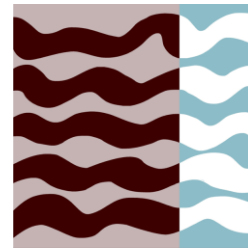


Prácticas de Fisiología Vegetal

Ingeniería agrónoma grado en hortofruticultura y jardinería



Universidad
Politécnica
de Cartagena



ETSia
Cartagena

Jorge Cerezo Martínez
María Albadalejo Olivo
María del Mar Galindo Galindo
Obdulia Martínez Oró

1ª Práctica: Análisis del crecimiento en plántulas

1. Objetivo

El objetivo de la práctica es comprobar el crecimiento en los tallos de plántulas de altramuz.

2. Material utilizado

- Cámara húmeda: Forrar las paredes de un vaso con papel humedecido
- Material para marcaje (Rotulador)
- Regla

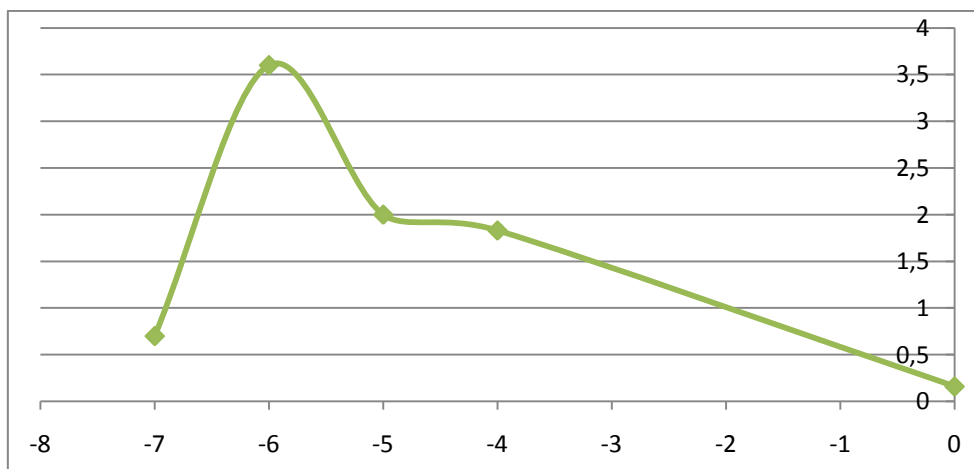
3. Protocolo

Distribución del crecimiento en tallo: Seleccionar seis plántulas etioladas, aproximadamente des seis días de edad y hacer cuidadosamente 10 a 2mm de intervalo sobre cada uno de los epicotilos. Colocar la regla de forma vertical y comenzar a marcar a partir de la punta del epicotilo. Devolver la plántula a la oscuridad.

Después de 48 horas sacar la medida de elongación para cada uno de los 10 intervalos.

4. Resultados y discusión

1. Representar para la raíz y el tallo en papel milimetrado, las longitudes medias frente al número de intervalos.



2. ¿Tiene alguna influencia el marcaje sobre la elongación? ¿Por qué razón?

En teoría sí, las marcas más próximas a la parte extrema del epicotilo crecerán más rápido que las que se encuentren en su parte opuesta.

