



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA VEGETAL

MANUAL DE PRÁCTICAS



BIOLOGIA: PLAN DE ESTUDIOS 2017-2

Nombre del Profesor: Dr. Rafael Bello Bedoy

CONTENIDO

<i>PRACTICA #1: LA CELULA Y TINCIÓN DE TEJIDOS.....</i>	7
INTRODUCCIÓN	7
COMPETENCIA	8
OBJETIVO DE LA PRÁCTICA	8
MATERIAL.....	8
METODOLOGÍA.....	8
RESULTADO	10
LITERATURA RECOMENDADA	10
<i>ACTIVIDADES ANEXAS.....</i>	10
<i>PRACTICA #2: DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL HÍDRICO POR EL MÉTODO DE LA CÁMARA DE PRESIÓN SCHOLANDER-HAMMEL Y DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE MASA-ÁREA FOLIAR.</i>	11
INTRODUCCIÓN	11
COMPETENCIA	11
OBJETIVO DE LA PRACTICA	11
MATERIAL.....	11
METODOLOGÍA.....	12
RESULTADO	13
LITERATURA RECOMENDADA	13
<i>PRACTICA #3: ESTIMACIÓN DE DENSIDAD ESTOMÁTICA POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE ESMALTE.....</i>	14
INTRODUCCIÓN	14
COMPETENCIA	14
OBJETIVOS DE LA PRACTICA.....	14
MATERIAL.....	15
METODOLOGÍA.....	15
RESULTADO	16
LITERATURA RECOMENDADA	16
<i>PRACTICA #4: ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE CLOROFILA EN HOJAS.</i>	17

INTRODUCCIÓN	17
COMPETENCIA	17
OBJETIVOS DE LA PRACTICA	18
MATERIAL	18
METODOLOGÍA	18
RESULTADO	21
LITERATURA RECOMENDADA	21
<i>PRACTICA #5: DETERMINACION DE ACIDOS TOTALES POR TITULACION (ACIDEZ TITULABLE) EN PLANTAS CAM.</i>	22
INTRODUCCIÓN	22
COMPETENCIA	23
OBJETIVO DE LA PRACTICA	23
MATERIAL	23
METODOLOGÍA	24
RESULTADO	25
LITERATURA RECOMENDADA	25
<i>PRACTICA #6: INFLUENCIA DEL PH SOBRE LOS PIGMENTOS ANTOCIANINAS Y BETALAINAS.</i>	26
SECCION I.....	26
INTRODUCCIÓN	26
COMPETENCIA	27
OBJETIVO DE LA PRACTICA	27
MATERIAL	27
METODOLOGÍA	28
RESULTADO	29
LITERATURA RECOMENDADA	29
<i>PRACTICA #6: INFLUENCIA DEL PH SOBRE LOS PIGMENTOS ANTOCIANINAS Y BETALAINAS.</i>	30
SECCION II.....	30
INTRODUCCIÓN	30
COMPETENCIA	31

OBJETIVO DE LA PRACTICA	31
MATERIAL	31
METODOLOGÍA	32
RESULTADO	34
LITERATURA RECOMENDADA	34
PRACTICA #7: PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE COLEÓPTILOS CON AUXINAS	35
INTRODUCCIÓN	35
COMPETENCIA	35
OBJETIVO DE LA PRACTICA	36
MATERIAL	36
METODOLOGÍA	37
RESULTADO	38
LITERATURA RECOMENDADA	38
ANEXO I	39
LITERATURA RECOMENDADA PARA LA INTRODUCCION, ANTECEDENTES Y DISCUSION DE TUS RESULTADOS	39

Reglas de seguridad en el laboratorio

1. *El estudiante deberá de utilizar en todo momento el calzado cerrado y vestimenta correcta, así como bata dentro del laboratorio durante la sesión de la práctica.*

 2. *El estudiante deberá de leer previamente las instrucciones de la practica a realizar.*

 3. *El estudiante deberá de portar bata dentro del laboratorio, así como el equipo de protección indicado en cada práctica.*

 4. *El estudiante deberá de hacer uso de bitácora de laboratorio, así como hacer registro en él, de las notas, técnicas empleadas, los resultados y modificaciones dentro de la práctica.*

 5. *Antes de comenzar una práctica, el estudiante deberá de limpiar y ordenar su área de trabajo.*

 6. *No se permite comer, tomar o fumar dentro del laboratorio.*

 7. *El estudiante deberá conservar su mesa y lugar de trabajo con el mínimo de equipo y material necesario, en condiciones de limpieza, a fin de evitar accidentes.*

 8. *Durante y al término de cada práctica, el estudiante debe de regresar el material biológico, reactivo(s), solución (es) o equipo que utilizó en su práctica al lugar asignado.*

 9. *Al termino de preparar una muestra biológica o una solución química dentro del laboratorio, el estudiante deberá de guardar y/o envasar y rotular dicha preparación*

 10. *Si llegara a ocurrir algún accidente dentro del laboratorio, el estudiante debe de informar inmediatamente al profesor y/o auxiliar de laboratorio.*

 11. *No se permite realizar experimentos sin autorización del instructor de laboratorio.*
-

Bibliografía

Laboratory Safety Rules, Procedures and Regulations. 2019. California State University, Northridge.

Laboratory Rules.2014. Yale Environmental Health & Safety. University of Yale,

REGLAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO



- Localizar todos los equipos de seguridad como extinguidores, lavador de ojos, regaderas, etc.
- Proteger los ojos si trabajará con reactivos corrosivos, peligrosos o con luz ultravioleta.
- Usar bata de laboratorio, lo protegerá del material corrosivo o blanqueadores.
- Nunca pipetee con la boca o pruebe algún reactivo.
- No fumar, comer o beber en el laboratorio.
- El pelo largo de preferencia recogerlo.
- No usar sandalias con los pies descubiertos.
- No colocar los libros o cuadernos en el área de trabajo.
- Reporte cualquier daño o accidente en el laboratorio.
- Pregunte al maestro cualquier duda en el manejo de reactivos y/o equipos.
- Todos los reactivos pueden ser un riesgo para la salud, trabaje con cuidado.
- La mayoría de las prácticas de este laboratorio usan reactivos cancerígenos o tóxicos, así como agentes potencialmente patógenos, trabaje con seriedad y cuidado.
- En caso de contaminarse con algún reactivo lavarse con agua rápidamente y avisar al maestro.

PRACTICA #1: LA CELULA Y TINCIÓN DE TEJIDOS

INTRODUCCIÓN

La célula es la unidad funcional y estructural en las plantas. La célula posee numerosas adaptaciones y especializaciones para llevar a cabo distintas funciones que permiten capturar agua, luz y transporte de solutos entre sus órganos. Algunas estructuras internas de la célula vegetal son visibles al microscopio de luz, razón por la cual se estudian en la presente práctica. En la célula vegetal es posible identificar tres grandes componentes: a) Pared celular. Es una estructura semirrígida, que encierra la parte viva. Está compuesta por varios tipos de sustancias químicas, entre las que se destacan la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. b) Protoplasto. Es el componente vivo de la célula, organizado como unidad. Lo componen la membrana plasmática, el núcleo, los organelos y el citoplasma. c) Sustancias ergásticas. Son componentes producidos por la acción metabólica del protoplasma. Entre ellos se destacan las sustancias de reserva y los cristales.

