocarlas en cajas de Petri.
8. Colocar las hojas enjuagadas en la cartulina blanca y observar la coloración que adquirieron las hojas de geranio. Anotar observaciones.

Resultados

Discutir los resultados obtenidos con base al cambio de coloración observado en las hojas de geranio.

Cuestionario previo a la práctica

1. ¿Qué es la fotosíntesis y cuál es su importancia?
2. ¿Cuáles son los principales productos de la fotosíntesis?
3. ¿Qué es el lugol y cuáles son sus aplicaciones?
4. ¿Cuál es la reacción que se lleva a cabo entre el lugol y el almidón con respecto al cambio de coloración?

Bibliografía

1. Bidwell, R.G.S. 1993. Fisiología Vegetal. AGT Editor, S.A. México.
2. Salisbury, F.B y Ross, C. W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México D.F. México.
3. Taiz, L., Zeiger, E. 2000. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc. USA.
4. Azcón-Bieto J. Y Talón, M. 2003. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. 1era edición, España.
5. Hopkins, W., Hüner N. 2004. Introduction to Plant Physiology. 3a edición John Wiley USA.
6. El cuaderno de por qué biotecnología. "Cuaderno No. 107 Fotosíntesis I y II", Edición No. 72

Anexo

Este anexo contiene información acerca de algunos procedimientos especiales que serán usados a lo largo del curso en todas o casi todas las prácticas.

Es importante recordar que el material biológico lavado y desinfectado debe manejarse con las manos limpias o en caso de ser necesario usar guantes. Por otro lado, en varias ocasiones las semillas serán imbibidas en agua, como parte de los protocolos se deberá usar AGUA DESTILADA ESTÉRIL (ADE) en todos los casos, así como también en la preparación de las soluciones. Además, los frascos y tapones que servirán para almacenar las soluciones deberán lavarse adecuadamente y al final enjuagarse con etanol al 70% v/v y ADE.

El seguimiento de las recomendaciones anteriores minimizará el riesgo de contaminación del material durante los experimentos.

Selección del material biológico

Las semillas o granos que se utilicen en los experimentos deben seleccionarse previamente. Se desecharán aquellas semillas o granos en las que:

1. El embrión se encuentre dañado (perforado, incompleto, contaminado o expuesto).
2. Tengan dañada la testa (lesiones, desprendimientos, decoloración).
3. Se presenten orificios en el endospermo (es indicativo de la presencia de parásitos).
4. Haya cambios en el color de la semilla (éste debe ser uniforme).
5. La consistencia no sea firme.
6. Se presenten huellas de humedad (manchas, olores, viscosidad, etc.).

Las semillas utilizadas deben desinfectarse adecuadamente para evitar la contaminación de las mismas y evitar interferencias en los resultados.

Lavado y desinfección

En un vaso de precipitados de tamaño adecuado se colocan las semillas seleccionadas, se agrega una solución de etanol al 70% v/v hasta cubrirlas, se agitan durante 40 s y se enjuagan dos veces con ADE.

Con este lavado se elimina la tierra, grasa y materiales adheridos a la semilla.

Una vez lavadas las semillas se sumergirán en una solución de cloro 1.5% p/v* para desinfectarlas superficialmente durante 3 minutos (las semillas pueden presentar un ligero cambio de color), posteriormente, decantar el cloro y enjuagar varias veces las semillas agitando con ADE suficiente.

*Solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % p/v; tomar 1 parte de blanqueador y diluirlo en 3 partes de agua destilada. Usar blanqueador comercial Cloralex o el Chinito; con una concentración de hipoclorito de sodio entre el 5 al 6% p/v de ingrediente activo (ver Anexo).

La desinfección elimina la contaminación por hongos y bacterias presentes en la superficie de las semillas.

Germinación

Técnica con papel

En una palangana limpia se coloca ADE (aproximadamente hasta un cuarto o la mitad del volumen dependiendo de la cantidad de papel) y se van sumergiendo transversalmente las toallas de papel (usualmente estas toallas son de doble hoja, no deben separarse).