SECCION	L.INICIAL	L.FINAL	PORCENTAJE
A	5	5,5	10%
B	5	5,7	14%
C	5	5,7	14%
D	5	5,8	16%
E	5	5,8	16%
F	5	5,5	10%

Práctica 2: Bioensayo de auxinas

1. Introducción

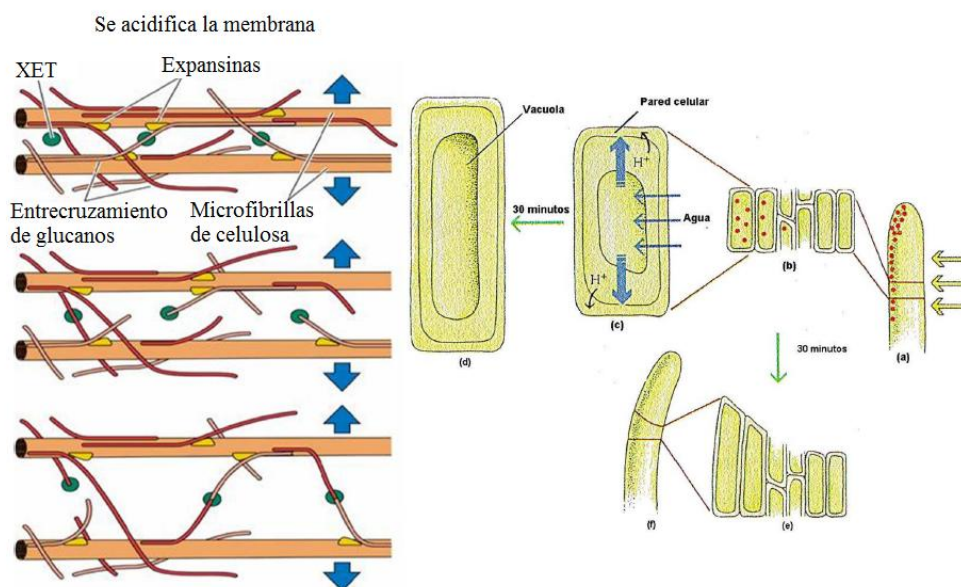
Las plantas superiores están caracterizadas por su inmovilidad y por su autotrofia para el carbono. Esto significa que poseen un entorno limitado para la captación de nutrientes.

Con el fin de soslayar este impedimento, las plantas desarrollan una estructura dendrítica que favorece su contacto superficial con el medio. El soporte para tal estructura consiste en el relleno con agua de las vacuolas de las células. Las células se dotan, además, de unas paredes celulares construidas con materiales procedentes de la asimilación autotrófica del carbono (celulosas, hemicelulosas y pectinas), que aportan rigidez al sistema. La adición de lignina completa el refuerzo necesario.

Sin embargo, la eficacia mostrada por esta estructura para la captación de luz, agua y nutrientes se ve contrarrestada por el aislamiento que impone a las células individuales. Éstas, rodeadas por materiales aislantes, no pueden transmitir impulsos eléctricos a través de sus membranas. Por eso, la transmisión de la información es mucho más difusa que en las células animales.

Por tanto, en las plantas la homeostasis se lleva a cabo mediante sustancias químicas que portan la información sobre sus estructuras moleculares. El hecho de que la transmisión de estas señales se tenga que realizar mediante difusión pasiva o facilitada por algún sistema de transporte masivo (xilema o floema) implica la lentitud en los procesos de correlación. Por ello, los cambios morfogénicos y de comportamiento se confunden a veces en plantas, y las correlaciones espaciales pueden llegar a ser más importantes que las temporales.

La estructura de las células vegetales está condicionada por su contenido en agua y por su pared rígida. Para que una célula crezca se necesita una fuerte directriz, así como una alteración de las propiedades elásticas y plásticas de la pared (ablandamiento que permita la expansión celular gracias a la tensión de turgencia celular). El aumento de tamaño irá acompañado por la síntesis de nuevos materiales que refuercen las membranas y rellenen las paredes y los espacios apopláticos en crecimiento. La consolidación de las nuevas estructuras formadas hará irreversible el proceso, y la célula habrá alcanzado así, definitivamente, un mayor tamaño.