El grado de lignificación de las células es usado para poder distinguirlas con métodos de coloración. El azul de toluidina es un colorante que tiñe de violeta o azul oscuro las paredes lignificadas presentes en esclerénquima y xilema, y de rosado las paredes primarias de otros tejidos. La coloración carmín verde de metilo se usa para identificar paredes lignificadas (verde de metilo) y paredes primarias sin lignina (el carmín) como las de floema, parénquima, etc. Alternativamente, la lignina se detecta con fluoroglucina y luego ácido clorhídrico concentrado. El azul de metileno es útil para detectar mucílagos, el lugol para almidón y el sudan III para lípidos. A veces es útil usar colorantes sólo con el objeto de generar contraste y visualizar mejor los tejidos antes de decidirse por una tinción específica, en tal caso se puede emplear safranina, lugol o azul de metileno

COMPETENCIA

Comprender la morfología funcional de plantas desde el laboratorio, por medio de la tinción y elaboración de cortes histológicos de diferentes tipos celulares. Comprender el uso del microscopio como una herramienta para la obtención de evidencia y aceptación de hipótesis.

OBJETIVO DE LA PRÁCTICA

Observar, esquematizar y reconocer los diferentes componentes físicos de la célula vegetal, a través de la comparación de diferentes tipos de células.

MATERIAL

El estudiante hará uso del siguiente material dentro de su práctica.

- Lápiz
- Bitácora
- Una ejemplar de una cebolla
- Un ejemplar de una papa
- Un tallo joven de piligonio
- Una hoja de Patebuey
- Una hoja de guama
- Una muestra de coquito
- Una hoja de buchón.
- Un ejemplar de Araucaria.

METODOLOGÍA

Siga las siguientes instrucciones para obtener el éxito dentro de la practica:

1. Tome una muestra de raíla epidermis de cebolla cabezona (*Allium sp.*), móntela sobre un portaobjetos y obsérvela al microscopio. Luego agréguele una gota de lugol y observe nuevamente. Repita el procedimiento con otro colorante como azul de metileno o tinta china, compárelos. Haga dibujos identificando pared celular, núcleo, nucléolo, protoplasto.
2. Coja un trozo de papa (*Solanum tuberosum*) y haga un corte a mano alzada. Agregue lugol, móntelo en laminilla, observe y dibuje. Identifique granos de almidón (amiloplastos), protoplasto, núcleo. Haga lo mismo con una semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Compare las muestras, haga dibujos.

3. A un trozo de tallo joven de poligonio (*Polygonium* sp.), hágale un corte transversal a mano alzada y obsérvelo al microscopio. Es notable la epidermis mono estratificada, el cordón de esclerénquima, el tejido xilemático continuo y la médula de parénquima con abundante almidón. Adicione lugol a un corte para detallar los gránulos de almidón, y tionina a otro corte para resaltar el esclerénquima y el xilema.
4. Obtenga una hoja de Patebuey (*Bauhinia* sp.) y haga un corte en el peciolo de la hoja. Móntelo y tíñalo con lugol. Observe en la periferia esclerénquima, identifique los haces vasculares y las células de parénquima. A otro corte agréguele tionina. Rotule claramente sus esquemas.
5. Coja una hoja de guama (*Inga edulis*) y obsérvela al estereomicroscopio para detectar numerosos tricomas. Haga un corte en el peciolo o el raquis y tíñalo con tionina. Observe el abundante esclerénquima y el xilema en cordones separados.
6. Tome una muestra de coquito (*Cyperaceae* sp.) y haga un corte transversal del tallo, móntelo en laminilla y tíñalo con lugol. Identifique las células de sostén en la periferia del corte, las células fotosintéticas y las células de conducción. ¿Qué tipos celulares son? Haga esquemas y rotúlelos.
7. Para observar abundante parénquima aerífero (aerénquima), tome una hoja de buchón (*Eichornia* sp.) y haga un corte transversal. Identifique los cordones de parénquima y los espacios aéreos.
8. En un corte transversal de Araucaria (*Araucaria* sp.) identifique abundante clorénquima, en cordones, un haz vascular central, esclerénquima y una capa subepidérmica. Haga dibujos.

RESULTADO

El estudiante presentará dentro de su bitácora, los esquemas de las observaciones realizadas al microscopio dentro de esta práctica.

LITERATURA RECOMENDADA

Audesirk, T., Audesirk, G. Byers, B.E. 2012. Biología: La vida en la Tierra con Fisiología. Pearson Educación México. p837-845.

ACTIVIDADES ANEXAS

1. ¿Detecta diferencias entre los granos de almidón del frijol y de la papa? ¿Hay diferencias al interior de la misma especie? ¿De la misma célula?, ¿por qué?
2. Hay tres tipos principales de cristales: cistolitos, drusas y rafidios. ¿Cómo son sus formas?, ¿de qué están hechos? Haga dibujos de cada uno de ellos en su informe.
3. Investigue acerca de los colorantes usados en histotecnica. Haga un cuadro mostrando el tipo de tejido que identifica y la composición química de la tinción.

PRACTICA #2: DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL HÍDRICO POR EL MÉTODO DE LA CÁMARA DE PRESIÓN SCHOLANDER-HAMMEL Y DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE MASA-ÁREA FOLIAR.

INTRODUCCIÓN

El potencial hídrico de las plantas es una característica que depende de la calidad de la pureza del agua y del sistema que lo contiene en relación a otra. El potencial hídrico es uno de los fenómenos que permite el transporte de agua, minerales y azúcares entre células y a través de los órganos de las plantas. En general, el movimiento en las plantas es generado de sitios de mayor a menor potencial hídrico, ya sea de sitios de alta presión o de mayor a menor potencial osmótico. Este potencial hídrico se puede cuantificar en los tallos de las plantas usando la bomba de presión de Scholander-Hammel y así es posible cuantificar la fuerza que existe dentro de un tallo para determinar la capacidad del agua de movilizar nutrientes y agua necesarios para el crecimiento y la reproducción.

COMPETENCIA

Evaluar la existencia de tensión del agua en el xilema, para comparar el movimiento del agua en el sentido acropétalo y el basipétalo, por medio de una técnica de medición del área de las hojas, para valorar la importancia de la fuerza de gravedad en la vida.

OBJETIVO DE LA PRACTICA

Conocer una técnica para la determinación de potenciales hídricos, a través de la comparación del potencial hídrico de diferentes ejemplares vegetales bajo estrés hídrico y calcular su índice de masa-foliar.

MATERIAL

1. Tanque de gas nitrógeno
2. Cámara de presión Scholander-Hammel.
3. Lupa (se requiere nada más una por cámara de presión)
4. Navaja

5. Bolsas de plástico del tamaño adecuado como para envolver una hoja
6. Cinta para sellar cajas de cartón o película plástica para envolver alimentos.
7. Un pedazo de papel aluminio del tamaño adecuado como para envolver una hoja
8. Trozos de papel milimétrico.
9. Psicrómetro (de bulbo seco y mojado) para medir humedad relativa, o en dado caso, un termómetro.

METODOLOGÍA

1. Elegir dos especies a estudiar. Pueden ser con hojas de características muy distintas (por ejemplo, duras contra blandas, o grandes contra chicas) o que se encuentren en condiciones de estrés hídrico muy distintas, o que sean especies representativas de climas algo distintos (por ejemplo, desierto contra montaña). Medir la temperatura y humedad relativa del ambiente. Tomar muestras de cada especie (de preferencia una muestra por planta, es decir de 5 plantas de la misma especie). Elegir la muestra ya sea hoja (en caso de que tenga peciolo grande, al menos 2 cm de largo) o ramita (en caso que tenga peciolo u hojas pequeñas) y segundos antes de cortar la muestra envolver la hoja o ramita (todas las hojas que se van a medir) con película plástica, tape para sellar cajas o con bolsa de plástico. Cortar la hoja o ramita con una navaja, meterlas a una bolsa de plástico (con papel secante húmedo) y cubrir con papel aluminio para reflejar los rayos del sol. Llevarla rápido al laboratorio. Anotar la hora. Colocar la muestra en la cámara de presión y sellarla bien. Abrir la válvula de aguja para dejar entrar el gas y ajustar para que el aumento en presión sea lento. Observar el corte del peciolo con la lupa. Observar de lado por si acaso sale disparada la ramita. Detectar el punto en el que sale la primera evidencia de agua por el xilema. Rápidamente observar la indicación de presión en el manómetro y anotarla. Cerrar la válvula de aguja de entrada de gas y mover la llave de paso para dejar salir el gas de la cámara.

