

PRÁCTICAS DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LOS VEGETALES

Esther Simón Martínez
Lluïsa Moyssset Agustí

Departament de Biologia Vegetal



UNIVERSITAT DE BARCELONA



TEXTOS DOCENTS

248

PRÁCTICAS DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LOS VEGETALES

Esther Simón Martínez
Lluïsa Moysset Agustí

Departament de Biologia Vegetal

Publicacions i Edicions



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Simón Martínez, Esther

Prácticas de crecimiento y desarrollo de los vegetales. – (Textos docents ; 248)

A la portada: Departament de Biologia Vegetal

ISBN 84-475-3078-7

Bibliografia

I. Moysset Agustí, M. Lluïsa II. Universitat de Barcelona. Departament de Biologia Vegetal III. Títol

IV. Col·lecció: Textos docents (Universitat de Barcelona) ; 248

1. Fisiologia vegetal 2. Creixement (Plantes) 3. Manuals de laboratori

© PUBLICACIONS I EDICIONS DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA, 2006

Adolf Florensa, s/n; 08028 Barcelona; Tel. 934 035 442; Fax 934 035 446;

comercial.edicions@ub.edu; www.publicacions.ub.es

Dipòsit legal:

ISBN: 84-475-3078-7

Impressió: Gráficas Rey, S.L.

Imprès a Espanya / Printed in Spain

INTRODUCCION

En el contexto de las Ciencias Experimentales, la enseñanza de cualquier materia debe incluir la realización por parte del alumnado de determinados trabajos prácticos, las consabidas “clases prácticas”. Solo el contacto directo del alumno con la realidad experimental le posibilitará una comprensión adecuada de la materia. De ahí que, en los planes de estudio vigentes en la Universidad española, la docencia de las materias experimentales reserve siempre un determinado número de horas al trabajo “práctico” para completar la formación obtenida a través de las lecciones teóricas y otros sistemas de aprendizaje.

La finalidad de estos trabajos prácticos, realizados generalmente en el laboratorio, es lograr que el alumno aprenda, en contacto directo con la realidad, la problemática científica inherente a la materia objeto de estudio. Para ello, en el laboratorio, se desarrollarán básicamente tres aspectos: a) una observación detallada del “problema” a estudiar, utilizando el instrumental y las técnicas de cuantificación adecuadas; b) un conocimiento y manejo de instrumentos y técnicas experimentales que permita una valoración adecuada de las mismas y, c) un análisis crítico de los resultados obtenidos. En definitiva, el trabajo de laboratorio debe suponer el ejercicio concreto por parte del alumnado del método de investigación científica. Ello debe realizarse bajo la guía y supervisión del profesor. El reducido número de alumnos y su comunicación constante con el profesor facilitará mucho esta labor.

No obstante, los trabajos a desarrollar en el laboratorio deben ser cuidadosamente seleccionados, atendiendo al nivel del alumnado, características del instrumental disponibles, materia científica considerada, etc. Por ello, se ha planteado el presente texto guía, cuyo objeto básico es seleccionar una temática adecuada para los trabajos de laboratorio en **Crecimiento y Desarrollo de los vegetales**.

Crecimiento y Desarrollo de los vegetales es una asignatura optativa de segundo ciclo en la enseñanza de Biología de la Universidad de Barcelona. Cuando cursa esta asignatura, el alumno posee ya unos conocimientos básicos y una cierta experiencia de laboratorio obtenida en la asignatura de Fisiología Vegetal de primer ciclo y estrechamente relacionada con esta optativa. Sin embargo, el elevado número de alumnos en primer ciclo y la limitación horaria de la enseñanza práctica dificulta que el alumno adquiera la soltura y experiencia de laboratorio que es de desear. Para paliar estas deficiencias se plantea, en el presente texto guía, una enseñanza práctica de la asignatura de **Crecimiento y Desarrollo de los vegetales** que permita aumentar el nivel de conocimientos del alumno, adecuándolo a un segundo ciclo, y proporcionarle la madurez y soltura en el laboratorio necesarias para la posterior inserción del licenciado en el mundo laboral.

Este texto guía está concebido para que el alumno encuentre en él, además del soporte teórico y bibliográfico imprescindible para la comprensión de cada tema práctico, una detallada descripción de las etapas sucesivas en que se concreta la realización de la práctica. Así, en principio, el texto debería ser suficiente para que el alumno realizara personalmente cada práctica sin implicación directa del profesor que le atiende.

El texto está organizado por capítulos correspondientes cada uno de ellos a una práctica aunque su duración en el tiempo es variable. Algunas prácticas se completan en una sesión regular de tres horas de duración, otras suponen dos o más sesiones de trabajo o un seguimiento a lo largo del tiempo. Se incluye un número de prácticas superior al que puede realizarse normalmente durante un semestre, a fin de posibilitar que el profesor seleccione las que crea más adecuadas según las disponibilidades temporales.

El trabajo en el laboratorio se organiza por equipos de trabajo (generalmente formados por dos alumnos) que realizan sus tratamientos y análisis de modo independiente. El número de equipos que trabajarán conjuntamente en el laboratorio variará según la capacidad del laboratorio, sus instalaciones y el número de profesores que lo atienden. Sin embargo, no es aconsejable superar los 12 alumnos por grupo de prácticas.

En la mayoría de capítulos se incluyen modelos de tablas para anotar los resultados obtenidos por cada equipo de trabajo y también tablas generales para recopilar todos los resultados obtenidos por el conjunto del grupo de prácticas. Caben, evidentemente, otras alternativas para presentar los resultados. Las que se incluyen son solo una guía orientativa para unificar la presentación de resultados y permitir un análisis conjunto de los mismos en las sesiones de discusión de prácticas.

Finalmente, la culminación del trabajo práctico se concretará en la elaboración personal por parte del alumno de una memoria en la que presentará y discutirá los resultados obtenidos en las distintas prácticas, su significación y conclusiones.

La elaboración de este texto guía se ha realizado por el profesorado de la Unidad de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona que imparte la asignatura de **Crecimiento y Desarrollo de los Vegetales**, gracias a la ayuda concedida por el Gabinet d'Avaluació i Innovació Universitaria (GAIU) de la Universitat de Barcelona, dentro del Programa de Innovación de la Docencia universitaria.

Esther Simón i Martínez

(Coordinadora de la edición del texto guía de Pràcticas de Crecimiento y Desarrollo de los Vegetales, Departament de Biologia Vegetal, de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona)

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

Regulación de la germinación de semillas: control hormonal y fotocontrol

1.1. Introducción	1
1.2. Objetivos	4
1.3. Material y métodos	5
1.3.1. <i>Material vegetal</i>	5
1.3.2. <i>Material y equipamientos</i>	5
1.3.3. <i>Metodología</i>	6
1.4. Resultados	8
1.4.1 <i>Tablas de resultados - Equipo de trabajo</i>	9
1.4.2 <i>Tablas de resultados generales – Grupo de prácticas</i>	10
Bibliografía	13
Anexos	14

CAPÍTULO 2

Fotocontrol del crecimiento de plántulas etioladas de guisante

2.1. Introducción	17
2.2. Objetivos	20
2.3. Material y métodos	21
2.3.1. <i>Material vegetal</i>	21
2.3.2. <i>Material y equipamiento</i>	22
2.3.3. <i>Metodología</i>	22
2.4 Resultados	24
2.4.1. <i>Tablas de resultados - Equipos de trabajo</i>	25
2.4.2. <i>Tablas de resultados generales – Grupo de prácticas</i>	27
Bibliografía	31

CAPÍTULO 3

Efecto del fitocromo sobre los movimientos foliares nictinásticos

3.1. Introducción	33
3.2. Objetivos	34
3.3. Material y métodos	35
3.3.1. <i>Material vegetal</i>	35
3.3.2. <i>Material y equipamiento</i>	35
3.3.3. <i>Metodología</i>	35
3.4. Resultados	37
3.4.1. <i>Tablas de resultados - Equipo de trabajo</i>	38
3.4.2. <i>Tablas de resultados generales – Grupo de prácticas</i>	41
Bibliografía	43

CAPÍTULO 4**Inducción fotoperiodica de la floración y movimiento del estímulo floral en *Pharbitis nil***

4.1. Introducción	45
4.2. Objetivos	47
4.3. Material y métodos	48
4.3.1. Material vegetal	48
4.3.2. Material y equipamientos	48
4.3.3. Metodología	48
4.4. Resultados	50
4.4.1. Tablas de resultados - Equipo de trabajo	51
4.4.2. Tablas de resultados generales – Grupo de prácticas	55
Bibliografía	59
Anexos	60

CAPÍTULO 5**Micropropagación de violetas africanas**

5.1. Introducción	63
5.2. Objetivos	65
5.3. Material y métodos	66
5.3.1. Material vegetal	66
5.3.2. Material y equipamientos	66
5.3.3. Metodología	67
5.4. Resultados	69
Bibliografía	69
Anexos	70

CAPÍTULO 6**Propagación clonal de Orquídeas**

6.1. Introducción	73
6.2. Objetivos	75
6.3. Material y métodos	75
6.3.1. Material vegetal	75
6.3.2. Material y equipamiento	75
6.3.3. Metodología	77
6.4. Resultados	79
Bibliografía	79
Anexos	81

CAPÍTULO 7**Senescencia foliar: efecto de reguladores del crecimiento y de la luz**

7.1. Introducción	83
7.2. Objetivos	86
7.3. Material y métodos	86
7.3.1. Material vegetal	86
7.3.2. Material y equipamiento	86
7.3.3. Metodología	87
7.4. Resultados	89
7.4.1 Tablas de resultados – Equipo de trabajo	90
7.4.2 Tablas de resultados generales – Grupo de prácticas	91
Bibliografía	93
Anexo	94

CAPITULO I. REGULACIÓN DE LA GERMINACION DE SEMILLAS: CONTROL HORMONAL Y FOTOCONTROL

1.1. Introducción

Las semillas son estructuras reproductoras que garantizan la supervivencia del embrión desde que éste se separa de la planta progenitora hasta que se inicia el crecimiento de la nueva plántula. Las semillas son resistentes a la desecación, poseen reservas nutritivas y, además, pueden presentar dormición, estado en el que no es posible la germinación bajo condiciones ambientales que normalmente permitirían este proceso. La **dormición** es una estrategia muy efectiva que asegura la supervivencia de las especies regulando la germinación en el espacio y en el tiempo. Las semillas sólo germinarán cuando las condiciones ambientales permitan el óptimo crecimiento de las plántulas y, por extensión, la realización del ciclo vital. El control del inicio de la germinación es esencial para la supervivencia de las especies.

La germinación es el proceso de iniciación del crecimiento del embrión. Se inicia con la absorción de agua (imbibición) y finaliza con la emergencia del embrión (radícula o hipocotilo) a través de la cubierta o testa de la semilla. La imbibición da lugar a una pérdida de solutos y reanuda la actividad metabólica (respiración, síntesis de proteínas, ácidos nucleicos,...). En general, la **imbibición** es un proceso trifásico: a una etapa inicial (fase I) de rápida absorción de agua, le sigue otra (fase II) con escasos cambios en contenido hídrico y, finalmente, (fase III) se produce un nuevo incremento hídrico que coincide con el crecimiento de la radícula. Considerando que la germinación finaliza al iniciarse el crecimiento del embrión, la fase II es de gran interés en la regulación del proceso. Así, muchos inhibidores (ácido abscísico, déficit hídrico y temperaturas extremas) y promotores (KNO_3) de la germinación actúan alargando o acortando esta fase.

Las semillas que no están en dormición germinan tras la imbibición siempre que se encuentren en presencia de oxígeno y a temperatura adecuada. Sin embargo, las semillas en dormición no germinan aún cuando la humedad, temperatura y atmósfera sean óptimas. La dormición (en ocasiones llamada reposo) puede ser debida a características de la propia semilla (inmadurez del embrión, acumulo de inhibidores, impermeabilidad de la cubierta al agua y gases) o ser inducida por factores ambientales. El estado de reposo puede superarse por cambios que ocurren en la propia semilla con el paso del tiempo o mediante estímulos ambientales, principalmente, luz y temperatura. El grado de reposo de un banco de semillas depende del genoma y de las condiciones ambientales presentes durante la producción de las semillas y la imbibición.

Aún cuando la liberación o rotura de la dormición y la germinación son procesos independientes, ambos están regulados por hormonas y factores ambientales, tales como, luz, temperatura, composición química, humedad y atmósfera (O_2 , CO_2 , etileno) del suelo. La luz y la temperatura interactúan entre sí y, a diferencia de los otros factores ambientales, pueden actuar a través de fluctuaciones diarias y estacionales. En muchas especies, se ha observado una correlación entre ciclos estacionales de temperatura, pérdida de reposo y estimulación de la germinación.