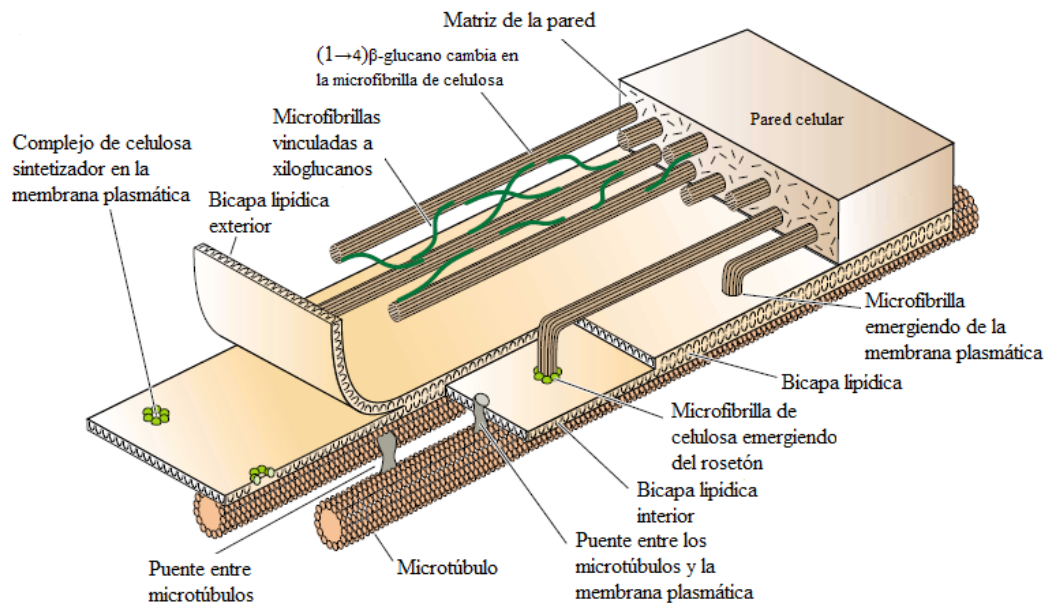


Este crecimiento tiene una interpretación bioquímica; la pared celular es un entramado de fibras de celulosa unidas a hemicelulosas, sustancias pécticas, y algunas proteínas estructurales. El crecimiento implica la ruptura de algunos de estos enlaces para permitir la expansión celular. La ruptura de puentes de hidrógeno entre microfibrillas de celulosa, medida por las proteínas llamadas expansinas, es otro mecanismo importante.

La auxina podría ejercer su acción a través de la acidificación del apoplasto; la teoría del crecimiento por acidificación sostiene que la estimulación del crecimiento producida por la auxina se debería a la excrección de protones hacia el espacio apoplástico, con disminución de su pH por debajo de 5,5 y la consiguiente alteración en la estabilidad de los enlaces de la pared o la actividad de ciertas enzimas. La teoría exige que se cumplan algunas premisas:

- La auxina ha de provocar la excrección de protones en las células que crecen.
- La adicción de ácidos a los tejidos ejerzca un efecto similar al de la auxina (siempre que la acidez alcance las paredes celulares).
- Las disoluciones reguladoras neutras infiltradas en los tejidos han de contrarrestar la acción de la hormona.
- Cualquier agente que induzca la excrección de protones también ha de provocar un crecimiento celular rápido.

Existen dos receptores auxínicos, uno externo y otro intracelular. Como se indicó el citoplasma es una trampa para AIA^- más aún si el pH externo es más ácido (el AIA y el pH no tienen efectos adictivos sobre el crecimiento, es decir, no actúan independientemente, sino más bien de modo sinérgico).



2. Objetivo

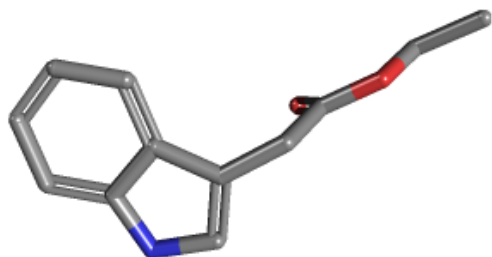
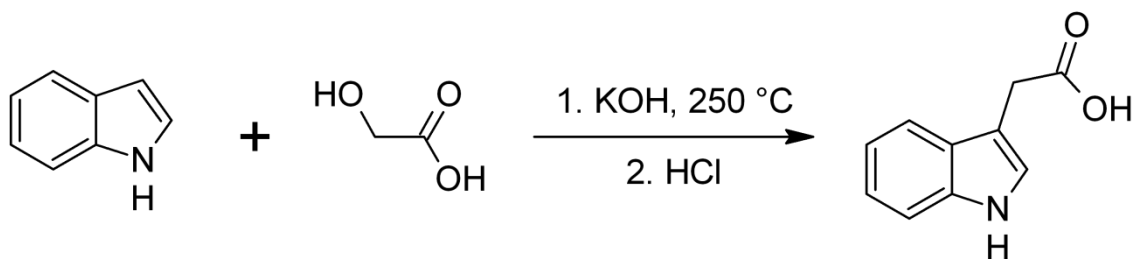
Esta práctica tiene como objetivo ilustrar las técnicas usadas en un bioensayo para auxinas y estudiar el efecto del ácido indol-acético en el crecimiento de secciones de hipocotilo de altramuz.