Cuando la presión indique cero se puede sacar la muestra de la cámara. Repetir la medición con cada muestra de las dos especies. Repetir el procedimiento 1.5 horas después con otra serie de muestras de las mismas plantas.

2. Medir el índice masa-área foliar (leaf mass area, LMA). Tomar las hojas que se midieron con la cámara de presión y pegarlas en una hoja de papel para escanearlas junto a un trozo de papel milimétrico a 150dpi de resolución (usar solamente la lámina o limbo de la hoja, separarla del peciolo). Guardar la imagen en formato Bitmap o TIFF. Usar algún programa de cómputo que mida áreas (Scion image o ImageJ). Calibrar la imagen con la medida del papel milimétrico. Una vez escaneadas secar las hojas en una estufa a 65 – 75°C por 24 a 48 horas. Sacarlas de la estufa y dejarlas que se enfríen a temperatura ambiente en un desecador. Pesar (medir masa) cada hoja en una balanza analítica. Calcular el índice usando: $LMA = \text{masa}/\text{área}$.

RESULTADO

El estudiante presentará dentro de su bitácora, una tabla comparativa con los valores obtenidos de potencial hídrico e índice de masa foliar de los ejemplares en estudio.

LITERATURA RECOMENDADA

Chuncho G., Chuncho C., y Aguirre Z. 2019. Anatomía y morfología vegetal. Universidad Nacional de Loja. Ecuador. 134 pp.

Judd, W. Campbell, Kellog, Stevens & Donoghue. 2008. Plant systematics: a phylogenetic approach. 3rd edition. Sinauer Associates. Sunderland MA. *Chapter 4*.

PRACTICA #3: ESTIMACIÓN DE DENSIDAD ESTOMÁTICA POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE ESMALTE

INTRODUCCIÓN

La cantidad de estomas presentes en la superficie adaxial (haz) en comparación con la abaxial (envés) de una hoja es una característica adaptativa relacionada con diferentes condiciones ambientales. Las plantas con mayor número de estomas en el haz son llamadas epiestomáticas, las que tienen mayor número en el envés son hipoestomáticas, mientras que aquellas con un número aproximadamente igual de estomas en haz y envés son ambiestomáticas. La distribución de los estomas en ambas superficies de la hoja puede estar relacionada con el grado de inclinación que tengan las hojas.

COMPETENCIA

Analizar las estructuras internas y externas de la hoja, por medio de la observación morfológica externa, cortes histológicos y estimación de densidad de estomas en plantas para comprender el funcionamiento fisiológico de las plantas y su importancia en el mantenimiento de los ecosistemas terrestres.

OBJETIVOS DE LA PRACTICA

1. Realizar cortes de hojas monocotiledóneas y dicotiledóneas para contrastar sus esquemas con los de la literatura e identificar los diferentes componentes anatómicos y estructuras morfológicas de la hoja.
2. Aplicar una técnica de copia de cutícula de la hoja para estimar la densidad de estomas de la planta.

MATERIAL

1. Microscopio óptico
2. Portaobjetos limpio
3. Portaobjetos con escala micrométrica
4. Contador manual
5. Esmalte para uñas (transparente).
6. Cinta adhesiva completamente transparente.
7. Clinómetro
8. Tijera

METODOLOGÍA

- 1) Seleccionar 5 hojas de cada especie (de preferencia una hoja por planta, es decir de 5 plantas distintas de la misma especie).
- 2) Medir con el clinómetro el ángulo de inclinación de la hoja.
- 3) Elegir la numeración que va de 0 a 90 grados en el transportador para cada medición. Si la hoja está en un lugar poco accesible para colocar la cara plana del clinómetro, entonces auxiliarse con una regla o tabla para extender una superficie paralela (con la misma inclinación) hacia una zona donde se pueda usar el clinómetro.
- 4) En cada hoja se van a comparar sus dos superficies: el haz (adaxial) y el envés (abaxial). Aplicar una capa generosa de esmalte de uñas a un área de más o menos 1 cm² a cada lado de la hoja.
- 5) Dejar secar por algunos minutos (entre 5 y 10 min).
- 6) Una vez seco, con la cinta adhesiva pegar sobre el esmalte y desprender con mucho cuidado la impresión foliar sin tocar la parte de la cinta en contacto con la impresión foliar.
- 7) Pegar la cinta a un portaobjetos (en forma perpendicular).
- 8) Cortar el sobrante de la cinta adhesiva en uno de los extremos.
- 9) En el otro extremo, dejar un pequeño sobrante para etiquetar la muestra.

- 10) Pegar un pedazo de papel indicando el número y superficie de la hoja a que corresponde la muestra.
- 11) Colocar el portaobjetos con la escala micrométrica y medir el diámetro del campo de observación del objetivo 40x.
- 12) Calcular el área en mm².
- 13) Colocar un portaobjetos con impresión foliar. Seleccionar un campo con muchos estomas, pero libre de huellas dactilares, basura, daños o nervaduras.
- 14) Contar estomas (usar contador manual en caso necesario) y anotar; contar células epidérmicas y anotar.
- 15) Seleccionar otro campo de la misma impresión y repetir el conteo. Repetir el procedimiento (dos campos) para cada impresión foliar.
- 16) Calcular el índice y la densidad estomática según las siguientes ecuaciones:
Densidad estomática (estomas mm⁻²) = (# estomas por campo / Área del campo en mm²)
Índice estomático (%) = [(# estomas por campo / (# células epidérmicas por campo + # estomas por campo)) (100)]
- 17) Determinar si las hojas de las especies analizadas son epiestomáticas, hipostomáticas o ambiestomáticas.

RESULTADO

El estudiante presentará dentro de su bitácora, una tabla comparativa con los valores obtenidos de índice estomático por hoja en estudio y presentará dentro de la tabla la clasificación de las hojas por número de estomas presentados.

LITERATURA RECOMENDADA

Chuncho G., Chuncho C., y Aguirre Z. 2019. Anatomía y morfología vegetal. Universidad Nacional de Loja. Ecuador. 134 pp.

Judd, W. Campbell, Kellogg, Stevens & Donoghue. 2008. Plant systematics: a phylogenetic approach. 3rd edition. Sinauer Associates. Sunderland MA. *Chapter 4*.

PRACTICA #4: ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE CLOROFILA EN HOJAS.

INTRODUCCIÓN

Varios metabolitos secundarios de las plantas son esenciales para el desempeño de las plantas. Entre ellos, las clorofilas, antocianinas y carotenoides absorben luz y confieren a la planta la capacidad de maximizar la captación de diferentes de ondas de la luz. La propiedad de absorber luz proporciona una base para el análisis tanto cualitativo como cuantitativo. Los colorímetros y espectrofotómetros son instrumentos que miden la cantidad de luz absorbida por moléculas. La cantidad de pigmento presente puede ser calculada de la cantidad de luz absorbida. La absorbancia, es a menudo llamada densidad óptica. La absorbancia se incrementa tanto por las concentraciones de pigmento como por las distancias que el rayo de luz debe recorrer a través de la solución. Esta distancia es llamada longitud de la sonda de luz (light path length), y es igual al diámetro interno del tubo de ensaye del colorímetro. Diferentes pigmentos tienen diferentes absorbancias aun a concentraciones iguales y en el mismo tubo. Por ello, es necesario conocer la constante de absorción (= absortividad, o coeficiente de extinción, o coeficiente de absorción), de cada pigmento para relacionar la concentración del pigmento con la absorbancia medida. Esta depende de las propiedades moleculares del pigmento y del solvente en que se disuelve. Para corregir por el efecto del solvente y del tubo de ensaye siempre es necesario medir también un blanco.