Una vez humedecida la toalla se colocan las semillas en hileras horizontales sobre la charola de siembra, las semillas se cubren con otra toalla húmeda y se enrollan, para obtener "un taco". Posteriormente, cada uno de los "tacos" se deberá rotular utilizando marcador indeleble con los siguientes datos:

1. Tipo de grano o semilla: maíz, frijol, cebada etc.
2. Tratamiento: solución agregada (nombre, molaridad, toxicidad)
3. Tiempo de tratamiento: horas o días de imbibición.
4. Fecha de inicio de la imbibición:
5. Equipo:

Por último, la charola de siembra deberá cubrirse con una película plástica adherente (egapack®) y mantenerla a temperatura constante (25-28°C) utilizando una estufa.

Cuando los tratamientos se prolongan por más de 2 días, procurar mantener el papel húmedo con ADE.

Técnica con algodón

En un recipiente de plástico (el tamaño varía dependiendo del número de semillas) se coloca una "cama" de algodón estéril y se humedece completamente con ADE. El grado adecuado de humedad puede determinarse inclinando el recipiente y observando que el agua no se acumule en alguna de las esquinas; si esto ocurre, decantar el excedente de agua. Las semillas previamente desinfectadas se colocan en hileras horizontales, dejando entre cada semilla un espacio aproximado de 1 cm y de 2 .5 cm entre cada hilera. Posteriormente, se cubren con otra capa de algodón húmedo.

El recipiente deberá cubrirse con papel aluminio o con una película plástica adherente (egapack®) para evitar que pierdan humedad y mantenerlo a temperatura constante (25-28°C) utilizando una estufa. Cuando los tratamientos se prolongan por más de 2 días, procurar mantener el papel húmedo con ADE.

Soportes inertes

Uno de los soportes inertes más usados es la agrolita, el cual se utiliza de la misma manera que la tierra común cuando es necesario mantener las plantas tiempos prolongados. Por otra parte, la agrolita se puede enriquecer con fertilizantes.

En un recipiente de tamaño adecuado se coloca una capa de agrolita de aproximadamente 1.2 cm y se humedece con ADE (el polvo de agrolita puede ser irritante para la nariz, boca y ojos, es necesario utilizar cubre bocas. El grado adecuado de humedad puede determinarse inclinando el recipiente y observando que el agua no se acumule en alguna de las esquinas; si esto ocurre, decantar el excedente de agua.

Utilizando una varilla de vidrio, se hacen surcos horizontales en la agrolita y se colocan las semillas previamente desinfectadas dejando aproximadamente 2 cm entre cada una y 2.5 cm entre cada surco. Finalmente, se cubren las semillas usando la misma agrolita desplazada por el surco. El recipiente deberá cubrirse con una película plástica adherente (egapack®) y mantenerla a temperatura constante (25-28°C) utilizando una estufa.

Es importante revisar el nivel de humedad del soporte, ya que la agrolita pierde agua fácilmente.

Envejecimiento o deterioro de semillas

Procedimiento II

Las semillas desinfectadas se colocan en bolsas de gasa y se sumergen en agua caliente a 70°C (baño María), durante periodos que van desde los 40 segundos hasta los dos minutos. Las semillas se secan y se enfrían sobre papel absorbente a temperatura ambiente antes de ser usadas.

El daño por este método se basa en la desnaturalización de proteínas por efecto de la temperatura.

Procedimiento II

Las semillas se sumergen en una solución de NH_4Cl al 4% p/v durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las semillas se lavan con ADE y se dejan secar sobre papel absorbente a temperatura ambiente antes de ser usadas. El daño causado se basa en el aumento de la permeabilidad de la testa y la acumulación de niveles tóxicos de la sal dentro de la semilla.

Manual de prácticas de laboratorio. Fisiología y Bioquímica Vegetal

Se terminó de imprimir en diciembre de 2013,
con un tiraje de 200 ejemplares, más sobrantes para reposición.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Av. San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina
C.P. 09340, Del. Iztapalapa, México D.F.
Tel.: (01) 58044600