3. Material

- Plántulas de altramuz de 6 días de edad



■ Ácido indol-acético (AIA)



El ácido indol-acético es un tipo de auxina sintética, es más estable que las auxinas naturales, las cuales se degradan con gran facilidad.

- Medio basal
- Placas Petri
- Bisturí
- Regla

4. Metodología

Para realizar la práctica se deben hacer unos preparativos previos que consisten en la germinación y el crecimiento de las plántulas, para ello, se esterilizan las semillas de altramus durante 5 minutos con hipoclorito sódico al 1%. Se pondrán posteriormente las plántulas en imbibición durante dos horas. Se siembran las semillas en bandejas con vermiculita y se dejan en oscuridad a una temperatura alrededor de los 25°. Las plantas también pueden dejarse crecer en bajo luz roja continua de baja intensidad para aumentar su sensibilidad a la auxina.

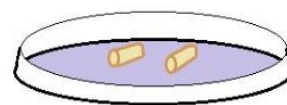
Una vez que han pasado los 6 días, ya tendremos listas las plántulas para poder emplearlas en el bioensayo de auxinas. Los hipocotilos miden alrededor de 25 y 30 mm. Prepararemos 10 secciones subapicales uniformes de 5 mm que las mediremos con la máxima precisión posible con la regla, y cortaremos con el bisturí de forma que quede un corte recto, teniendo en cuenta que descartaremos los tres primeros milímetros. Estas secciones con forma cilíndrica las introduciremos en un medio basal mientras preparamos las disoluciones.

Prepararemos las disoluciones para el ensayo:

- Medio basal (control) [AIA] = 0 M
- [AIA] = 10⁻⁷M
- [AIA] = 10⁻⁶M
- [AIA] = 10⁻⁵M
- [AIA] = 10⁻⁴M

Incubaremos los cilindros que hemos seccionado durante 24 horas en oscuridad. Introduciremos cilindros en cada placa Petri que identificaremos con una disolución distinta.

Una vez transcurrido este tiempo, cogeremos las placas Petri para sacar las secciones cilíndricas, las secaremos y las mediremos para ver la diferencia que existe con el control.

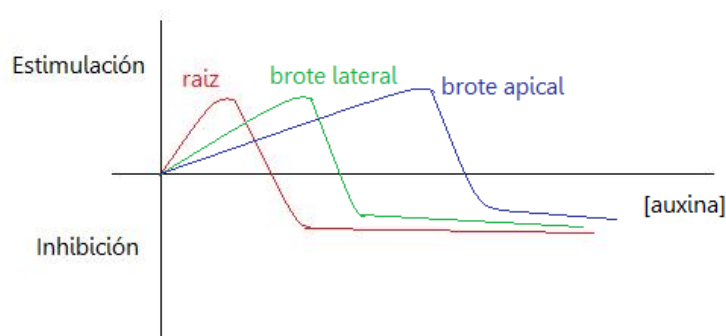


5. Resultados

[AIA]	L final (mm)						Media	ΔL
0	5	5	5	6	5	5	5.16	0.16
$10^{-4}M$	8	6	6	8	6	7	6.83	1.83
$10^{-5}M$	7	5	7	9	8	6	7	2
$10^{-6}M$	8	10	8	8.5	10	7	8.6	3.6
$10^{-7}M$	6	6	5	5	7	5	5.66	0.66