COMPETENCIA

Analizar las estructuras internas y externas de la hoja, por medio observación de morfológica externa y cuantificar la cantidad de clorofila de hojas de plantas con diferentes metabolismos, esto para comprender el funcionamiento fisiológico de las plantas y fomentar su importancia en el mantenimiento de los ecosistemas terrestres.

OBJETIVOS DE LA PRACTICA

1. Conocer la técnica de extracción de clorofila.
2. Determinar el contenido de clorofila por medio de espectrofotometría de luz.

MATERIAL

- 1) Prepara 100 ml al 80% de acetona en agua
- 2) Etanol puro para limpiar celdas del espectrofotómetro
- 3) Espectrofotómetro
- 4) 1 gradilla
- 5) 16 tubos de ensayo de 13x100mm con tapón de hule
- 6) Papel aluminio para cubrir 8 tubos de ensayo
- 7) 2 morteros y mazos
- 8) 1 matraz Erlenmeyer de 125 o 250 ml para almacenar la acetona (con tapón de hule)
- 9) 1 homogenizador
- 10) 1 pipeta graduada de 1ml
- 11) 1 pipeta graduada de 10ml
- 12) 1 pipeteador
- 13) 1 sacabocados (para cortar de forma consistente porciones de hojas)
- 14) Navaja de un filo
- 15) papel milimétrico (se puede usar en lugar del sacabocados)

METODOLOGÍA

1.- Extracción de clorofilas:

Usar una solución de 80% (v/v) de acetona en agua, amortiguada con buffer 2.5 mM de fosfato de sodio al pH 7.8 (el ajuste del pH es para minimizar la conversión de las

clorofilas a feofitinas). Elegir dos especies a estudiar, de preferencia que sus hojas tengan diferente tonalidad de verde. Cortar 4 hojas de cada especie elegida. Cortar círculos con un sacabocado de 16 mm de diámetro, esto equivale aproximadamente a 200 mm² de área de la hoja. Si no se cuenta con el sacabocado cortar un trozo de hoja de 1 cm x 2 cm usando como guía un pedazo de papel milimétrico. En hojas color verde pálido usar 300 mm² de área. Pesar cada muestra en una balanza analítica. Poner el trozo en el mortero y agregar 2 ml del solvente (acetona). Moler. Recibir el homogeneizado en un tubo de ensayo. Sellar el tubo. Lavar el mortero y el mazo tres veces con la solución de acetona, usando 1.5 ml cada vez (total 4.5 ml). Recibir el lavado en el mismo tubo. Sellar.

Centrifugar a 2,500 r.p.m. por 10 min. Recuperar el sobrenadante en un tubo de ensayo. El material sedimentado vaciarlo al homogenizador y homogenizar con 1 ml de acetona para remover los pigmentos aun presentes. Volver a centrifugar y juntar los sobrenadantes. Ajustar a un volumen final de 8 ml en acetona (i.e. agregar 0.5 ml de acetona). Repetir el procedimiento para cada hoja y cada especie (usar 4 replicas por especie). Sellar el tubo. Rotular cada tubo con clave para sobrenadante, especie y numero de replica. La solución contiene clorofilas a y b y carotenoides como principales pigmentos.

2.- Determinación de clorofilas con el espectrofotómetro:

Prender el espectrofotómetro o colorímetro al menos 15 minutos antes para que se estabilice. Selecciona el modo absorbencia (A) con la tecla ATC. Para determinar la cantidad de clorofila solamente necesitas medir las absorbencias a **647 nm, 664 nm y 750 nm**. Primero selecciona con las teclas ▼ ▲ la longitud de onda **664 nm**. Pon 5 ml de una de las muestras en uno de los tubos del espectrofotómetro. En otro tubo pon 5 ml de acetona al 80% (blanco). Sellar ambos tubos. Limpiar con alcohol cualquier huella dejada en los tubos del espectrofotómetro y poner el tubo con el blanco en el espectrofotómetro cuidando que queden alineadas las marcas del tubo. Cerrar la

cámara. Presionar la tecla 0ABS/100%T. Aunque una pequeña cantidad de luz es absorbida por el solvente y el tubo eso se nulifica con el ajuste a cero. Quitar el tubo con el blanco. Meter ahora el tubo con la muestra, alinear bien. Cerrar la cámara.

Registra la absorbencia. Si es mayor de 0.8 diluir con acetona al 80% (con cantidades conocidas para poder conocer la concentración al final) hasta que la absorbencia sea debajo de ≤ 0.8 a 664nm. Esto asegurara que las absorbencias medidas estén en la parte de mayor exactitud del aparato. Ahora, cambiar a **647 nm y 750 nm**, y en cada una de esas longitudes de onda asegurarse que primero se ajuste a cero con el blanco de acetona para después registrar la absorbencia de la muestra.

Con los resultados anteriores ya puedes determinar la cantidad de clorofila total en esa muestra. Con la ayuda de las ecuaciones de Porra (1989) calcular la concentración de clorofila a, b y a+b del tejido. Concentracion ($\mu\text{g/ml}$) clorofila a = $(12.25 * (\mathbf{A664-A750})) - (2.55 * (\mathbf{A647-A750}))$ Concentracion ($\mu\text{g/ml}$) clorofila b = $(20.31 * (\mathbf{A647-A750})) - (4.91 * (\mathbf{A664-A750}))$ Concentracion clorofila a + b (clorofila total) = $(17.76 * (\mathbf{A647-A750})) + (7.34 * (\mathbf{A664-A750}))$

Puedes calcular el contenido de clorofila (en μg) de toda la muestra porque conoces la cantidad de ml de solución que usaste en toda la muestra (para una hoja), y como conoces el peso y área de la muestra (cuando cortaste pedazos de hoja) puedes reportar el contenido de clorofila en $\mu\text{g/g}$ o $\mu\text{g/cm}^2$. **Repetir el procedimiento anterior para cada hoja.** En el reporte agregar un cuadro con las absorbencias originales de cada hoja.

RESULTADO

El estudiante presentara en su bitácora, una tabla comparativa del contenido de clorofilas a y b de cada hoja y especie en estudio.

LITERATURA RECOMENDADA

Judd, W. Campbell, Kellog, Stevens & Donoghue. 2008. Plant systematics: a phylogenetic approach. 3rd edition. Sinauer Associates. Sunderland MA. *Chapter 4*.

PRACTICA #5: DETERMINACION DE ACIDOS TOTALES POR TITULACION (ACIDEZ TITULABLE) EN PLANTAS CAM.

INTRODUCCIÓN

Al igual que todos los organismos, las plantas han desarrollado mecanismos adaptativos que les permiten colonizar todos tipo de ambientes. En particular, en las plantas que presentan metabolismo ácido crasuláceo, como cactus y suculentas crecen en hábitats con baja precipitación pluvial donde el agua es una de los principales recursos limitantes. Este metabolismo permite a las plantas mantener cerrados los estomas foliares durante el día para evitar la pérdida de agua, mientras que los abren de noche para captar el CO₂ necesario para la fotosíntesis durante la noche. Cuando llega el periodo de luz limitada (la noche), las plantas sintetizan ácido crasuláceo, donde almacenan el CO₂, que es usado para la fotosíntesis durante el día. El ácido crasuláceo es almacenado en vacuolas celulares, lo que causa un incremento en la acidez de sus tejidos. En cambio, en el día, el ácido crasuláceo es degradado para utilizar el CO₂ y la acidez del tejido se reduce. Así, una medida indirecta del intercambio de gases en las plantas CAM es la concentración de acidez en sus tejidos. Esta adaptación se presenta en un número importante de especies y es un mecanismo adaptativo de las plantas para soportar altas condiciones de estrés bajo condiciones extremas de limitación de agua.