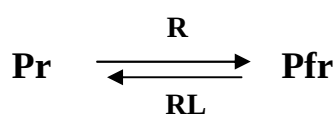
Con relación al control hormonal, la germinación está regulada por un **balance hormonal** adecuado más que por la presencia de una cantidad umbral de una determinada hormona. El ácido abscísico inhibe el crecimiento del eje embrionario. En cambio, en semillas de cereales, las giberelinas estimulan la movilización de las reservas al inducir la síntesis de α -amilasa. Numerosos experimentos han demostrado que la germinación generalmente responde a la aplicación exógena de fitohormonas.

- Las **giberelinas** (GAs) se consideran los promotores más potentes de la germinación y estimulan la germinación de las semillas de gran número de especies.

- Las **citoquininas** (CKs) y el **etileno** tienen un efecto promotor más restringido, si bien las primeras posiblemente desempeñan un papel especial antagonizando el efecto de los inhibidores naturales.

- El **ácido abscísico** (ABA) se considera el inhibidor de la germinación por excelencia y actúa en este sentido en la mayor parte de las especies ensayadas.

La influencia de la luz sobre la germinación se conoce desde el s. XIX. La investigación del fotocontrol de la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* condujo al descubrimiento del fitocromo (Borthwick et al., 1952). La interrupción de la oscuridad por un pulso (breve irradiación) de luz roja (R) estimulaba la germinación y, este efecto, era anulado por una posterior irradiación con luz roja-lejana (RL). En tratamientos secuenciales, la respuesta siempre dependía de la última irradiación aplicada. Si se interponía un período de oscuridad entre los pulsos de R y RL, la magnitud de la reversión del efecto de R por RL disminuía al aumentar el período de oscuridad e incluso se perdía (escape de reversibilidad). Esta reversibilidad R/RL es propia de respuestas de flujo bajo (LFR) moduladas por fitocromos, fotorreceptores que existen en dos formas (Pr y Pfr) fotoconvertibles por irradiaciones con R y RL. En todos los casos, la forma Pr (inactiva) se convierte en Pfr (activa) por absorción de luz R. Pfr se convierte en Pr al absorber luz RL. La cantidad de Pfr presente en una semilla madura está regulada por las condiciones de luz durante la maduración de la semilla.



El efecto de la luz puede ser promotor o inhibidor según la composición espectral, la irradiancia y duración de la irradiación, la temperatura y el estado fisiológico de las semillas. La efectividad de la irradiación también depende del grado de imbibición y, en la mayoría de especies ensayadas, la respuesta máxima requiere un mínimo de 24 h de imbibición. La irradiación es inefectiva en semillas deshidratadas. Las semillas se denominan **fotoblásticas positivas** o **negativas** según la germinación resulte estimulada o inhibida por la luz (Tabla 1). La germinación de las semillas de escasas especies es independiente de la luz; sin embargo, aún en estos casos, la luz puede ejercer un efecto inhibidor en situación de estrés.

Investigaciones más recientes, en semillas fotoblásticas positivas de *Lactuca sativa* y *Arabidopsis thaliana*, han puesto de manifiesto que la curva flujo-respuesta es bifásica. La primera fase se satura con **flujos muy bajos** ($0,1-10 \text{ nmol. m}^{-2}$) de R e incluso con un pulso de RL y se denomina respuesta de flujo muy bajo (**VLFR**). La segunda fase corresponde a una respuesta de **flujo bajo** ya que se satura con flujos más elevados ($1 \text{ o } 10 - 1000 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}$) de R y presenta **reversibilidad R/RL**, es decir, el efecto estimulador de R es cancelado por una posterior irradiación con RL. La germinación de las semillas de algunas especies que es estimulada por una **LFR**, resulta inhibida por una exposición prolongada (varias horas) de RL. Este efecto de una continua irradiación RL se conoce como respuesta de **alta irradiancia** (**HIR**) (Hartmann, 1966; de Miguel et al., 2000). (Fig. 1.1).

Tabla 1.1.- Fotocontrol de la germinación de las semillas de distintas especies (adaptado de Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975).

Germinación		
Fotoestimulada	Fotoinhibida	Fotoindependiente
<i>Adonis vernalis</i>	<i>Ailanthus glandulosa</i>	<i>Anemone nemorosa</i>
<i>Alisma plantago</i>	<i>Aloe variegata</i>	<i>Bryonia alba</i>
<i>Bellis perennis</i>	<i>Cistus radiatus</i>	<i>Cytisus nigricans</i>
<i>Capparis spinosa</i>	<i>Delphinium elatum</i>	<i>Datura stramonium</i>
<i>Erodium cicutarium</i>	<i>Ephedera helvetica</i>	<i>Hyacinthus candicans</i>
<i>Fagus silvatica</i>	<i>Evonymus japonica</i>	<i>Juncus tenagea</i>
<i>Genista tinctoria</i>	<i>Forsythia suspensa</i>	<i>Linaria cymbalaria</i>
<i>Iris pseudacorus</i>	<i>Hedera helix</i>	<i>Origanum majorana</i>
<i>Juncus tenuis</i>	<i>Linnaea borealis</i>	<i>Pelargonium zonale</i>
<i>Lactuca scariola</i>	<i>Nigella damascena</i>	<i>Shorgum halepense</i>
<i>Magnolia grandiflora</i>	<i>Phacelia tanacetifolia</i>	<i>Theobroma cacao</i>
<i>Nasturtium officinale</i>	<i>Ranunculus crenatus</i>	<i>Traggopogon pratensis</i>
<i>Oenothera biennis</i>	<i>Silene conica</i>	<i>Vesicaria viscosa</i>
<i>Panicum capillare</i>	<i>Tamus communis</i>	
<i>Reseda lutea</i>	<i>Tulipa gesneriana</i>	
<i>Salvia pratense</i>	<i>Yucca alopholia</i>	
<i>Suaeda maritima</i>		
<i>Tamarix germanica</i>		
<i>Taraxacum officinale</i>		
<i>Veronica arvensis</i>		

Desde un punto de vista ecológico, el fotocontrol de la germinación es de gran importancia. En condiciones naturales, la luz solar raramente penetra a profundidades superiores a 5-10 mm en el suelo y, por ello, solo podrá afectar la germinación de las semillas que se encuentren a esta profundidad. Además debe considerarse que la cantidad y la calidad de la radiación (caracterizada por la relación R:RL) varía al pasar a través de un dosel vegetal y al penetrar en el suelo. Estos cambios se traducen en una disminución de la relación (R:RL) respecto a la que presenta la radiación solar. Los fitocromos, por su capacidad de percibir la relación R:RL de la radiación, detectan la sombra y proporcionan información sobre las características del dosel vegetal. Así pues, los fitocromos aseguran que la germinación solo proceda en condiciones de luz óptimas para el crecimiento de las plántulas.

El efecto de la luz sobre la germinación depende enormemente de la temperatura. El efecto estimulador de R sobre la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* es inefectivo si éstas se mantienen a 35°C tras el tratamiento luminoso. Por otra parte, a 10-15°C estas semillas germinan sin ningún tipo de irradiación. También se ha observado que la proporción de una población de semillas de *Lactuca* que presenta VLFR aumenta considerablemente después de mantener las semillas a 4°C durante 10-24 horas (Shinomura, 1997). Se desconoce como actúa la temperatura, pero podría regular la vía de transducción de la señal luminosa captada por los fitocromos y/o la destrucción de estos fotorreceptores. Algunas semillas fotoblásticas positivas germinan a temperatura constante mientras que la germinación de otras resulta estimulada por alternancia de temperaturas. En general, la tasa de germinación a una determinada temperatura puede ser alterada por una pre-incubación a otra temperatura.

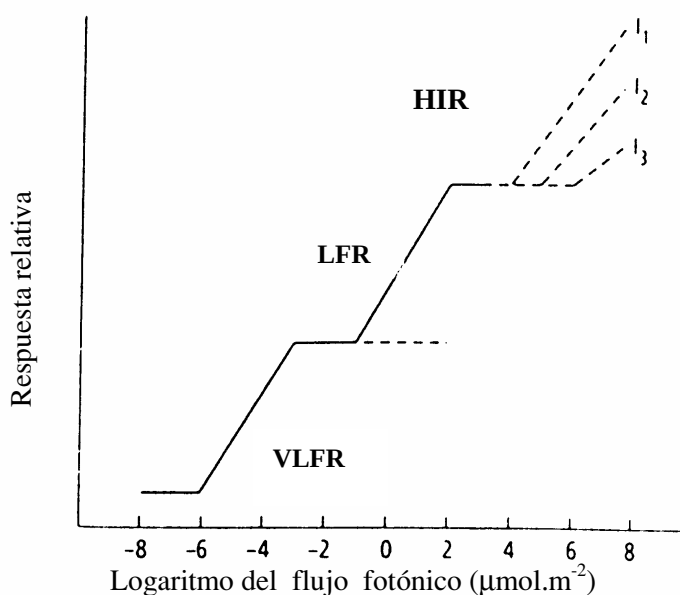


Fig.1.1. Tipos de respuesta de los fitocromos en función del flujo fotónico de luz roja. Las respuestas de flujo muy bajo (VLFR) y las respuestas de flujo bajo (LFR) se desencadenan por pulsos de luz. Las respuestas de alta irradiancia (HIR) se inducen por irradiaciones prolongadas (adaptado de Briggs et al. 1984)

1.2. Objetivos

Los **objetivos** de esta práctica son estudiar los efectos de la **aplicación exógena de hormonas** (quinetina, ácido abscísico y ácido giberélico), **un pulso (15 min) de luz roja** y la **alternancia de temperaturas** en la germinación de semillas de *Cynodon dactylon* y *Lactuca sativa* cv. Grands Rapids. Ambas especies presentan semillas fotoblásticas positivas y *C. dactylon*, además, requiere un régimen de alternancia de temperaturas y también responde al tratamiento con KNO_3 .

Lactuca sativa cv. Grands Rapids. La germinación se determinará a las 48 h de la imbibición. El control de la germinación vía fitocromo se pondrá de manifiesto mediante la aplicación de pulsos de luz roja, roja lejana, y tratamientos secuenciales de rojo y rojo lejano.

Cynodon dactylon. La germinación de las semillas incubadas en diferentes soluciones hormonales se seguirá durante 2-3 semanas en condiciones de oscuridad absoluta. La participación del fitocromo se pondrá de manifiesto mediante la aplicación de un pulso (15 minutos) de luz roja a las 12-24 h del inicio de la imbibición. El efecto de la temperatura se evaluará sometiendo las semillas a una elevada temperatura constante (38°C), muy adecuada para la germinación de *Cynodon* (Young et al. 1977), o bien a régimen de alternancia de temperaturas de $22^\circ\text{C}/38^\circ\text{C}$ (Simón y Vidal, 1986).

1.3. Material y métodos

1.3.1. Material vegetal

Semillas de *L. sativa* cv. Grands Rapids (Carolina Biological Supply Company, USA).
Semillas de *C. dactylon* (Semillas Fitó, Barcelona).

1.3.2. Material y equipamientos

1.3.2.1. Reactivos

Solución de nitrato potásico 20 mM
Solución stock de ácido abscísico 10^{-2} M
Solución stock de ácido giberélico 10^{-2} M
Solución stock de quinetina 10^{-4} M
Etanol 90%

1.3.2.2. Material fungible

Cynodon dactylon: Cada equipo de trabajo necesita:
8 cápsulas de Petri de vidrio (6 cm de diámetro)
8 discos de papel de filtro Whatman 1 (7 cm de diámetro)
un par de pinzas de disección de punta roma
pipetas de 10 ml
papel de aluminio
1 rotulador para vidrio resistente al agua
4 cajas opacas de cartón o metálicas (cubrir el interior con plástico negro)
etiquetas adhesivas

Lactuca sativa: Cada equipo de trabajo necesita:
5 cápsulas de Petri de vidrio (6 cm de diámetro)
5 discos de papel de filtro Whatman 1 (7 cm de diámetro)
un par de pinzas de disección de punta roma
pipetas de 10 ml
papel de aluminio
1 rotulador para vidrio resistente al agua
5 cajas opacas de cartón o metálicas (cubrir el interior con plástico negro)
etiquetas adhesivas

1.3.2.3. Equipamiento

Cámara oscura con luz verde de seguridad. (ver anexo 1.1)
Germinador a temperatura constante de 38°C
Germinador con termoperíodo de 22°C y 38°C
Fuente de luz roja (ver anexo 1.1)
Fuente de luz roja lejana (ver anexo 1.1)

1.3.3. Metodología

1.3.3.1. *Lactuca sativa*

Para sincronizar la germinación incubar las semillas deshidratadas a 35-37°C los tres días previos al inicio del experimento.