6. Conclusiones

Los valores obtenidos son los que aparecen en la tabla sombreados de azul son los obtenidos por nuestro grupo, analizando los datos en el medio basal uno de los cilindros nos da unos 6 mm, puede que sea un error de precisión, puesto que en el medio basal no existe actividad que elongue el hipocotilo. Se puede apreciar en todos los casos como es en las concentraciones de $10^{-5}M$, $10^{-6}M$, por lo que el punto donde alcanzan una mayor elongación por la acción de las auxinas se conoce como valor óptimo fisiológico. La aplicación de auxinas a las plantas depende de la concentración de hormona así como del tipo de órgano tratado, aquí se muestra la diferencia según el órgano:



La concentración de auxina necesaria para estimular el crecimiento es menor en raíces que en brotes laterales, y ésta es menor que en brotes apicales. Por tanto, el AIA tiene distintos efectos a diferentes concentraciones y sobre un mismo órgano, y afecta de forma diferente a los distintos tejidos.

La sensibilidad con las auxinas puede variar con la edad y con las condiciones ambientales.

Práctica 3: Efecto de Kinetina sobre la senescencia de hojas

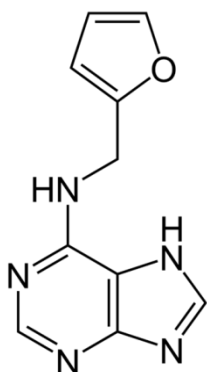
1. Objetivo

Estudiar el efecto de las citoquininas en el retraso de la senescencia, midiendo la retención de clorofila en hojas separadas de la planta.

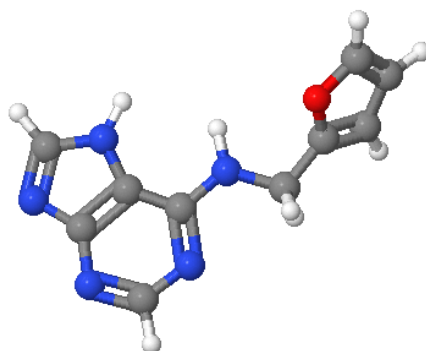
2. Material

- Hojas verdes de plantas jóvenes (cebada)
- Placas Petri
- Acetona 80%

- Disoluciones de Kinetina (10, 1 y 0,1 mg/l)



Kinetina es un tipo de citoquinina, una clase de hormona vegetal que promueve la división celular. La Kinetina es de uso frecuente en cultivo de tejidos vegetales para inducir la formación de callo (junto con la auxina) y para regenerar los tejidos dispartar a partir del callo (con concentración de auxina más baja).



- Morteros
- Pipeta Pasteur
- Espectrofotómetro
- Protocolo

Seleccionar hojas sanas y pesar 4 lotes de 0,5 g cada uno. Cortarlas en secciones de 1-2 cm de longitud. Preparar 4 placas Petri conteniendo 25 ml de cada una de las siguientes disoluciones

- H₂O destilada
- Disolución de Kinetina de 0,1 mg/l ($5 \cdot 10^{-7}$ M)
- Disolución de Kinetina de 1mg/l ($5 \cdot 10^{-6}$ M)
- Disolución de Kinetina de 10 mg/l ($5 \cdot 10^{-5}$ M)

Colocar las secciones en cápsulas y taparlas, guardándolas en la oscuridad durante los días que dure el experimento (7 días).

Transcurrido este tiempo, determinar el contenido en clorofila total (mg clorofila/g tejido) de las hojas de cada tratamiento, utilizando el procedimiento descrito. Determinar, asimismo, el contenido clorofílico de hojas recién cortadas de la planta, que será el valor que nos proporcionará una referencia sobre la pérdida de clorofila que experimentan las hojas en cada tratamiento.