A partir de este antecedente, es importante que los alumnos evalúen de forma indirecta habilidad los cambios de acidez en los tejidos de almacenamiento de las plantas con este tipo de metabolismo.

COMPETENCIA

Analizar la capacidad de reserva de ácido crasuláceo en plantas CAM, a través de técnicas de titulación, esto con la finalidad de comprender el funcionamiento fisiológico de las plantas y fomentar su importancia en el mantenimiento de los ecosistemas terrestres.

OBJETIVO DE LA PRACTICA

1. Evaluar por medio del método de titulación la variación temporal en la concentración de acidez en tejidos vegetales de diferentes plantas de metabolismo CAM.

MATERIAL

- 1) NaOH 0.01N, fenolftaleína, balanza, potenciómetro (pH-metro).
- 2) 1 soporte universal
- 3) 1 Pinzas para bureta
- 4) 1 buretas de 25 ó 50 ml
- 5) 1 termoplato
- 6) 1 agitador magnético
- 7) 1 embudo
- 8) 2 mortero y mazo
- 9) 2 Espátula
- 10) 1 piseta con agua destilada
- 11) 1 Probeta de 50ml
- 12) 2 Matraz Erlenmeyer de 125 ml.
- 13) 2 Pipeta graduada de 5ml.
- 14) 2 pipeteadores
- 15) 1 pipeta Pasteur

- 16) 1 gradilla
- 17) 16 tubos de ensayo de 13x100mm
- 18) 8 tapones de hule para tubos de ensayo de 13x100mm
- 19) 1 sacabocados

METODOLOGÍA

- 1) Elegir dos especies suculentas a estudiar, o una especie suculenta creciendo en dos condiciones diferentes de humedad o a diferentes horas del día. Tomar **4 muestras** de cada especie o de cada condición elegida. Cortar con sacabocados (horador o perforador) un área de 2cm de diámetro. Utilizar la parte verde del tejido y descartar la parte clara (la interna). Pesar el tejido en una balanza analítica. Utilizar 2.5 g por muestra.
- 2) Colocar el trozo en el mortero y macerar 2.5 g de tejido de la planta suculenta que elijas. Agregar 10ml de agua destilada. Macerar hasta que un homogenado muy fino resulte (agregar agua en porciones y enjuagar el mortero con las porciones finales). Vaciar el homogenizado en un tubo de ensayo. Sellar el tubo.
- 3) Centrifugar a 1,500 r.p.m. por 10 min. Recuperar el sobrenadante en otro tubo de ensayo. Sellar el tubo. Repetir el procedimiento para cada tejido y cada especie (usar 4 réplicas por especie). Rotular cada tubo con clave para sobrenadante, especie o condición y número de réplica.
- 4) Medir el pH de cada muestra con el potenciómetro. Lavar el potenciómetro con agua destilada cada vez que se cambia de muestra. Se quita el exceso de agua con un papel apenas tocando la punta.
- 5) Titular con NaOH 0.01N. Agregar una gota de fenolftaleína a la muestra y vaciar la muestra en un matraz el cual se coloca bajo la bureta. Anotar la cantidad de ml de NaOH 0.01N presentes en la bureta. Agitar el matraz manualmente o colocarlo sobre un termoplato, agregar el agitador magnético y encender la agitación del termoplato. Agregar gota a gota NaOH 0.01N hasta que vire de color, es decir de incoloro a ligeramente rosa. Anotar la cantidad de ml de NaOH 0.01N presentes en la bureta y

calcular la cantidad de NaOH 0.01N utilizada en cada muestra. Calcular los mililitros de NaOH 0.01N gastados por gramo de peso fresco de tejido. Esta será la forma de reportar los resultados.

6) Medir el pH final de cada muestra con el potenciómetro.

Nota: El valor de la acidificación nocturna puede ser el valor del amanecer menos el valor del anochecer.

RESULTADO

El estudiante presentara en su bitácora, la siguiente tabla comparativa:

Planta (género y sp)	Masa valorada (g)	NaOH 0.01N utilizado (ml)	Valor de pH inicial	Valor de pH final

Presente un reporte científico con los valores de acidez determinados en este ejercicio.

LITERATURA RECOMENDADA

Judd, W. Campbell, Kellog, Stevens & Donoghue. 2008. Plant systematics: a phylogenetic approach. 3rd edition. Sinauer Associates. Sunderland MA. *Chapter 4*.

PRACTICA #6: INFLUENCIA DEL PH SOBRE LOS PIGMENTOS ANTOCIANINAS Y BETALAINAS.

SECCION I

INTRODUCCIÓN

Los pigmentos rojizos se encuentran en flores, hojas y tallos de muchas plantas. Son menos frecuentes en raíces. Casi todas estas moléculas tienen propiedades químicas de dos grupos de pigmentos, las antocianinas y las betalaínas. Las antocianinas son mucho más abundantes entre las plantas superiores que las betalaínas. Las antocianinas generalmente son rojas pero el grupo también contiene pigmentos que son violetas o azules. La mayoría de los frutos y flores deben sus colores a las antocianinas, pero hay carotenoides anaranjados o amarillos (que no se relacionan ni a las antocianinas ni a las betalaínas) que algunas veces predominan en tales órganos, por ejemplo el pigmento del tomate. Las antocianinas también contribuyen a los colores espectaculares de muchas hojas del otoño. Estos pigmentos son glucósidos (derivados del azúcar) de varias antocianidinas. Las betalaínas consisten tanto de pigmentos rojos como de amarillos, las betacianinas y las betaxantinas, respectivamente.

Las betalaínas han sido encontradas sólo en 10 familias: *Amaranthaceae*, *Basellaceae*, *Cactaceae*, *Chenopodiaceae*, *Didieraceae*, *Ficoideaceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolaccaceae*, *Portulacaceae*, y *Stegnospermaceae*. Las antocianinas no sólo no se han encontrado en ninguna especie de estas familias, sino que parece que sólo uno de estos dos grupos de pigmentos se sintetiza en cualquier planta. Este hecho interesante (junto con otros criterios morfológicos) ha sido utilizado por los quimiotaxónomos para modificar la clasificación del orden Centrospermae e incluir solamente las 10 familias que contienen betalaínas. En contraste con las antocianinas, las betalaínas contienen nitrógeno. Tanto las antocianinas como las betalaínas son muy solubles en agua y se acumulan en las vacuolas. Las antocianinas generalmente están positivamente cargadas y se mueven hacia el cátodo durante la electroforesis, mientras que las betalaínas comúnmente tienen una carga negativa debida a la ionización del grupo carboxilo y se

mueven hacia el ánodo. La electroforesis es entonces una técnica que las distingue fácilmente. Otro criterio para distinguir las es su respuesta de color diferencial hacia el cambio de pH, especialmente con el tratamiento de una base como el KOH. Esta respuesta será estudiada en el presente experimento usando betalaína, la abundante betalaína de las raíces del betabel o remolacha roja y una antocianina que contiene cianidina de la col roja o repollo colorado (o morado). También se puede usar “flor de jamaica” en lugar de col roja.