1.- Marcar las paredes laterales de las bases de 5 cápsulas de Petri indicando el tratamiento luminoso:

Cápsula Petri (núm)	Tratamiento luminoso
1	control (oscuridad)
2	R (15 min luz roja)
3	RL (5 min luz roja lejana)
4	R + RL (15 min R + 5 min RL)
5	RL + R (5 min RL + 15 min R)

2.- Cubrir la base de las cápsulas de Petri con un disco de papel de filtro. El papel debe recubrir parcialmente las paredes laterales.

3.- Colocar 50 semillas de *Lactuca sativa* en cada cápsula.

4.- Una vez preparadas las 5 cápsulas de Petri, añadir a cada una de ellas 8-10 ml de agua destilada. Opcionalmente precintar las cápsulas con parafilm.

Advertencia: no iniciar el apartado 4 antes de finalizar completamente el 3.

5.- Envolver cada cápsula de Petri con papel de aluminio para preservarla de la luz. A continuación, etiquetarla y dejarla en posición perfectamente horizontal

6.- Etiquetar las cajas opacas con el tratamiento luminoso: control, R, RL, R + RL y RL + R.

7.- Colocar las cápsulas de Petri envueltas en papel de aluminio en la caja correspondiente. Mantener las cajas en posición horizontal y dejarlas en un incubador a 22°C.

Advertencia: A partir de este instante todas las operaciones (apartado 8) deben efectuarse en la cámara oscura, en presencia de luz verde de seguridad.

8.- A las 16 h del inicio de la imbibición retirar el papel de aluminio y la tapa de las cápsulas de Petri 2 y 4 e irradiarlas con R (15 minutos). Después de esta irradiación, tapar de nuevo y envolver con papel de aluminio la cápsula 2. A continuación, retirar el papel de aluminio y la tapa de las cápsulas 3 y 5 e irradiar las cápsulas 4, 3 y 5 con RL (5 minutos). Tapar y envolver las cápsulas 3 y 4. Seguidamente irradiar la cápsula 5 con R (15 min), taparla y envolverla con papel de aluminio. Dejar las cápsulas en la oscuridad a 22°C.

9.- A las 48 horas del inicio del experimento, retirar el papel de aluminio y, en presencia de luz ambiental, contar el número de semillas germinadas en cada uno de los tratamientos y anotar los resultados.

1.3.3.2 *Cynodon dactylon*

1.- Distribuir los tratamientos químicos, luminosos y de temperatura (tabla adjunta) entre los distintos equipos de trabajo.

Tratamientos químicos	Tratamientos luminosos	Termoperíodo
Agua destilada (H ₂ O) KNO ₃ 20 mM GA ₃ 10 ⁻⁴ M GA ₃ 2 · 10 ⁻⁵ M KK 10 ⁻⁴ M ABA 10 ⁻⁵ M ABA 2 · 10 ⁻⁶ M GA ₃ 2 · 10 ⁻⁵ M + ABA 2 · 10 ⁻⁶ M	Oscuridad	Temperatura constante (38°C)
		Temperatura alternante (22°C – 38°C)
	Luz roja (R)	Temperatura constante (38°C)
		Temperatura alternante (22°C – 38°C)

GA₃ = ácido giberélico.

KK = quinetina

ABA = ácido abscísico.

Cada equipo realizará dos tratamientos químicos con los correspondientes tratamientos luminosos y de temperatura (ver anexo 1.2). De este modo, con 5 equipos de trabajo pueden ensayarse 4 tratamientos químicos y el correspondiente control con agua destilada por duplicado. Con más equipos de trabajo pueden ensayarse otros tratamientos.

2.- Preparar, a partir de las soluciones stock, las siguientes soluciones hormonales:

ácido abscísico 10⁻⁵ M y 2 · 10⁻⁶ M

ácido giberélico 10⁻⁴ M y 10⁻⁵ M

quinetina 10⁻⁴ M.

3.- Marcar las paredes laterales de las bases de las cápsulas de Petri indicando:

grupo de trabajo

tratamiento químico: H₂O, GA₃, KK, ABA, KNO₃

tratamiento luminoso: oscuridad (D) o luz roja (R).

temperatura: constante (TC) o alternante (TA).

4.- Cubrir la base de las cápsulas de Petri con un disco de papel de filtro. El papel debe recubrir parcialmente las paredes laterales.

5.- Colocar 100 semillas de *Cynodon dactylon* en cada cápsula de Petri.

6.- Una vez preparadas todas las cápsulas, añadir a cada una de ellas 8-10 ml de la solución correspondiente. Opcionalmente precintar las cápsulas con parafilm.

Advertencia: No iniciar el apartado 6 antes de finalizar completamente el 5.

7.- Envolver cada cápsula de Petri con papel de aluminio para preservarla de la luz. Etiquetarla.

Advertencia: Mantener las cápsulas de Petri en posición perfectamente horizontal

8.- Etiquetar las cajas opacas con el tratamiento luminoso y el de temperatura: R-TC, R-TA, D-TC y D-TA.

R = luz roja, D = oscuridad, TC = temperatura constante, TA = temperatura alternante.

9.- Colocar las cápsulas de Petri envueltas en papel de aluminio en la caja correspondiente y dejar:.

a) las cajas D-TC y R-TC en el germinador a temperatura constante de 38°C.

b) las cajas D-TA y R-TA en el germinador con termoperíodo 22°C (9 horas)-38°C (15 horas).

La alternancia de temperaturas se realizará del siguiente modo: 22°C (desde las 10 h hasta las 19 h) y 38°C (desde las 19 h hasta las 10 h del día siguiente).

10.- Al día siguiente, aproximadamente a las 24 h del inicio de la imbibición, trasladar las cajas R-TC y R-TA a la cámara oscura, retirar el papel de aluminio e irradiar las cápsulas con R (15 minutos). A continuación, envolver de nuevo las cápsulas en papel de aluminio y dejarlas en la caja correspondiente. Trasladar las cajas al germinador correspondiente.

Advertencia: para preservar el material de la luz, todas las manipulaciones se llevarán a cabo en la cámara oscura, en presencia de luz verde de seguridad.

11.- A los 3, 6, 9, 12, 15 y 21 días del inicio del experimento se procederá a contar el número de semillas germinadas en cada uno de los tratamientos y anotar los resultados. En cada conteo, desechar las semillas que han germinado.

Advertencia: Todos los conteos deben hacerse en cámara oscura con luz verde de seguridad muy débil y difusa para no interferir en los procesos controlados por la fototransformación del fitocromo.

1.4. Resultados

- Tabular los resultados obtenidos en las distintas mediciones. La totalidad de datos obtenidos por los distintos alumnos se analizarán en conjunto, calculándose los valores medios y sus errores estándar. Ello permitirá ver la significación de los resultados. Se usarán estas medias y sus errores para la gráfica final.

- Graficar el % de germinación respecto al tiempo (días de oscuridad) de modo que quede claro el efecto de los distintos tratamientos. Elaborar cuantas gráficas sean necesarias para poner de manifiesto las diferencias entre los diferentes tratamientos ensayados.

-A partir de los efectos de las irradiaciones R y RL sobre la germinación de *Lactuca sativa* comentar la posible implicación del fitocromo en este proceso e indicar el tipo de respuesta.

- Comentar el efecto de una irradiación R sobre la germinación de *Cynodon dactylon* en condiciones de temperatura constante y alternante.

- Comentar los efectos de R en presencia de distintos compuestos químicos sobre la germinación de *Cynodon dactylon* en condiciones de temperatura constante y alternante.

1.4.1.- Tablas de resultados. - Equipo de trabajo

Tabla.- Efecto de las irradiaciones R y RL sobre la germinación de *Lactuca sativa*

Cápsula Petri (número)	Tratamientos Luminosos	Semillas germinadas (número)	% germinación
1	Oscuridad		
2	R		
3	RL		
4	R + RL		
5	RL + R		

Tabla.- Efecto de la luz roja (R) sobre la germinación de semillas de *Cynodon dactylon* mantenidas en temperatura constante (22°C)

Tratamiento Químico	Irradiación	Semillas germinadas (número)						
		0 días	3 días	6 días	9 días	12 días	15 días	21 días
	Oscuridad							
	R							
	Oscuridad							
	R							

Tabla.. - Efecto de la luz roja (R) sobre la germinación de semillas de *Cynodon dactylon* mantenidas en alternancia de temperaturas (22°C – 38°C)

Tratamiento Químico	Irradiación	Semillas germinadas (número)						
		0 días	3 días	6 días	9 días	12 días	15 días	21 días
	Oscuridad							
	R							
	Oscuridad							
	R							

1.4.2.- Tablas de resultados generales – Grupo de Prácticas

Tabla.- Efecto de las irradiaciones R y RL sobre la germinación de *Lactuca sativa*.

Cápsula Petri (número)	Tratamientos Luminosos	Equipo de trabajo	% germinación
1	Oscuridad	1	
		2	
		3	
		4	
		5	
		Media $\pm$ ES	
2	R	1	
		2	
		3	
		4	
		5	
		Media $\pm$ ES	
3	RL	1	
		2	
		3	
		4	
		5	
		Media $\pm$ ES	
4	R + RL	1	
		2	
		3	
		4	
		5	
		Media $\pm$ ES	
5	RL + R	1	
		2	
		3	
		4	
		5	
		Media $\pm$ ES	

Tabla. - Efecto de distintos tratamientos químicos y luminosos sobre la germinación de semillas de *Cynodon dactylon* en régimen de alternancia de temperaturas (22°C-38°C).

Tratamiento Químico	Irradiación	Germinación (%)						
		0 días	3 días	6 días	9 días	12 días	15 días	21 días
Agua destilada	Oscuridad							
Agua destilada	Luz roja							
KNO ₃ 20 mM	Oscuridad							
KNO ₃ 20 mM	Luz roja							
GA ₃ 10 ⁻⁴ M	Oscuridad							
GA ₃ 10 ⁻⁴ M	Luz roja							
KK 10 ⁻⁴ M	Oscuridad							
KK 10 ⁻⁴ M	Luz roja							
ABA 10 ⁻⁵ M	Oscuridad							
ABA 10 ⁻⁵ M	Luz roja							

Bibliografía

- Borthwick, O.H.; Hendricks, S.B.; Parker, M.W.; Toole, E.H. Toole, V.K. (1952). A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 38: 662-666.
- Hartmann, K.M. (1966). A general hypothesis to interpret "high energy phenomena" of photomorphogenesis on the basis of phytochrome. *Photochemistry and Photobiology* 5: 349-366.
- de Miguel, L.; Burgin, M.J.; Casal, J.J.; Sánchez, R.A. (2000). Antagonistic action of low-fluence and high-irradiance modes of response of phytochrome on germination and β -mannanase activity in *Datura ferox* seeds. *J.Exp.Bot.* 51(347): 1127-1133.
- Mayer, AM. And Poljakoff-Mayber, A. (1975). The germination of seeds. Pergamon Press. pág 36.
- Shinomura, T. (1997). Phytochrome regulation of seed germination. *J. Plant Res.* 11: 151-161.
- Simón, E.; Vidal, D. (1986). Factores que afectan a la germinación de *Cynodon dactylon* Rich. *Bol.R.Soc.Española Hist.Nat. (Biol.)* 82(1-4): 157-176.
- Smith H. (1975). *Phytochrome and Photomorphogenesis*. McGraw-Hill. UK.
- Young, J.A.; Kay, BL.; Evans, RA. (1977). Accelerating the germination of commun bermudagrass for hidroseeding. *Agron.J.* 69: 115-119.

Anexo 1.1. Fuentes de irradiación (Smith, 1975)**- Fuente de luz roja (R)**

- 8 tubos fluorescentes Sylvania (2,5-43,5 cm, tonalidad natural, 15 vatios)

Recubrir cada tubo con un capa de filtro amarillo (Primary Yellow nº1 Cinemoid) y una de filtro rojo (Primary Yellow nº4 Cinemoid).

Los foliolos se colocan a 50 cm de esta fuente luminosa y en 15 min. reciben una energía total de $4,67 \text{ W.m}^{-2}$.

- Fuente de luz roja lejana (RL)

- 5 lámparas incandescentes Sylvania BRS de 150 vatios cuya irradiación pasa a través de un filtro formado por:

- un depósito de agua destilada de 10 cm de altura.
- un filtro azul nº 20 Cinemoid
- un filtro ambar nº 5A Cinemoid.

Los foliolos se colocan a 50 cm de esta fuente luminosa y en 5 min. reciben una energía total de $4,18 \text{ W. m}^{-2}$.

- Luz verde de seguridad

1 fluorescente con luz de día (15 W) cubierto con dos capas de filtro verde nº 90 Rosco Supergel.