Procedimiento para la extracción: colocar 0,5 g (peso fresco) de trozos de hoja en un mortero limpio. Triturar el tejido hasta obtener una pulpa fina y añadir 20 ml de acetona 80% (v/v). Transferir cuidadosamente (mediante una pipeta Pasteur) el líquido verde resultante a un embudo Büchner conteniendo una hoja de papel de filtro Whatman nº1. Mientras se filtra el extracto repetir la trituración de pulpa con otros 15 ml de acetona al 80%. Después de la segunda extracción el tejido debe carecer de clorofila. Si esto no ocurre, repetir la trituración con otros 10 ml de acetona al 80%, y filtrar el extracto. Para facilitar el cálculo de la cantidad de clorofila presente, llevar el filtrado hasta un volumen final de 50 ml con acetona 80%, para conseguir finalmente 1 ml de acetona por cada 10 mg de material vegetal

Determinación de la cantidad de clorofila. Leer y anotar la densidad óptica o absorbancia del extracto clorofílico con el espectrofotómetro a 652 nm. El ajuste inicial del aparato debe hacerse con un blanco de acetona al 80%. Calcular a continuación los miligramos de clorofila por gramo de tejido foliar, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Clorofila total} = \left(\frac{1000 \cdot D_{652}}{34,5} \right) \cdot \left(\frac{V \cdot W}{1000} \right)$$

De donde, D representa la absorbancia, V es el volumen final del extracto clorofílico (ml) y W el peso fresco (gr) de tejido.

[Kinetina]	Absorbancia
Agua	0.087
0.1µM	0.17
1 µM	0.456
10 µM	0.544

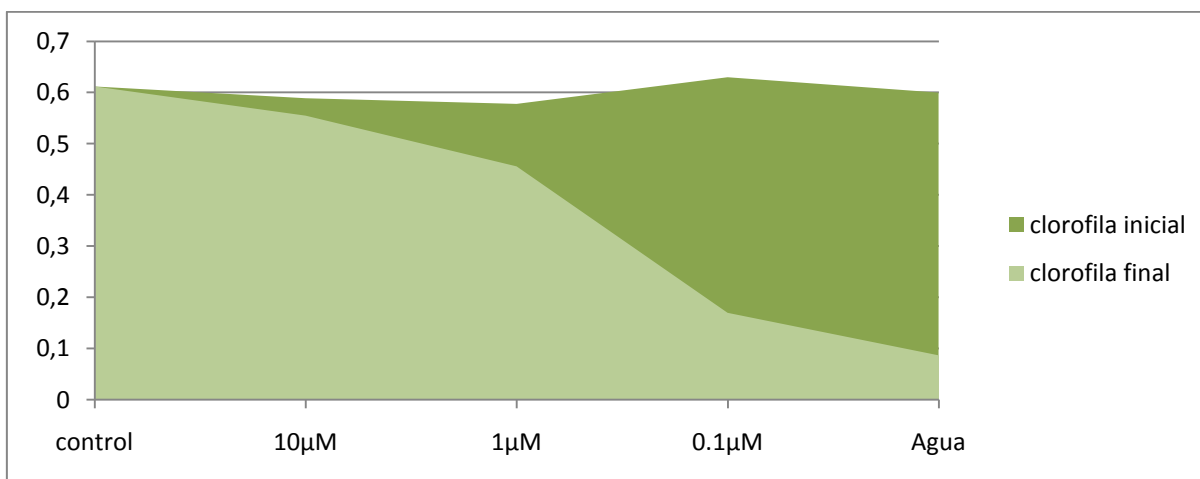
1. Observar las secciones de cada placa y comentar los cambios visibles de coloración.

En la placa control (sólo H₂O) las secciones muestran una decoloración, han perdido el color verde, y se encuentran amarillentas.

En la placa de 10µM las hojas mantienen color verde pero de menos saturación que inicialmente.

En la placa 1 µM el color es más saturado que en la anterior, y lo mismo sucede con la placa de 0.1 µM.

2. Representar gráficamente la cantidad inicial de clorofila y la obtenida después de cada tratamiento.



3. Interpretar los resultados sobre la base del efecto de la Kinetina en la retención de la clorofila en caso de hojas separadas de la planta.

Menor concentración de Kinetina mayor concentración de clorofila retenida por los segmentos de las hojas.