COMPETENCIA

Determinar la cantidad de betalaína y antocianina en diferentes tipos de raíces, esto con la finalidad de comprender el funcionamiento fisiológico de las plantas y fomentar su importancia en el mantenimiento de los ecosistemas terrestres.

OBJETIVO DE LA PRACTICA

1. Evaluar por medio de cambios de pH la cantidad de betalaína en diferentes tejidos vegetales.

MATERIAL

- 1) HCl 0.1N y 1N, KOH 0.01N y 0.1N, Balanza.
- 2) 2 mortero y mazo 2 Matraz Erlenmeyer de 125 ml.
- 3) 2 embudo Buchner 2 Pipetas graduadas de 1 ml
- 4) 2 manguera para vacío 1 Pipeta graduada de 5ml.
- 5) 2 matraz Kitazato de 250 ml
- 6) 1 pipeta
- 7) 4 papel filtro 20 tubos de ensaye de 13x100mm
- 8) 2 espátula 1 gradilla
- 9) 1 piseta con agua destilada 1 agitador de vidrio
- 10) 1 probeta de 100ml

METODOLOGÍA

- 1) En forma separada moler en un mortero 2 g de col roja (repollo morado) y de betabel en 40 ml de agua hasta que resulte un homogeneizado muy fino (agregar agua en porciones y enjuagar el mortero con las porciones finales).
- 2) Filtrar cada homogeneizado a través del papel filtro acomodado en el embudo y el matraz Kitazato. Usar vacío conectado al matraz Kitazato para acelerar el proceso.
- 3) Descarte el material sólido del papel y ponga el filtrado de cada especie en un contenedor separado.
- 4) Agregar 5 ml del jugo de la col roja en cada uno de 5 tubos de ensayo numerados del 1 al 5.
- 5) Repetir para el betabel pero etiquetar los tubos del 6 al 10.
- 6) Conservar los tubos #1 y #6 como controles sin tratamiento.
- 7) Agregar 1 ml de HCl 0.1N a los tubos #2 y #7. Mezclar bien con el agitador de vidrio y anotar cualquier cambio de color si éste ocurre.
- 8) Agregar 0.5 ml de KOH 0.01N a los tubos #3 y #8 y mezclar bien. El extracto de col roja debe ponerse violeta o si está muy básico azul. Registrar el color de ambas soluciones.
- 9) Agregar 1 ml de KOH 0.1N a los tubos #4 y #9 y registrar los colores. Finalmente agregar una bolita de cristales de KOH o NaOH a los tubos #5 y #10. La antocianina debe hacerse amarilla. Registrar estos colores, después determinar si los cambios de color son reversibles agregando gotas de KOH 0.1N a los tubos #2 y #7, gotas de HCl 0.1N a los tubos #3, #8, #4, #9, y finalmente HCl 1N para los tubos #5 y #10.
- 10) Agitar con el agitador de vidrio cada vez que se agreguen gotas. Toma una muestra de cualquier tejido vegetal (de **dos o tres especies** diferentes) de los alrededores de la escuela para que la compares con estas dos muestras y realiza el mismo proceso.

11) Dos de esas especies (con antocianinas) se usarán en la sesión de la siguiente semana para la determinación de antocianinas.

Nota: El reporte completo se entrega después de la segunda sesión cuando se determinen antocianinas y se generen datos que se puedan analizar estadísticamente.

RESULTADO

El estudiante presentara en su bitácora, una tabla comparativa del comportamiento del color, contenido de betalaína y pH de las muestras utilizadas en esta práctica.

LITERATURA RECOMENDADA

Judd, W. Campbell, Kellog, Stevens & Donoghue. 2008. Plant systematics: a phylogenetic approach. 3rd edition. Sinauer Associates. Sunderland MA. *Chapter 4*.

PRACTICA #6: INFLUENCIA DEL PH SOBRE LOS PIGMENTOS ANTOCIANINAS Y BETALAINAS.

SECCION II

INTRODUCCIÓN

Los pigmentos rojizos se encuentran en flores, hojas y tallos de muchas plantas. Son menos frecuentes en raíces. Casi todas estas moléculas tienen propiedades químicas de dos grupos de pigmentos, las antocianinas y las betalaínas. Las antocianinas son mucho más abundantes entre las plantas superiores que las betalaínas. Las antocianinas generalmente son rojas pero el grupo también contiene pigmentos que son violetas o azules. La mayoría de los frutos y flores deben sus colores a las antocianinas, pero hay carotenoides anaranjados o amarillos (que no se relacionan ni a las antocianinas ni a las betalaínas) que algunas veces predominan en tales órganos, por ejemplo el pigmento del tomate. Las antocianinas también contribuyen a los colores espectaculares de muchas hojas del otoño. Estos pigmentos son glucósidos (derivados del azúcar) de varias antocianidinas. Las betalaínas consisten tanto de pigmentos rojos como de amarillos, las betacianinas y las betaxantinas, respectivamente.

Las betalaínas han sido encontradas sólo en 10 familias: *Amaranthaceae*, *Basellaceae*, *Cactaceae*, *Chenopodiaceae*, *Didieraceae*, *Ficoideaceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolaccaceae*, *Portulacaceae*, y *Stegnospermaceae*. Las antocianinas no sólo no se han encontrado en ninguna especie de estas familias, sino que parece que sólo uno de estos dos grupos de pigmentos se sintetiza en cualquier planta. Este hecho interesante (junto con otros criterios morfológicos) ha sido utilizado por los quimiotaxónomos para modificar la clasificación del orden Centrospermae e incluir solamente las 10 familias que contienen betalaínas. En contraste con las antocianinas, las betalaínas contienen nitrógeno. Tanto las antocianinas como las betalaínas son muy solubles en agua y se acumulan en las vacuolas. Las antocianinas generalmente están positivamente cargadas y se mueven hacia el cátodo durante la electroforesis, mientras que las betalaínas comúnmente tienen una carga negativa debida a la ionización del grupo carboxilo y se

mueven hacia el ánodo. La electroforesis es entonces una técnica que las distingue fácilmente. Otro criterio para distinguir las es su respuesta de color diferencial hacia el cambio de pH, especialmente con el tratamiento de una base como el KOH. Esta respuesta será estudiada en el presente experimento usando betalaína, la abundante betalaína de las raíces del betabel o remolacha roja y una antocianina que contienen cianidina de la col roja o repollo colorado (o morado). También se puede usar “flor de jamaica” en lugar de col roja.

COMPETENCIA

Determinar la cantidad de betalaína y antocianina en diferentes tipos de raíces, esto con la finalidad de comprender el funcionamiento fisiológico de las plantas y fomentar su importancia en el mantenimiento de los ecosistemas terrestres.

OBJETIVO DE LA PRACTICA

1. Evaluar por medio de cambios de pH la cantidad de antocianina en diferentes tejidos vegetales.

MATERIAL

- 1) 1 perforador o sacabocados
- 2) 11 tubos de ensayo (13x100mm) con tapón,
- 3) Gradilla
- 4) Pipeta graduada de 10 ml
- 5) Espectrofotómetro
- 6) Solución de metanol acidificado [6M HCl : H₂O : MeOH (7 : 23 : 70)]

METODOLOGÍA

1. Extracción de antocianinas:

- 1) Elegir dos especies a estudiar, o una especie de plantas con dos tipos de hojas diferentes, por ejemplo maduras y jóvenes. De preferencia que los dos tipos de hojas (de la misma especie o de dos especies distintas), sean de diferente color y que al menos una sea más o menos roja.
- 2) Cortar 5 hojas de cada especie o de cada condición elegida. Cortar con sacabocados o perforador un área de alrededor de 1 cm² (calcular bien el área usando la formula correspondiente).
- 3) Poner cada muestra en un tubo de ensayo y agregar 4 ml de metanol acidificado [6M HCl : H₂O : MeOH (7 : 23 : 70)].
- 4) Tapar los tubos con un tapón o con papel parafilm.
- 5) Dejar todos los tubos (10 en total) en el refrigerador (4°C) por 24 horas para que se extraigan las antocianinas del tejido. También dejar un tubo con 4ml de solución (sin tejido) en el refrigerador. Taparlo con tapón o parafilm. Este será el blanco para las mediciones con el espectrofotómetro.