Anexo 1.2. Germinación de *Cynodon dactylon*. Distribución de los tratamientos químicos, luminosos y termoperíodo

Equipo de trabajo	Tratamiento químico	Irradiación	Termoperiodo
1	agua destilada	oscuridad	constante
	agua destilada	oscuridad	alternante
	agua destilada	luz roja	constante
	agua destilada	luz roja	alternante
	KNO ₃ 20 mM	oscuridad	constante
	KNO ₃ 20 mM	oscuridad	alternante
	KNO ₃ 20 mM	luz roja	constante
	KNO ₃ 20 mM	luz roja	alternante
2	agua destilada	oscuridad	constante
	agua destilada	oscuridad	alternante
	agua destilada	luz roja	constante
	agua destilada	luz roja	alternante
	GA ₃ 10 ⁻⁴ M	oscuridad	constante
	GA ₃ 10 ⁻⁴ M	oscuridad	alternante
	GA ₃ 10 ⁻⁴ M	luz roja	constante
	GA ₃ 10 ⁻⁴ M	luz roja	alternante
3	KK 10 ⁻⁴ M	oscuridad	constante
	KK 10 ⁻⁴ M	oscuridad	alternante
	KK 10 ⁻⁴ M	luz roja	constante
	KK 10 ⁻⁴ M	luz roja	alternante
	GA ₃ 10 ⁻⁴ M	oscuridad	constante
	GA ₃ 10 ⁻⁴ M	oscuridad	alternante
	GA ₃ 10 ⁻⁴ M	luz roja	constante
	GA ₃ 10 ⁻⁴ M	luz roja	alternante
4	KK 10 ⁻⁴ M	oscuridad	constante
	KK 10 ⁻⁴ M	oscuridad	alternante
	KK 10 ⁻⁴ M	luz roja	constante
	KK 10 ⁻⁴ M	luz roja	alternante
	ABA 10 ⁻⁵ M	oscuridad	constante
	ABA 10 ⁻⁵ M	oscuridad	alternante
	ABA 10 ⁻⁵ M	luz roja	constante
	ABA 10 ⁻⁵ M	luz roja	alternante
5	ABA 10 ⁻⁵ M	oscuridad	constante
	ABA 10 ⁻⁵ M	oscuridad	alternante
	ABA 10 ⁻⁵ M	luz roja	constante
	ABA 10 ⁻⁵ M	luz roja	alternante
	KNO ₃ 20 mM	oscuridad	constante
	KNO ₃ 20 mM	oscuridad	alternante
	KNO ₃ 20 mM	luz roja	constante
	KNO ₃ 20 mM	luz roja	alternante

CAPITULO 2. FOTOCONTROL DEL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS ETIOLADAS DE GUISANTE

2.1. Introducción

La luz, actuando como señal ambiental, controla numerosos procesos del desarrollo vegetal (Frankhauser y Chory, 1997). De ahí, el aspecto totalmente diferente que presentan las plantas cultivadas en presencia de luz respecto a las **plantas etioladas** que se han desarrollado en la oscuridad (Fig. 2.1). Las plántulas etioladas son heterótrofas y muestran un aspecto bastante inusual. Aunque con ligeras variaciones, dependiendo de la especie, las dicotiledóneas etioladas tienen tallos muy largos y delgados cuya parte apical termina en una pronunciada curvatura, el gancho plumular. Los cotiledones permanecen plegados y las hojas son diminutas y carecen de cloroplastos y estomas funcionales. Estas plantas, además, presentan una pigmentación muy reducida, no sintetizan pigmentos (fotosintéticos y no fotosintéticos). Su coloración blanquizca o amarilla se debe a la ausencia de clorofila.

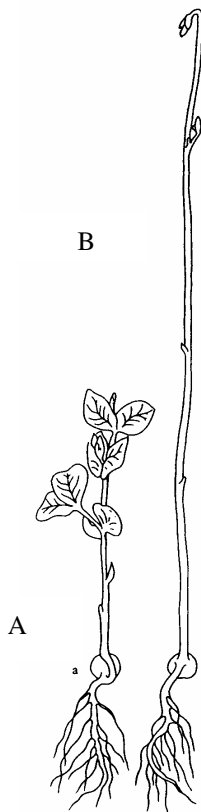


Figura 2..1.- Plántulas de guisante (*Pisum sativum*) cultivadas en presencia de luz (A) y en la oscuridad (B)

La luz inicia el proceso de **desetiolación**, que transforma las plantas etioladas heterótrofas en plantas verdes autótrofas. La etiolación y la desetiolación se dan tanto en la naturaleza como en el laboratorio. En condiciones naturales, la etiolación se produce inmediatamente después de la germinación cuando las plántulas están en el interior del suelo y crecen a expensas de las reservas acumuladas en las semillas. El gancho apical protege la yema apical y favorece el desplazamiento del brote en el suelo. La elevada tasa de **elongación del tallo** (hipocotilo o epicotilo) permite que el ápice del brote alcance la superficie lo más rápidamente posible.

La desetiolación incluye numerosos cambios a nivel morfológico, fisiológico, celular y molecular que se producen de forma muy ordenada y coordinada en el espacio y el tiempo.

A nivel morfológico, la irradiación de una dicotiledónea etiolada provoca una **disminución** de la tasa de **crecimiento del tallo**, un **enderezamiento del gancho plumular**, la formación de tricomas y un despliegue de los cotiledones y las **hojas que se expanden**, completan su desarrollo y se transforman en **fotosintéticamente activas** y con estomas funcionales. El tamaño final de las hojas puede ser unas 20 veces mayor a la luz que en oscuridad. También aumenta el desarrollo del sistema radicular. Estos efectos de la luz durante la desetiolación dependen tanto de la cantidad de luz recibida como de la calidad de la misma.

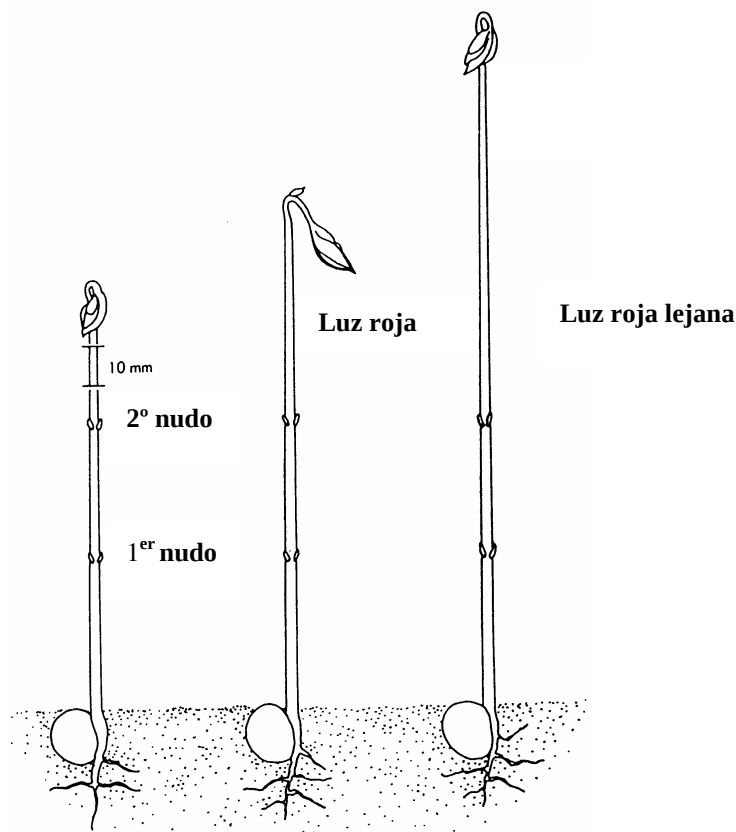


Fig. 2.2. Plántulas de guisante (variedad Alaska) de 7 días de edad. La plántula de la izquierda ha permanecido siempre en la oscuridad. Las dos restantes han sido tratadas con una breve irradiación de luz roja o roja lejana a los 6 días de edad.

A nivel molecular, un acontecimiento clave es la estimulación de la **síntesis de clorofilas**. La luz controla la síntesis de clorofilas en dos puntos: a) incrementando la síntesis de su precursor, el **ácido δ -aminolevulínico**, y b) estimulando la reducción de la protoclorofilida a **clorofilida** (Apel et al., 1980). La luz también actúa regulando la expresión de muchos genes que codifican proteínas con

funciones muy diversas (Terzaghi y Cashmore, 1995). Así, estimula la transcripción de los **genes CAB** que codifican proteínas que se enlazan a las clorofilas y forman parte de los **complejos captadores de energía de los fotosistemas** y de los **RcbS** y **RcbL** que codifican respectivamente las subunidades menor y mayor de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa-oxigenasa (**RubisCO**). También estimula la transcripción de los **genes PAL** y **CHS** que codifican la fenilalanina amonio liasa y la calcona sintasa, enzimas básicos en la **síntesis de antocianos**. En cambio, la luz (concretamente roja) inhibe la expresión del **gen PHYA** que codifica la apoproteína del **fitocromo A**.

A nivel celular, destaca el **desarrollo** de los **cloroplastos**. Los plastos de las plantas etioladas (etioplastos) poseen una estructura tubular interna muy organizada que recibe el nombre de **cuerpo prolamelar**. En presencia de luz, este cuerpo prolamelar se dispersa en vesículas y tubos que se transforman en **tilacoides** que, a su vez, se organizan formando los tilacoides del estroma y los grana típicos del cloroplasto. Estos cambios ultraestructurales, asociados a la síntesis masiva de clorofilas y otros componentes del aparato fotosintético, convierten el etioplasto en un cloroplasto plenamente funcional.

Todos estos cambios asociados a la desetiación son desencadenados por la luz captada por uno o varios **fotorreceptores** (Batschauer, 1998):

Fitocromos: cromoproteínas que detectan la calidad de la radiación (cambios en la relación R:FR). Modulan tres clases de respuestas: respuestas de flujo muy bajo (VLFR), de flujo bajo (LFR) y de alta irradiancia (HIR). En plantas superiores se han identificado 5 fitocromos (Phy A - Phy E), siendo phy A y phy B los más estudiados.

Los **fotorreceptores B/UV-A**, tales como los **criptocromos** y **fototropinas**.

Los **fotorreceptores UV-B** que regulan la formación de pigmentos protectores de la radiación UV y aún no identificados a nivel molecular.

Los **fitocromos** intervienen en la mayor parte de las respuestas que se producen durante la desetiación y, en muchos casos, actúan de forma integrada con los otros fotorreceptores. Así, la abertura del gancho plumular está bajo control de fitocromos (Fig. 2.2) y, en algunas especies, también resulta estimulada por un fotorreceptor B (Liscum y Hangarter, 1993). Los fitocromos y la protoclorigilina regulan la síntesis de las clorofilas. Los criptocromos y los fitocromos regulan la elongación del tallo y la síntesis de antocianos. Fitocromos, fotorreceptores B/UV-A y fotorreceptores UV-B estimulan la expresión de los genes **CAB**, **RcbS**, **RcbL** y **CHS**.

Las plantas etioladas constituyen un material muy adecuado para estudiar la implicación de los distintos fitocromos en el proceso de desetiación y, además, los distintos sistemas de respuesta de los fitocromos. Las plántulas etioladas poseen abundante **fitocromo A**, lábil a la luz, que interviene en la desetiación regulando numerosas respuestas de **alta irradiancia** (HIR) con sensibilidad máxima próxima al rojo lejano (RL) y respuestas de **flujo muy bajo** (VLFR). La expansión de las células epidérmicas y maduración de células estomáticas responde a una HIR. En cambio, el fitocromo B participa en la desetiación regulando respuesta inducidas por una irradiación continua de luz roja (R). En presencia de luz blanca o R la concentración de fitocromo A disminuye drásticamente debido a la degradación selectiva de Pfr y a la inhibición de la expresión del gen **PHYA**. Este fitocromo A no es exclusivo de las plantas etioladas ya que también se encuentra (en menor cantidad) en plantas cultivadas en presencia de luz. Los restantes fitocromos (B-E) no son fotolábiles y, concretamente el fitocromo B, está implicado en las respuestas de **flujo bajo** (LFR) (Batschauer, 1998)

Es evidente pues que la luz, por una vía independiente de la fotosíntesis, desencadena numerosos cambios siendo la expansión y el desarrollo de las hojas uno de ellos. En etapas posteriores del desarrollo, estos efectos se ponen de manifiesto al comparar las **hojas de sol** y las **de sombra** (Tabla 2.1). La relación entre el área del mesófilo y el área foliar (A_{mes}/A) - que equivaldría a la relación área interna/área externa - se usa como índice cuantitativo de las diferencias entre hojas de

sol y de sombra. Su valor es inferior a 13 en hojas de sombra y puede llegar a 40 en hojas de sol. Esto implica una mayor capacidad fotosintética de las hojas de sol.

Tabla 2.1.- Características generales de las hojas de sol y de sombra

Nivel descriptivo	Caracteres de sombra	Caracteres de sol
Anatómico	Hojas anchas y delgadas Pocos estomas Pocas capas en empalizada Más espacios intercelulares Baja A_{mes}/A Cutícula delgada	Hojas más gruesas Más estomas Más capas en empalizada Células en empalizada largas y compactadas Alta A_{mes}/A ; Cutícula gruesa, a menudo con pelos, y pigmentada
Ultraestructural	Cloroplastos más anchos con más grana	Cloroplastos más pequeños; Grana pequeños y escasos
Bioquímico/Fisiológico	Más clorofila total Más clorofila a Menos coenzimas redox Menor actividad RubisCO Bajas tasas de respiración Bajo punto de compensación de luz Bajos niveles de saturación de luz	Clorofila a/clorofila b más bajo Más coenzimas redox Alta actividad RubisCO Alto punto de compensación de luz Altos niveles de saturación de luz

2.2. Objetivos

El **objetivo** de esta práctica es estudiar el **control vía fitocromo de la desetiolación** de plántulas de *Pisum sativum*.

Las semillas de guisante cuando germinan en oscuridad total dan lugar a plántulas etioladas. Estas plántulas, a los 7 días, se caracterizan por presentar tallos largos, virtualmente no pigmentados, con diminutas hojas en el primer y segundo nudo y un gancho apical que cobija una pequeña y amarillenta yema apical totalmente desarrollada (Fig. 2.2). El control de la desetiolación vía fitocromo - a través de una **respuesta de flujo bajo** (LFR)- se pondrá de manifiesto aplicando a las plántulas etioladas pulsos (irradiaciones cortas) de luz roja (R) roja lejana (RL) o secuencialmente R + RL y RL + R. Se valorará el efecto de estas irradiaciones sobre la elongación y el peso fresco del tallo y la yema, y sobre la apertura del gancho plumular.

2.3. Material y métodos

2.3.1. Material vegetal

Semillas de *Pisum sativum* var Alaska o Little Marvel

2.3.1.1. Obtención de plántulas etioladas

Todas las manipulaciones deben efectuarse en una cámara oscura, en presencia de luz verde de seguridad. Las semillas imbibidas son extremadamente fotosensibles.

- 1.- Sumergir las semillas de guisante (70-120 semillas/equipo de trabajo) en agua durante 4 h.
- 2.- Eliminar las semillas que flotan y sembrar las restantes en contenedores de plástico previamente preparados con vermiculita. Colocar las semillas imbibidas sobre la vermiculita saturada de agua de tal forma que ocupen aproximadamente la mitad de la superficie total del contenedor. A continuación, cubrir las semillas con una capa de vermiculita (saturada de agua) de un grosor equivalente al doble del diámetro de las semillas. Presionar suavemente la vermiculita.
- 3.- Dejar los contenedores en un incubador/cámara oscura a 26-27°C y 80% de humedad.
- 4.- Tras 6-7 días se obtienen plántulas óptimas para el ensayo. Las plantas adecuadas deben tener tres entrenudos de 2-4 cm de longitud y un gancho apical fuertemente curvado (Fig. 2.2). Si es necesario, el crecimiento de las plantas puede acelerarse o retardarse a través de aumentar o disminuir ligeramente la temperatura.

2.3.1.2. Cantidad de plántulas etioladas necesarias para los experimentos

- Las experiencias se realizarán con plántulas enteras.

Para averiguar el efecto de la calidad de la luz en el proceso de desetiación cada equipo de trabajo precisa 60 plántulas etioladas de 6-7 días, cultivadas en grupos de 10 en 6 distintos contenedores (10 plántulas/contenedor).

Para averiguar el efecto de las giberelinas cada equipo de trabajo precisa 50-120 plántulas etioladas de 6-7 días, cultivadas en grupos de 20 en 6 distintos contenedores (20 plántulas/contenedor). Este ensayo puede solaparse con el anterior (se necesitan 50 plántulas) o bien puede realizarse independientemente (se precisan 120 plántulas).

- De este modo, si el grupo de prácticas está formado por 8 equipos de trabajo se necesitarán:
 - 6 contenedores de plástico, cada uno con 90-110 plántulas etioladas de 6-7 días, para averiguar el efecto de la calidad de la luz en el proceso de desetiación
 - 5 contenedores adicionales, cada uno con 90-110 plántulas etioladas de 6-7 días, para investigar el efecto de las giberelinas.

Advertencia: Comprobar el tamaño de los contenedores para el cultivo, ya que deben penetrar fácilmente en las cámaras de irradiación.

2.3.1.3. Plantas verdes

Opcionalmente, a título demostrativo, puede prepararse un contenedor “extra” para obtener plantas verdes. En este caso, después de la siembra, el contenedor se mantendrá en una cámara de cultivo con luz continua o ciclos luz/oscuridad, a 26-27°C y 80% humedad.

2.3.2. Material y equipamientos

2.3.2.1. Reactivos:

Acido giberélico (GA_3) 0,1 mM
Tween 20
Mezcla de lanolina y charcol

2.3.2.2. Material fungible:

Cada equipo de trabajo necesita:
6-12 contenedores de plástico (orificios de drenaje y aireación) con vermiculita
6-12 bandejas de soporte para los contenedores.
2 tiras de corcho
4 alfileres
2 reglas graduadas (mm)
semicírculo graduado
2 pulverizadores o pipetas Pasteur

2.3.2.3. Equipamiento

Balanzas de precisión (sensibilidad 1mg)
Fuente de luz roja (Anexo 1.1)
Fuente de luz roja lejana (Anexo 1.1)
Incubador a temperatura controlada
Cámara oscura con luces verdes de seguridad (Anexo 1.1)

2.3.3. Metodología

2.3.3.1. Determinación del efecto de los tratamientos luminosos

Todas las manipulaciones deben efectuarse en una cámara oscura en presencia de luz verde de seguridad. Las plántulas etioladas son extremadamente fotosensibles.

1.- Marcar 6 contenedores de plástico (por ejemplo: 1, 2, 3, 4, 5, 6) cada uno de los cuales contiene 90-110 plántulas etioladas de 6-7-días.

2.- Cada equipo debe seleccionar 10 plántulas de cada contenedor y, en cada una de ellas, marcar un segmento de 1 cm de longitud en la parte central del tercer entrenudo en crecimiento (Fig.2.2).

Para trabajar con gran precisión y uniformizar los criterios de medida debe prepararse un “marcador”. Mezclar lanolina y charcol, dispersando el charcol en la lanolina fundida y dejar solidificar la mezcla. Colocar dos alfileres en una tira de corcho a 1 cm de distancia entre sí. Sumergir el extremo de los alfileres en la mezcla lanolina/charcol y utilizarlos para marcar por contacto. Alternativamente puede usarse como marcador (de menor precisión) un rotulador de punta muy fina y una regla.

Advertencia: La selección de las plántulas es muy importante y debe ser muy rigurosa para uniformizar resultados. Escoger sólo plántulas con tres entrenudos de 2-4 cm de longitud y un gancho apical fuertemente curvado (Fig. 2.2). Descartar las restantes

3.- Usar las 10 plántulas del contenedor 1 para medir, en cada una de ellas, los siguientes parámetros: el peso fresco de los segmentos de 1 cm, la longitud y el peso fresco de las yemas apicales, y el ángulo del gancho apical. Estas medidas corresponderán al tiempo 0 (control día 0). En el apartado 2.3.3.3 está indicado como efectuar correctamente estas medidas.

4.- Aplicar a las plántulas de los contenedores 2-6 los tratamientos luminosos que se indican a continuación. Seguidamente, dejar las plántulas en la oscuridad durante 16 - 24 horas

Contenedor (núm)	Tratamiento luminoso
2	ninguno
3	10 minutos de luz roja (R)
4	5 minutos de luz roja lejana (RL)
5	10 minutos R + 5 minutos RL
6	5 minutos RL + 10 minutos R

5.- Transcurrido este tiempo, y manteniendo las plántulas en la cámara oscura, medir de cada una de las plántulas los siguientes parámetros: la distancia entre las dos marcas del tercer entrenudo, el peso fresco de estos segmentos, la longitud y el peso fresco de las yemas apicales, y el ángulo del gancho apical. Estas medidas corresponderán al tiempo 16 o 24 horas (final del experimento). En el apartado 2.3.3.3 está indicado como efectuar correctamente estas medidas.

2.3.3.2. Interacción de las giberelinas y la luz roja

Proceder de forma idéntica, siguiendo las indicaciones del apartado anterior 2.3.3.1. con las siguientes salvedades:

- cada equipo de trabajo seleccionará 20 plántulas idénticas de cada contenedor.
- después de aplicar los tratamientos luminosos (R, RL, R+RL, RL+R) la mitad de las plántulas (10) se pulverizan con agua y la mitad restante (10) con ácido giberélico (GA_3) 0,1 mM.

El GA_3 puede aplicarse: a) por pulverización hasta que la solución gotee sobre la plántula o b) colocando una gota (de unos 100 μ l) mediante una pipeta Pasteur sobre la yema terminal. Para facilitar su penetración es preferible que el GA_3 este en solución con un humectante como Tween 20 ó Triton X-100.

2.3.3.3. Parámetros: método de medida

De cada una de las 10 plántulas sometidas a distintos tratamientos de luz y/o tratadas con GA_3 deben determinarse los siguientes parámetros.

1.- **Longitud** (mm) de los **segmentos** del **tercer entrenudo** – Se efectúa en plantas intactas mediante una regla o un pie de rey.

2.- **Peso fresco** (mg) de los segmentos del tercer entrenudo – Después de medir la longitud de cada segmento, cortarlos y pesarlos, uno a uno, en balanzas de precisión (1 mg).

3.- **Longitud** (mm) de la **yema terminal** – Se determina midiendo la distancia desde las escamas basales de la yema hasta el extremo apical de la misma.

4.- **Peso fresco** (mg) de la yema apical – Tras medir la longitud de cada yema, separarla de la plántula y pesarla en balanzas de precisión.

5.- **Ángulo del gancho plumular** – El ángulo se valora, sobre fotocopias de la yema y el epicotilo, usando un semicírculo graduado.

2.4 Resultados

- Para cada parámetro evaluado, tabular los resultados obtenidos (valor medio y desviación estándar). En la tabla, indicar los valores obtenidos al inicio y al final del experimento y el incremento respecto al día 0.
- Calcular el % de incremento respecto al día 0 de cada parámetro y representar gráficamente los resultados. Graficar independientemente cada parámetro.
- Comentar los efectos de las irradiaciones R, RL, R+RL y RL+R sobre cada uno de los parámetros evaluados.
- Comentar los efectos del GA_3 sobre cada uno de los parámetros considerados. Indicar su efecto sobre las plántulas mantenidas en la oscuridad y las sometidas a distintos tratamientos lumínicos.
- Representar gráficamente el % de incremento de la longitud del tallo y de la yema terminal de plántulas pulverizadas con agua o con GA_3 sometidas a distintos tratamientos luminosos.
- Comentar las diferencias existentes entre las plantas verdes y las etioladas.

2.4.1. Tablas de resultados - Equipo de trabajo

Tabla.- Efecto de las irradiaciones R y RL sobre el crecimiento del tallo de plántulas etioladas de *Pisum sativum*.

Tratamientos luminosos	Plantas número	Longitud (mm)			Peso fresco (mg)		
		Inicial	Final	$\Delta \pm SE$	Inicial	Final	$\Delta \pm SE$
Control							
R							
RL							
R + RL							
RL + R							

Tabla.- Efecto de las irradiaciones R y RL sobre el crecimiento de la yema apical de plántulas etioladas de *Pisum sativum*.

Tratamientos luminosos	Plantas número	Longitud (mm)			Peso fresco (mg)		
		Inicial	Final	$\Delta \pm SE$	Inicial	Final	$\Delta \pm SE$
Control							
R							
RL							
R + RL							
RL + R							

Tabla.- Efecto de las irradiaciones R y RL sobre el ángulo del gancho plumular de plántulas etioladas de *Pisum sativum*.

Tratamientos luminosos	Plantas número	Medida del ángulo (°)		
		Inicial	Final	$\Delta \pm SE$
Control				
R				
RL				
R + RL				
RL + R				

Tabla.- Efecto de las irradiaciones R y RL sobre el crecimiento del tallo de plántulas etioladas de *Pisum sativum* tratadas con GA₃ 0,1 mM.

Tratamientos luminosos	Plantas número	Longitud (mm)			Peso fresco (mg)		
		Inicial	Final	$\Delta \pm SE$	Inicial	Final	$\Delta \pm SE$
Control							
R							
RL							
R + RL							
RL + R							

Tabla.- Efecto de las irradiaciones R y RL sobre el crecimiento de la yema apical de plántulas etioladas de *Pisum sativum* tratadas con GA₃ 0,1 mM.