2. Determinación de antocianinas con el espectrofotómetro:

- 1) Al día siguiente prender el espectrofotómetro al menos 15 minutos antes de las mediciones para que se estabilice.
- 2) Selecciona el modo absorbancia con la tecla ATC. Selecciona con las teclas ▼ ▲ la longitud de onda **530 nm**.
- 3) Coloca 3 ml de la solución de pigmentos en uno de los tubos del espectrofotómetro. Cuida que no tenga material en suspensión. Si lo tiene, se tiene que filtrar o centrifugar para separar.
- 4) En otro tubo pon 3 ml de la solución (blanco).
- 5) Limpiar con alcohol cualquier huella dejada en los tubos del espectrofotómetro y poner el tubo con el blanco en el espectrofotómetro cuidando que queden alineadas las marcas del tubo.

- 6) Cerrar la cámara. Presionar la tecla 0 ABS/100% T. Aunque una pequeña cantidad de luz es absorbida por el solvente y el tubo eso se nulifica con el ajuste a cero. Quitar el tubo con el blanco.
- 7) Colocar ahora el tubo con la muestra, alinear bien. Cerrar la cámara. Registra la absorbancia.
- 8) Si es mayor de 1.0 diluir con metanol acidificado (con cantidades conocidas para poder conocer la concentración al final) hasta que la absorbancia sea debajo de ≤ 1.0 a 530nm. Esto asegurara que las absorbancias medidas estén en la parte de mayor exactitud del aparato.
- 9) Cambiar a **653 nm**. Primero ajusta a cero con el blanco y después registra la absorbancia de la muestra. Con estos datos (absorbancias a **530 nm y 653 nm**) ya puedes determinar la cantidad de antocianinas en esa muestra (hoja).
- 10) Calcula la concentración de antocianinas (en equivalentes de 3-glucosido de cianidina) con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de antocianina } (\mu\text{g/ml}) = 14.97 * (A_{530} - (0.24 * A_{653}))$$

- 11) Puedes calcular el contenido de antocianinas (en μg) de toda la muestra porque conoces la cantidad de ml de solución que usaste en toda la muestra (para una hoja); y como conoces el área de la muestra (cuando cortaste la hoja) puedes reportar el contenido de antocianinas en $\mu\text{g/cm}^2$.
- 12) Repetir el procedimiento anterior para cada hoja.

Nota: En el reporte agrega un cuadro con las absorbancias de cada hoja.

RESULTADO

El estudiante presentara en su bitácora, una tabla comparativa del comportamiento del color y contenido de antocianinas de las muestras utilizadas en esta práctica.

LITERATURA RECOMENDADA

Judd, W. Campbell, Kellog, Stevens & Donoghue. 2008. Plant systematics: a phylogenetic approach. 3rd edition. Sinauer Associates. Sunderland MA. *Chapter 4*.

PRACTICA #7: PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE COLEÓPTILOS CON AUXINAS

INTRODUCCIÓN

El crecimiento temprano de las plantas es una etapa que determina el crecimiento tardío de las plantas, además, es una etapa de las plantas donde están expuestas a diversos factores bióticos y abióticos que pueden incrementar el riesgo de mortalidad. El crecimiento de las plantas es un carácter complejo que es influenciado por una gran cantidad de factores. Entre otros, las auxinas son hormonas vegetales sintetizadas por las plantas y que influyen sobre la capacidad de las plantas para crecer. Además, la concentración de la auxina en los tejidos vegetales puede determinar la tasa de crecimiento en las plantas, incrementando su capacidad competitiva (contra planta de la misma o de diferentes especies en etapas tempranas. Por ejemplo, una planta con alta capacidad de sintetizar auxinas crecerá mejor en comparación a individuos que sintetizan o movilizan menos auxinas. El efecto de las auxinas sobre el crecimiento se puede evaluar agregando auxinas a plantas en etapa de desarrollo similar y estimando su tasa de crecimiento en condiciones de laboratorio. Dada la importancia de las auxinas para que las plantas silvestres y cultivadas crezcan de forma óptima y sobrevivir a condiciones estresantes durante el desarrollo temprano, es importante que se evalúe de forma experimental como la variación en la concentración de auxinas incrementa el crecimiento en las plantas.

COMPETENCIA

Aplicar una técnica germinación, por medio la aplicación de una hormona promotora de la germinación, para analizar el efecto de las hormonas vegetales y comprender la importancia de las hormonas como reguladores del crecimiento en plantas fomentar el cuidado de los recursos vegetales con responsabilidad.

OBJETIVO DE LA PRACTICA

1. Evaluar los efectos de las auxinas en la tasa de crecimiento temprano en plántulas.

MATERIAL

- 1) Semillas de maíz (más de 50),
- 2) 8 cajas de petri de vidrio o plástico (solicitarlo al profesor),
- 3) 1 navaja,
- 4) 4 vasos de precipitados de 30 ó 50 ml,
- 5) 1 pipeta de 10 ml (o en su lugar jeringas de 10 ml),
- 6) 1 embudo,
- 7) 1 piseta con agua destilada,
- 8) 1 vernier,
- 9) 1 regla,
- 10) 1 pinza de disección,
- 11) Potenciómetro (pH-metro) y soluciones amortiguadoras,
- 12) Solución de IAA 2.5 mg/L + 2 % de sacarosa,
- 13) Solución de cloro al 10%

METODOLOGÍA

1. Germinación de maíz:

- 1) Una semana antes de la fecha de laboratorio colocar alrededor de 100 semillas de maíz en un frasco de vidrio aséptico.
- 2) Lavar con cloro al 10%. Lavar las semillas también.
- 3) Poner un pedazo de malla (mosquitero) atada con una liga en la boca del frasco.
- 4) Agregar agua destilada dejar en remojo por unos minutos (de 5 a 10) y vaciar el contenido dejando el frasco inclinado hacia abajo.
- 5) Repetir el procedimiento una o dos veces por día, cada día hasta que las plántulas tengan un tamaño de aproximadamente 2 cm.

2. Experimento de promoción de crecimiento de coleóptilos:

- 1) Cortar 5 mm de la punta del coleóptilo.
- 2) Cortar 10 mm de coleóptilo a partir del extremo cortado.
- 3) Retirar el cotiledón.
- 4) Colocar cinco coleóptilos en cada caja de petri.
- 5) Agregar 20 ml de disolución de auxina a 4 cajas de Petri
- 6) Agregar 20 ml de agua destilada a las otras 4 cajas de petri.
- 7) Dejar los tejidos en la disolución por 5 minutos; mover las cajas suavemente;
- 8) Vaciar cada disolución, a través del embudo, a cada uno de los vasos de precipitados.
- 9) Medir el pH.
- 10) Regresar cada una de las disoluciones a su correspondiente caja de petri.
- 11) Dejar los tejidos en las cajas de petri con disolución por 24 horas.
- 12) Mover las cajas suavemente de vez en cuando.
- 13) Al día siguiente vaciar cada disolución, a través del embudo, a cada uno de los vasos de precipitados.
- 14) Medir el pH.

15) Medir la longitud de cada uno de los coleóptilos con una regla o un vernier.