Tratamientos luminosos	Plantas número	Longitud (mm)			Peso fresco (mg)		
		Inicial	Final	$\Delta \pm SE$	Inicial	Final	$\Delta \pm SE$
Control							
R							
RL							
R + RL							
RL + R							

Tabla.- Efecto de las irradiaciones R y RL sobre el ángulo del gancho plumular de plántulas etioladas de *Pisum sativum* tratadas con GA₃ 0,1 mM.

Tratamientos luminosos	Plantas número	Medida del ángulo (°)		
		Inicial	Final	$\Delta \pm SE$
Control				
R				
RL				
R + RL				
RL + R				

2.4.2. Resultados generales - Grupo de prácticas

Tabla.- Efecto de las irradiaciones R y RL sobre la abertura del gancho plumular y el crecimiento del tallo y la yema apical de plántulas etioladas de *Pisum sativum*.

Tratamientos Luminosos	Equipo trabajo	Plántulas número	Tallo Δ longitud (mm) $\pm$ SE	Tallo Δ PF (mg) $\pm$ SE	Yema apical Δ longitud (mm) $\pm$ SE	Yema apical Δ PF (mg) $\pm$ SE	Ángulo Gancho plumular Δ ($^{\circ}$) $\pm$ SE
Control	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
R	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
RL	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						

Tabla.- Efecto de las irradiaciones R + RL y RL + R sobre la abertura del gancho plumular y el crecimiento del tallo y la yema apical de plántulas etioladas de *Pisum sativum*

Tratamientos Luminosos	Equipo trabajo	Plántulas Número	Tallo Δ longitud (mm) $\pm$ SE	Tallo Δ PF (mg) $\pm$ SE	Yema apical Δ longitud (mm) $\pm$ SE	Yema apical Δ PF (mg) $\pm$ SE	Ángulo Gancho plumular Δ ($^{\circ}$) $\pm$ SE
R + RL	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
RL + R	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						

Tabla.- Efecto de las irradiaciones R y RL sobre la abertura del gancho plumular y el crecimiento del tallo y la yema apical de plántulas etioladas de *Pisum sativum* tratadas con GA₃ 0,1 M.

Tratamientos Luminosos	Equipo trabajo	Plántulas número	Tallo Δ longitud (mm) ±SE	Tallo Δ PF (mg) ±SE	Yema apical Δ longitud (mm) ±SE	Yema apical Δ PF (mg) ±SE	Ángulo Gancho plumular Δ (°) ± SE
Control	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
R	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
RL	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						

Tabla.- Efecto de las irradiaciones R + RL y RL + R sobre la abertura del gancho plumular y el crecimiento del tallo y la yema apical de plántulas etioladas de *Pisum sativum* tratadas con GA₃ 0,1 M.

Tratamientos Luminosos	Equipo trabajo	Plántulas Número	Tallo Δ longitud (mm) ±SE	Tallo Δ PF (mg) ±SE	Yema apical Δ longitud (mm) ±SE	Yema apical Δ PF (mg) ±SE	Ángulo Gancho plumular Δ (°) ± SE
R + RL	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
RL + R	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						

Bibliografía

Apel, K., Santel, JJ., Redlinger, TE; Falk, H. (1980). The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.): isolation and characterization of the NADPH- protochlorophyllide oxidoreductase. Eur. J Biochem 111: 251-258.

Batschauer, A. (1998). Photoreceptors of Higher Plants. Planta 206: 479-492.

Frankhauser, C.; Chory, J. (1997). Light Control of Plant Development. Annu Rec Cell Dev Biol 13: 203-229.

Liscum, E. Hangarter, R. (1993). Light-stimulated apical hook opening in wild-type *Arabidopsis thaliana* seedlings. Plant Physiology 101: 567-572.

Terzaghi, W.B.; Cashmore, A.R. (1995). Light-regulated transcription. Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46: 445-474.

CAPITULO 3. EFECTO DEL FITOCROMO SOBRE LOS MOVIMIENTOS FOLIARES NICTINÁSTICOS

3.1 Introducción

Charles Darwin fue uno de los primeros investigadores que se interesó por el movimiento de las plantas. En su libro "The Power of Movements in Plants" (1881) nos legó detalladas descripciones de estos movimientos causados por cambios de turgencia o bien por crecimiento celular. Algunos movimientos son autónomos, es decir, están bajo control endógeno. Otros, como los **tropismos**, se producen en respuesta a estímulos direccionales. Por el contrario, las **nastias** son respuestas a estímulos ambientales no direccionales determinadas por la propia anatomía del órgano. En el grupo de las nastias se incluyen las **nictinastias** en las que el estímulo desencadenante es la transición luz → oscuridad, y las **fotonastias** desencadenadas por transiciones oscuridad → luz.

Los **movimientos** foliares **nictinásticos** o "de sueño" son propios de diversas especies de Leguminosas y Oxalidaceas, y constituyen una respuesta de la planta a un cambio de iluminación. Así, por ejemplo, las hojas de *Samanea saman*, *Trifolium repens* o *Robinia pseudoacacia* están en posición horizontal o sea totalmente extendidas durante el día, ofreciendo la máxima superficie de interceptación de la luz, y se pliegan o cierran sobre sí mismas por el envés al llegar la noche, minimizando así su superficie expuesta. En otras especies, como *Albizia julibrissim* los foliolos se aproximan por el haz durante la noche. El significado fisiológico de estos movimientos ha sido muy debatido. La hipótesis más plausible supone que el cierre nocturno evita pérdidas de calor al disminuir la superficie de radiación. En climas cálidos con oscilaciones térmicas diarias muy acusadas, durante la noche y a cielo abierto la temperatura ambiente puede ser muy baja y la gran diferencia de temperatura entre el aire y la hoja podría ocasionar un enfriamiento de la hoja capaz de dañar sus enzimas, especialmente adaptadas a altas temperaturas en especies de clima cálido.

Cabe añadir que en ausencia de iluminación, las hojas de las plantas nictinásticas continúan oscilando entre las dos posiciones citadas con una periodicidad circadiana (**movimiento rítmico**). Este movimiento rítmico depende de un **oscilador endógeno** o **reloj biológico**. En condiciones naturales, el ritmo endógeno está sincronizado con las transiciones luz-oscuridad del ambiente a través de dos sistemas fotorreceptores: **fitocromos** y un **fotorreceptor B/UV-A**, posiblemente tipo criptocromo (Suh et al., 2000). Los fitocromos están relacionados con el movimiento de cierre y los criptocromos con el de abertura. Sin embargo, la interacción reloj endógeno-fitocromos-criptocromo varía a lo largo del movimiento rítmico. Tanto la luz azul como la roja (a través de una LFR del fitocromo) cambian la fase del movimiento rítmico cuando se aplican en ciertos momentos del ritmo pero son totalmente inefectivas en otros. Una irradiación prolongada con luz azul estimula la abertura foliar. Una corta irradiación con luz roja antes de inducir el cierre nictinástico al inicio del día estimula el cierre a través de una LFR. Sin embargo, al final del día, el cierre nictinástico se produce independientemente de la aplicación de este tipo de irradiación (Satter y Galston, 1981).

Tanto el movimiento rítmico como el nictinástico se deben a la curvatura de los **pulvínulos**, órganos motores localizados en la base de las hojas o los foliolos. Los pulvínulos constan de un cilindro

central, con los tejidos vasculares (xilema y floema), rodeado por varias capas de células arenquimáticas corticales. Se asemejan a un cilindro flexible que se mantiene recto y horizontal cuando los folíolos están abiertos (posición horizontal diurna) y se curva adquiriendo una forma similar a una U cuando los folíolos están cerrados (posición vertical nocturna). Si los pulvínulos son grandes como en *Samanea* o *Robinia* la curvatura se observa a simple vista (Moysset y Simón, 1991).

Los cambios de curvatura de los pulvínulos se deben a **cambios de tamaño y forma** de un grupo de células del parénquima cortical, las llamadas **células motoras**. Se denominan **células motoras extensoras** aquellas que incrementan su tamaño por aumento de **turgencia** durante la abertura (o extensión). Las **células motoras flexoras**, situadas en la zona opuesta del pulvínulo, son las que aumentan de turgencia durante el cierre (o flexión). Durante el cierre nictinástico, o sea al pasar la planta de la luz a la oscuridad, se producen efectos opuestos en las dos mitades pulvinulares: flacidez de las células extensoras e incremento de turgencia en las flexoras.

Estos **cambios de turgencia** antagónicos, reversibles y perfectamente coordinados entre las células extensoras y flexoras se deben a flujos de agua dependientes de migraciones iónicas, principalmente de K^+ compensado con Cl^- , malato y otros aniones. Se desconocen los mecanismos subyacentes responsables de los cambios de turgencia de las células motoras. No obstante, a partir de un modelo inicial propuesto por Satter y Galston (1981) y de diversos estudios efectuados en *Samanea* (Satter y Morse, 1990; Lee, 1990; Moran, 1990, 1996, Moshelion y Morán, 2000, Shu et al. 2000) en la actualidad se acepta que el aumento de turgencia de las células motoras se debe a la entrada de K^+ a través de canales K_H . La hiperpolarización del plasmalema inducida por la actividad de una ATPasa- H^+ - que bombea H^+ al apoplasto - estimula la abertura de los canales K_H . La entrada de Cl^- tienen lugar vía un cotransporte H^+/Cl^- . La pérdida de turgencia requiere la despolarización del plasmalema ya sea a través de la absorción de Ca^{2+} (vía canales de Ca^{2+} o canales activados por tensión) y/o la salida de Cl^- (a vía canales de Cl^- o canales permeables a aniones y activados por tensión). Esta despolarización induce la abertura de canales de K^+ (canales K_D) y es la fuerza conductora de la salida de K^+ . La pérdida de K^+ y Cl^- provoca la salida de agua y, en consecuencia, las células pierden turgencia.

El oscilador endógeno, los fitocromos y los criptocromos se localizan en los pulvínulos y controlan el movimiento foliar regulando el trasiego iónico. La luz roja (R), roja lejana (RL) y azul (B) alteran el potencial de membrana de las células motoras cuando se aplican en ciertas fases del movimiento rítmico. En *Samanea*, B estimula la abertura de canales K_D de las células flexoras al final del período oscuro y, en cambio, R induce la abertura de canales K_H al final del día. En las células extensoras, B activa la ATPasa- H^+ y la abertura de canales K_H al final de período oscuro. Sin embargo, al final del día, las células extensoras no son sensibles a R, los canales de entrada de K^+ cierran al pasar a la oscuridad. (Mayer y Hampp, 1995, Moshelion y Moran, 2000, Shu et al. 2000).

3.2 Objetivos

El **objetivo** de esta práctica es estudiar el **control del fitocromo** sobre el **cierre nictinástico** de los folíolos de *Albizia lophantha* Benth. Con este fin, se aislarán pares de folíolos secundarios al inicio, mitad y final del fotoperíodo, se irradiarán con luz roja (R), roja lejana (RL) o secuencialmente con R + RL y RL + R y se trasladarán a la oscuridad.

La aplicación de R, RL, R + RL y RL + R permitirá determinar las características de la respuesta en cuanto a reversibilidad R/RL. La inducción del cierre nictinástico en distintos momentos del fotoperíodo permitirá observar como el efecto de la fototransformación del fitocromo varía a lo largo del ciclo diario.

3.3. Material y métodos

3.3.1. Material vegetal

Plantas de *Albizzia lophantha* Benth de dos años de edad.

Aclimatar las plantas a ciclos de 16 h luz blanca ($100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$): 8 h oscuridad. durante una semana antes de iniciar los experimentos. Mantener la temperatura entre 22°C-25°C.

3.3.2. Material y equipamiento

3.3.2.1. Reactivos

Agua destilada

3.3.2.2. Material fungible

Cada equipo de trabajo necesita:

- 4 (x3) cápsulas de Petri (sin tapa) de 9 cm de diámetro
- 1 pipeta de 10 ml
- 1 tijeras muy finas
- 1 par de pinzas con punta muy fina y plana
- 1 rotulador
- 1 semicírculo graduado

3.3.2.3. Equipamiento:

- Cámara oscura con luz verde de seguridad (ver anexo 1.1, capítulo 1)
- Fuente de luz roja (ver anexo 1.1, capítulo 1)
- Fuente de luz roja lejana (ver anexo 1.1, capítulo 1)
- Tres cámara de cultivo (*) con ciclos 16 h luz: 8 h oscuridad.

(*) Programar las tres cámaras de cultivo desfasadas respecto al inicio y fin del día de tal forma que al iniciar la práctica puedan recogerse folíolos a las 2 h, 8 h y 14 h del fotoperiodo.

3.3.3. Metodología

1.- Numerar 6 cápsulas de Petri (1, 2, 3, 4, 5, 6) y pipetear 10 ml de agua destilada en cada una de ellas. Trasladar las cápsulas a la cámara de crecimiento para la recogida de muestras.

2.- Seleccionar una hoja sana y madura (4ª ó 5ª a partir del ápice), separar un folíolo primario y eliminar los dos pares de folíolos secundarios apicales. Inmediatamente, cortar los pares de folíolos secundarios restantes y distribuirlos al azar (por ejemplo, colocando dos en cada cápsula) entre las distintas cápsulas de Petri. Antes de cortar los pares de folíolos **medir su ángulo** con un semicírculo graduado (este valor corresponde al ángulo inicial, tiempo 0) y anotar los valores en una tabla. Repetir esta operación hasta tener **10 pares de folíolos secundarios en cada cápsula**. En todos los casos se excluyen los 4 folíolos basales (Fig. 3.1).

Advertencia. Comprobar que los folíolos flotan sobre el envés. Si es necesario, con la ayuda de unas pinzas y con sumo cuidado, colocarlos en la posición correcta.

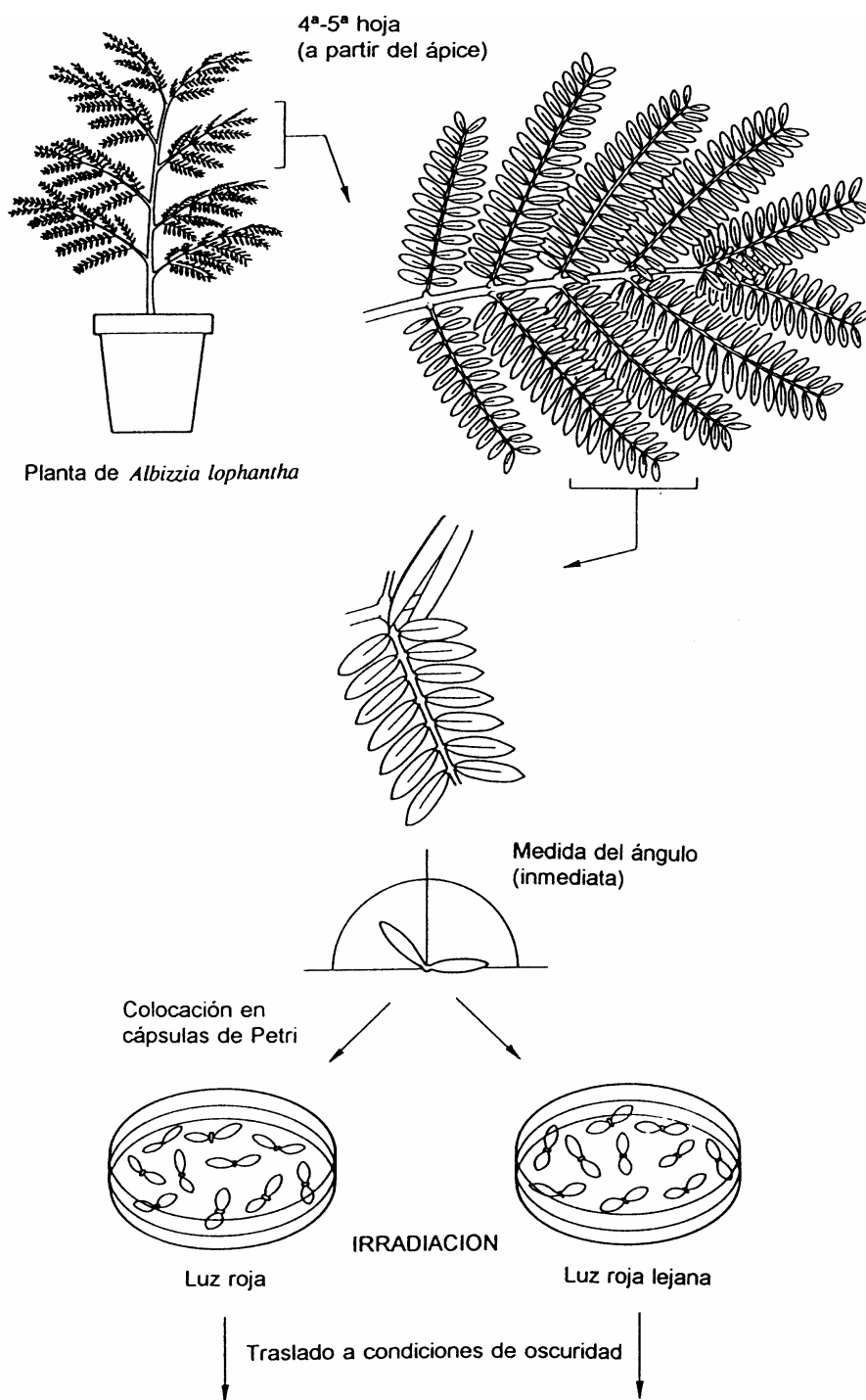


Fig. 3.1. Representación esquemática de la toma de muestra y medida del ángulo foliar al inicio del experimento,

3.- Dejar la cápsula 1 en la cámara de crecimiento en presencia de luz blanca. Trasladar la cápsula 2 a la oscuridad e irradiar con luz roja (R) o roja lejana (RL) las restantes de acuerdo con la tabla adjunta. Después de las irradiaciones dejar las cápsulas en la oscuridad.

Cápsula de Petri (número)	Tratamientos luminosos		
1	Luz blanca	→	Mantener en presencia de luz (3h)
2	Ninguno	→	Mantener en oscuridad (3h)
3	R (15 min)	→	Mantener en oscuridad (3h) tras la irradiación
4	RL (5 min)	→	Mantener en oscuridad (3h) tras la irradiación
5	R + RL	→	Mantener en oscuridad (3h) tras la irradiación
6	RL + R	→	Mantener en oscuridad (3h) tras la irradiación

4.- A los 30, 60, 90 y 120 minutos de permanencia en la oscuridad medir (con la ayuda de un semicírculo graduado) el ángulo que forman los 10 pares de folíolos de cada cápsula y anotar los resultados en una tabla. El ángulo entre los pares de folíolos de las cápsulas 2, 3, 4, 5, y 6 debe medirse en la cámara oscura, en presencia de luz verde difusa. Efectuar las medidas siguiendo el orden de numeración de las cápsulas.

Advertencia: Los resultados dependen de:

a) una correcta manipulación del material. Es imprescindible manipular los pares de folíolos cuidadosamente con las pinzas. No presionar los pulvínulos ni el limbo foliar con las pinzas.

b) la rapidez de la recogida de muestras y el tiempo que se tarda en trasladar el material a la oscuridad. Con este fin, cada equipo de trabajo, recogerá material que ha recibido un determinado número de horas de luz. Con seis equipos de trabajo podrán efectuarse dos réplicas correspondientes a las 2 h, 8 h y 14 h del fotoperiodo.

Para que un mismo equipo de trabajo pueda recoger muestras a las 2 h, 8 h y 14 h del fotoperiodo, programar las cámaras de crecimiento de tal forma que el tiempo de recogida del material esté desfasado, por lo menos, 1 hora.

3.4. Resultados

- Anotar los ángulos medidos a los distintos tiempos. Calcular el valor medio y la desviación estándar a los 0, 30, 60, 90, 120 minutos del experimento.

- Representar gráficamente los grados de cierre (variación del ángulo respecto al ángulo inicial) respecto al tiempo de permanencia en la oscuridad.

- A partir de los resultados generales obtenidos:

a) describir el control del fitocromo sobre el cierre nictinástico de *Albizzia lophantha* a las 2 h, 8 h y 14 h del fotoperiodo.

b) explicar, si procede, la ausencia de diferencias entre los tratamientos luminosos R y RL.

- **Fotoperiodo:** inicio de la fase luminosa (h): inicio de la fase oscura (h)
- **Inicio del experimento** (h del fotoperiodo):

	Angulo foliar (°) - tiempo de permanencia en luz blanca (h)				
	0	0,5	1	1,5	2
Media (°) ± ES					
Δ cierre (°) respecto a t ₀					

	Angulo foliar (°) - tiempo de permanencia en oscuridad (h)				
	0	0,5	1	1,5	2
Media (°) ± ES					
Δ cierre (°) respecto a t ₀					

	Angulo foliar ($^{\circ}$) - tiempo de permanencia en oscuridad (h)				
	0	0,5	1	1,5	2
Media ($^{\circ}$) $\pm$ ES					
Δ cierre ($^{\circ}$) respecto a t ₀					

	Angulo foliar ($^{\circ}$) - tiempo de permanencia en oscuridad (h)				
	0	0,5	1	1,5	2
Media ($^{\circ}$) $\pm$ ES					
Δ cierre ($^{\circ}$) respecto a t ₀					

Tratamiento luminoso: R (15 minutos) + RL (5 minutos)

	Angulo foliar ($^{\circ}$) - tiempo de permanencia en oscuridad (h)				
	0	0,5	1	1,5	2
Media ($^{\circ}$) $\pm$ ES					
Δ cierre ($^{\circ}$) respecto a t₀					

Tratamiento luminoso: RL (5 minutos) + R (15 minutos)

	Angulo foliar ($^{\circ}$) - tiempo de permanencia en oscuridad (h)				
	0	0,5	1	1,5	2
Media ($^{\circ}$) $\pm$ ES					
Δ cierre ($^{\circ}$) respecto a t ₀					

3.4.2. Tablas de resultados generales - Grupo de prácticas

Tabla .- Efecto de las irradiaciones R y RL sobre el cierre nictinástico de folíolos de *Albizzia lophanta* inducido a las 2h del fotoperiodo.

Tratamientos luminosos	Δ cierre (°) - tiempo de permanencia en oscuridad (h)				
	0	0,5	1	1,5	2
R (15 min)					
RL (5 min)					
R + RL					
RL + R					

Tabla.- Efecto de las irradiaciones R y RL sobre el cierre nictinástico de folíolos de *Albizzia lophanta* inducido a las 8 h del fotoperiodo.

Tratamientos luminosos	Δ cierre (°) - tiempo de permanencia en oscuridad (h)				
	0	0,5	1	1,5	2
R (15 min)					
RL (5 min)					
R + RL					
RL + R					

Tabla.- Efecto de las irradiaciones R y RL sobre el cierre nictinástico de folíolos de *Albizzia lophanta* inducido a las 14 h del fotoperiodo.

Tratamientos luminosos	Δ cierre (°) - tiempo de permanencia en oscuridad (h)				
	0	0,5	1	1,5	2
R (15 min)					
RL (5 min)					
R + RL					
RL + R					

Bibliografía

- Darwin, Ch. (1881). The Power of Movement in Plants. Da Capo Press Reprint Edition (1966).
- Lee, Y. (1990). Ion movements that control pulvinar curvature in nyctinastic Legumes. En: The pulvinus: Motor organ for leaf movement. Satter,RL; Gorton, HL; Vogelmann, TC (eds.) A. Soc. Plant. Physiol. Pub. 130-141.
- Mayer, W.E.; Hampp, R. (1995). Movement of pulvinated leaves. En: Progress in Botany 56. Behnke et al. (eds.). Springer-Verlag. 236-264.
- Moran, N. (1990). The role of ion channels in osmotic volume changes in *Samanea* motor cells. En: The pulvinus: Motor organ for leaf movement. Satter,RL; Gorton, HL; Vogelmann, TC (eds.) A. Soc. Plant. Physiol. Pub., 142-159.
- Moran, N. (1996). Membrane-delimited phosphorylation enables the activation of the outward-rectifying K channels in a plant cell. Plant Physiol. 11: 1281-1292.
- Moshelion, M.; Morán, N. (2000). Potassium-efflux channels in extensor and flexor cells of the motor organ of *Samanea saman* are not identical. Effects of cytosolic calcium. Plant Physiol. 124: 911-919.
- Moyssset, L.; Simón, E. (1991). Secondary pulvinus of *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae): Structural and ultrastructural features. Am. J. Bot. 78(11): 1467-1486.
- Satter, RL; Galston, AR.(1981). Mechanisms of control of leaf movements. Annu.Rev.Plant Physiol. 32: 83-110.
- Satter, RL; Morse, MJ. (1990). Light-modulated circadian rhythmic leaf movements in nyctinastic legumes. En: The pulvinus: Motor organ for leaf movement. Satter,RL; Gorton, HL; Vogelmann, TC (eds.) A. Soc. Plant. Physiol. Pub. 130-141.
- Smith H. (1975). Phytochrome and Photomorphogenesis. McGraw-Hill. UK.
- Shu, S.; Moran, N.; Lee, Y. (2000). Blue light activates potassium-efflux channels in flexor cells from *Samanea saman* motor organs via two mechanisms. Plant Physiol. 123: 833-843.