RESULTADO

El estudiante presentara en su bitácora, una tabla comparativa del comportamiento del del crecimiento de las diferentes plantas en crecimiento con y sin el efecto de hormonas.

LITERATURA RECOMENDADA

Judd, W. Campbell, Kellog, Stevens & Donoghue. 2008. Plant systematics: a phylogenetic approach. 3rd edition. Sinauer Associates. Sunderland MA. *Chapter 4*.

ANEXO I

LITERATURA RECOMENDADA PARA LA INTRODUCCION, ANTECEDENTES Y DISCUSION DE TUS RESULTADOS.

- Aracri, B., Pashkoulov, D., & Mele, A. (2002). Genetic engineering of flower colour and its application on flower cultivation. *Italus Hortus*, 9.
- Baranska, M., Baranski, R., Schulz, H., & Nothnagel, T. (2006). Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta*, 224(5), 1028-1037.
- Barceló, G. Nicolás, B. Sabater y R. Sánchez Tamés. 2005. Fisiología vegetal. 11ª Ed. Pirámide, Madrid.
- Burleigh, M., Roberts, E., & Wagner, D. R. (2008). Acidic Solutions adjusting water's pH improves plant growth. *Cactus and Succulent Journal*, 80: 245-250.
- Da costa, M. and Huang, B. 2009. Physiological adaptations of perennial grasses to drought stress. In: De la Barrera, E. and W. K. Smith, (Eds). Perspectives in Biophysical Plant Ecolphysiology: a tribute to Park S. Nobel. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México.
- De la Barrera, E. and J. L. Andrade. Diversidad fisiológica de las plantas mexicanas: el caso de un metabolismo fotosintético especial. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 81: 157-159.
- De la Barrera, E. and P. S. Nobel. Physiological ecology of seed germination for the columnar cactus *Stenocereus queretaroensis*. *Journal of Arid Environments*, 53: 297- 306.
- De la Barrera, E. and W. K. Smith. 2009. Perspectives in Biophysical plant Ecophysiology: a tribute to Park S. Nobel. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México.
- Drennan, P. M. 2009. Temperature influences on plant species of arid and semi-arid regions with emphasis on CAM succulents. In: De la Barrera, E. and W. K. Smith, (Eds). Perspectives in Biophysical Plant Ecolphysiology: a tribute to Park S. Nobel. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2012). Purification and Antiradical properties of the structural unit of betalains. *Journal of Natural Products*, 75(6), 1030-1036.
- Gouws, L. M., Osmond, C. B., Schurr, U., & Walter, A. (2005). Distinctive field growth cycles in leaves and cladodes of CAM plants: differences from C3 plants and

- putative interactions with substrate availability, turgor and cytoplasmic pH. *Functional plant biology*, 32: 421-428.
- Grieneisen, V. A., Xu, J., Marée, A. F., Hogeweg, P., & Scheres, B. (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature*, 449(7165), 1008-1013.
- Guerra, M., & Ortega, G. (2006). Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químico-físicos. Parte I. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 2: 35-44.
- Guillen, S., T. Terrazas, E. De la Barrera, and A. Casas. (2011). Germination differentiation patterns of wild and domesticated columnar cacti in a gradient of artificial selection intensity. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58:409- 423.
- H. Öpik and S. Rolfe (2005) *The Physiology of flowering plants*. Cambridge University Press. London, UK.
- Haissig, B. E., and R. E. Dickson. (2006). Starch measurement in plant tissue using enzymatic hydrolysis. *Physiologia plantarum*, 47: 151-157.
- Hernández-González, O., & Villarreal, O. B. (2007). Crassulacean acid metabolism photosynthesis in columnar cactus seedlings during ontogeny: the effect of light on nocturnal acidity accumulation and chlorophyll fluorescence. *American Journal of Botany*, 94(8), 1344-1351.
- Hopkins, W. G. and N.P.A. Hüner (2004) *Introduction to plant physiology*. John Wiley, New York.
- J. Azcón-Bieto y M. Talón. (2000) *Fundamentos de fisiología vegetal*. Interamericana-McGraw-Hill.
- Jerz, G., Skotzki, T., Fiege, K., Winterhalter, P., & Wybraniec, S. (2008). Separation of betalains from berries of *Phytolacca americana* by ion-pair high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1190: 63-73.
- Martínez, F. G. (1994) *Elementos de fisiología vegetal*. Mundi-Prensa, Madrid
- Mazza, G., Cacace, J. E., & Kay, C. D. (2004). Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *Journal of AOAC international*, 87: 129-145.
- Mohr, H. and Schopfer, (1995) *Plant Physiology*. Springer, Berlín. 1995
- Moreno-Pérez, E. D. C., Martínez-Damián, M. T., Reyes-López, D., Pérez-Mercado, C. A., Peña-Lomelí, A., & Espinosa-Robles, P. (2006). Intensidad de color y contenido de antocianinas en chile guajillo *Capsicum annum* L. *Revista chapingo. Serie horticultura*, 12: 135-140.
- Nobel P. S. (1999) *Physicochemical and environmental plant biology*. Academic. Press. Nueva York.

- Nobel, P. S. and De la Barrera, E. 2003. Stem water relations and net CO₂ uptake for a hemiepiphytic cactus during short-term drought. *Environmental and experimental botany*, 48: 129-137
- Raven, P. H. and R.F. Evert y S.E. Eichhorn. (1991) Biología de plantas. Volúmenes I y II. Ed. Reverté, Barcelona.
- Rojas-Aréchiga, M., Casas, A., & Vázquez-Yanes, C. (2001). Seed germination of wild and cultivated *Stenocereus stellate* (Cactaceae) from the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central México. *Journal of Arid Environments*, 49(2), 279-287.
- Rost, T. L., M. G. Barbour, C. R. Stocking and T. M. Murphy (1998) Plant Biology. Wadsworth Pu. Co., Belmont-California.
- Sabater, B. (2005) Problemas resueltos de fisiología vegetal. Servicio de Publicaciones-Universidad de Alcalá. 2ª Ed. 2005.
- Salisbury F. B. and C.W. Ross (2000) Fisiología vegetal. Paraninfo Madrid,
- Schulte, P. J. 2009. Water transport in processes in desert succulents. In: De la Barrera, E. and W. K. Smith, (Eds). Perspectives in Biophysical plant Ecophysiology: a tribute to Park S. Nobel. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México.
- Shan, X., Zhang, Y., Peng, W., Wang, Z., & Xie, D. (2009). Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 60: 3849-3860.
- Skene, K. R., & James, W. M. (2000). A comparison of the effects of auxin on cluster root initiation and development in *Grevillea robusta* Cunn. ex R. Br.(Proteaceae) and in the genus *Lupinus* (Leguminosae). *Plant and Soil*, 219(1), 221-229.
- Smith, J. A. C., Griffiths, H., Lüttge, U., Crook, C. E., Griffiths, N. M., & Stimmel L, K. H. (2006). Comparative ecophysiology of CAM and C3 bromeliads. IV. Plant water relations. *Plant, Cell & Environment*, 9(5), 395-410.
- Strasburger, E. (2004) Tratado de botánica. Omega, Barcelona. 35ª Ed. 2004.
- Swarup, R., Kramer, E. M., Perry, P., Knox, K., Leyser, H. O., Haseloff, J., ... & Bennett, M. J. (2005). Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nature Cell Biology*, 7(11), 1057-1065.
- Taiz, L. and E. Zeiger (2008) Plant Physiology Sinauer Ass. Inc., Sunderland, MA.
- Wybraniec, S., Nowak-Wydra, B., Mitka, K., Kowalski, P., & Mizrahi, Y. (2007). Minor betalains in fruits of *Hylocereus* species. *Phytochemistry*, 68: 251-259.