CAPITULO 4. INDUCCION FOTOPERIODICA DE LA FLORACIÓN Y MOVIMIENTO DEL ESTIMULO FLORAL EN *PHARBITIS NIL*

4.1 Introducción

En la vida de las plantas hay momentos críticos en los que la percepción y la respuesta a la luz son cruciales. El paso de la fase vegetativa a la reproductora es uno de ellos, por esto, numerosas especies sólo florecen en un ciclo estacional adecuado.

El cambio de la longitud del día, más que la longitud del día per se, es la principal señal ambiental que indica el paso de las estaciones. Las plantas tienen la capacidad de detectar - con gran precisión - y de responder a cambios diarios de la longitud del día y, de este modo, se adaptan a cambios estacionales del ambiente. La respuesta a la duración del día y de la noche (Hillman, 1969) es uno de los fenómenos más complejos de interacción entre organismos y ambiente. En las **respuestas fotoperiodicas** es crítico el momento en que tiene lugar la transición luz-oscuridad. La disminución, al alba y al crepúsculo, de la relación R:RL (R, luz roja; RL, luz roja lejana) de la radiación natural actúa como señal indicativa de las transiciones luz-oscuridad.

El mecanismo exacto de medida de la longitud del día es desconocido aún cuando ha sido objeto de una investigación muy intensa durante el siglo XX. No obstante, la capacidad de presentar respuestas fotoperiodicas implica que las plantas poseen: a) un mecanismo para detectar la luz que les permite distinguir entre día y noche, y b) un mecanismo endógeno de medida del tiempo basado en un ritmo circadiano y relativamente insensible a cambios impredecibles de otros factores ambientales. Los **fitocromos** captan y responden la señal lumínica interaccionando con un **oscilador circadiano endógeno** medidor del tiempo. Recientemente, en crucíferas, se ha demostrado la implicación de un fotorreceptor de luz azul/UV-A en la percepción del fotoperíodo (Thomas, 1998).

El control fotoperiódico de la floración permite sincronizar la floración de los individuos de la misma especie posibilitando la polinización cruzada con intercambio de material genético. Además, asegura que las especies completen su ciclo reproductor cuando las condiciones ambientales son favorables.

Garner y Allard (1920, 1923) observaron que la floración podía ser acelerada por días largos o días cortos según las especies vegetales. Atendiendo al requerimiento fotoperiódico necesario para florecer clasificaron las especies vegetales en **plantas de día corto (PDC)**, **plantas de día largo (PDL)** y **plantas de día neutro (PND)**. Las plantas de día corto son las que florecen o aquellas cuya floración se estimula cuando la longitud de la noche supera un **valor crítico** propio de cada especie. Son ejemplos de PDC, *Xanthium strumarium*, *Euphorbia pulcherima* y *Kalanchoe blossfeldiana*. Las plantas de día largo son las que florecen o aquellas cuya floración se estimula cuando la longitud del día es superior a un valor crítico también propio de cada especie. Son PDL *Hyoscyamus niger*, *Beta vulgaris*, *Daucus carota* y *Lactuca sativa*, entre otras. La floración de las especies de día neutro, tales como *Solanum lycopersicum* y *Cucumis sativus*, es independiente del fotoperíodo. Las plantas que responden a la longitud del día pueden, a su vez, clasificarse en **obligadas** cuando una particular longitud del día es

esencial para la floración, o **facultativas** si una particular longitud de día estimula pero no es esencial para florecer (Anexo 4.1.).

Tanto en PDC como en PDL, la percepción del **estímulo fotoperiódico** tiene lugar en las hojas y, en respuesta, éstas producen un **estímulo floral** de naturaleza desconocida. Este estímulo floral se transporta desde las hojas hasta el ápice donde tiene lugar la **evocación** (transformación de un meristemo vegetativo en reproductor). (Fig. 4.1)

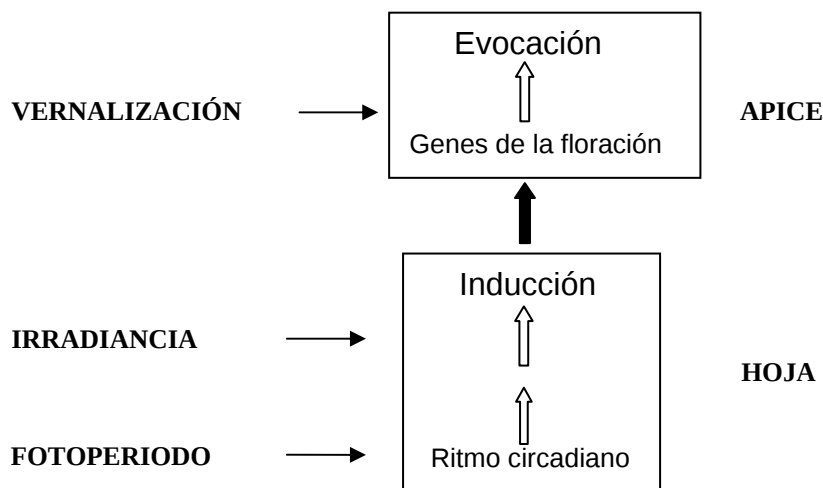


Fig. 4.1. Esquema básico de los procesos que conducen a la floración bajo control de factores ambientales de luz y baja temperatura (vernalización) (Adaptado de Lumsden, 1998)

Las PDC, tales como *Pharbitis nil* y *Xanthium strumarium*, son un sistema experimental adecuado para averiguar los componentes del sistema fotoperiódico debido a su pequeño tamaño (fáciles de manipular) y a que florecen en breve tiempo. Además, en ambas especies la floración se produce con un solo ciclo inductor.

En PDC la inducción de la floración por días cortos (DC) se anula al aplicar una irradiación roja lejana (RL) al final del día, antes del inicio de la oscuridad. Este efecto de RL es revertido por luz roja R , indicando que la floración de estas especies requiere un **alto nivel** de fitocromo activo (**Pfr**) al **inicio de la noche**. La floración de las PDC se reduce o anula si se interrumpe la noche (**rotura de la noche**) con una breve irradiación. La máxima efectividad se observa al aplicar luz R en la mitad del período oscuro. Así pues, la floración de las PDC requiere continuidad de la noche y cuando la oscuridad se interrumpe mediante pulsos de R - aplicados a distintos tiempos - se observa un ritmo, con un período aproximado de 24 horas, en la promoción e inhibición de la floración. Las PDC presentan una **ritmicidad circadiana** en su sensibilidad a **Pfr**, de tal forma que, para inducir la floración requieren alto nivel de Pfr al final del día y bajo nivel de Pfr en mitad de la noche. En la Fig. 4.2. se presenta un modelo de la interacción entre fitocromos y oscilador endógeno en la inducción fotoperiódica de la floración en PDC.

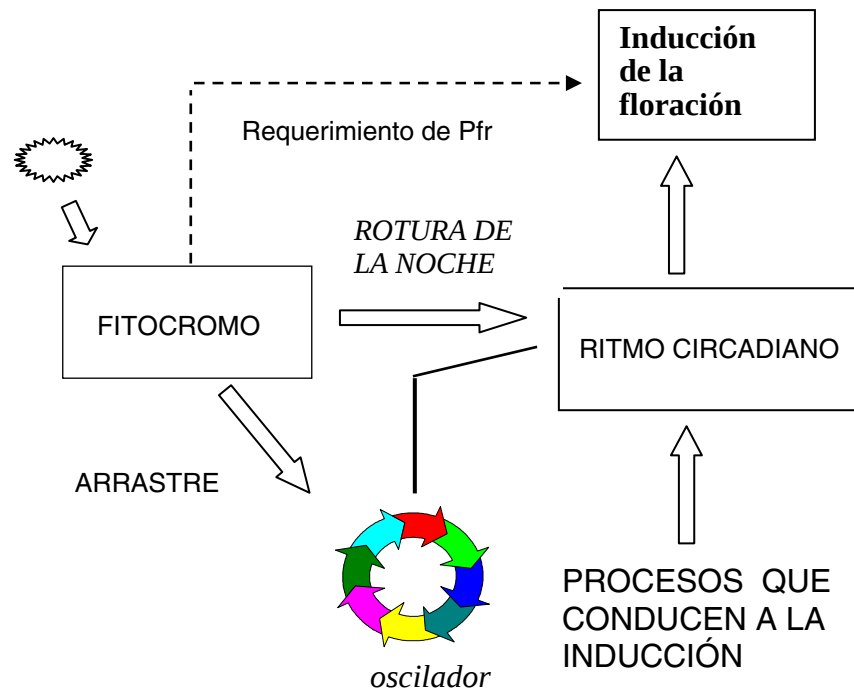


Fig. 4.2. Componentes implicados en el control fotoperiódico de la floración en plantas de día corto. (Modelo adaptado de Lumsden, 1998)

4.2. Objetivos

El **objetivo** de esta práctica es estudiar la **inducción fotoperiódica de la floración** en *Pharbitis nil*. Se trata de una planta de día corto muy sensible a la luz cuya floración se induce con una sola noche de 16 horas (un solo ciclo inductor) aplicada a plántulas en estado de cotiledón.

En esta práctica, *P. nil* se empleará para distinguir dos etapas de la floración: a) la formación del estímulo floral tras la percepción del estímulo fotoperiódico por los cotiledones y, b) el transporte del estímulo floral desde los cotiledones hasta las yemas se estimará, en una serie de experimentos paralelos, eliminando – a intervalos regulares – los cotiledones.

4.3 Material y métodos

4.3.1 Material vegetal

Semillas de *Pharbitis nil* variedad "Violet" (Caroline Biological Supplies. USA)

4.3.2 Material y equipamientos

4.3.2.1 Reactivos

Acido sulfúrico concentrado
Solución nutritiva Hoagland
Vermiculita
Arena fina

4.3.2.2. Material fungible

Cada equipo de trabajo necesita:

15 contenedores de plástico (9cm x 19cm x 8cm) perforados para drenaje
cajas de soporte de macetas o contenedores
1 vaso de precipitados de 1 l.

4.3.2.3 Equipamiento

Cámara de cultivo: luz blanca fría de alta intensidad ($200 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
temperatura controlada (23-30° C)
Cámara oscura e incubador a 28° C.
Lupa binocular
Bomba de aireación
Agitador

4.3.3 Metodología

4.3.3.1 Germinación de las semillas y crecimiento de las plántulas

1.- **Escarificación:** Las semillas de *Pharbitis nil* tienen una cubierta dura que debe ser escarificada para obtener una germinación uniforme.

. Seleccionar 90-100 semillas (cada equipo de trabajo), sumergirlas en H_2SO_4 concentrado y mantenerlas en agitación durante 1 h.

. Eliminar el exceso de ácido lavando con abundante agua fría.

2.- **Imbibición.**

. Sumergir las semillas escarificadas en agua destilada en aireación a 28-30°C durante 5-6 h. Durante este periodo las semillas se hinchan considerablemente.

. A continuación, mantener las semillas sumergidas en agua en aireación a 20°C toda la noche (14-16 h). A la mañana siguiente se observará la emergencia de la radícula.

3.- Siembra de las semillas y cultivo de las plántulas.

- . Preparar 15 contenedores de plástico (9cm x 19cm x 8cm) con vermiculita (llenar cada contenedor hasta aproximadamente $\frac{3}{4}$ de su volumen) e imbibir el sustrato.
- . Colocar las semillas germinadas sobre la vermiculita (6 semillas en cada contenedor) y recubrirlas con una capa de 1 cm de grosor formada por una mezcla de arena fina y vermiculita. Regar abundantemente con solución Hoagland diluida a la mitad.
- . Dejar los contenedores en una cámara de cultivo bajo luz continua a 30°C. Dos días más tarde, cuando los brotes han emergido, disminuir la temperatura a 23°C y cultivar las plántulas a esta temperatura durante 3 días. Las plántulas presentan la máxima sensibilidad a la inducción fotoperiodica 5 días después de la emergencia de la radícula.

4.3.3.2 Diseño del experimento**4.3.3.2.1. Determinación de la longitud crítica de la noche.**

- 1.- Trasladar 8 contenedores cada uno de ellos con 6 plántulas intactas de 5 días, a una cámara oscura o a un incubador mantenido a 28°C. El inicio del periodo oscuro es la hora 0.
- 2.- Mantener los contenedores en la oscuridad durante 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18 y 20 h. según el esquema adjunto. El periodo de oscuridad debe controlarse estrictamente.

Contenedor (núm)	plantas intactas (número)	oscuridad (horas)
1	6	11
2	6	12
3	6	13
4	6	14
5	6	15
6	6	16
7	6	18
8	6	20

- 3.- Tras el período de oscuridad correspondiente, trasladar los contenedores con las plántulas intactas a la cámara de cultivo y mantenerlos en presencia de luz continua durante 18-20 días.

4.3.3.2.1. Movimiento del estímulo floral

- 1.- Trasladar 7 contenedores, cada uno de ellos con 6 plántulas intactas de 5 días, a una cámara oscura o a un incubador mantenido a 28°C. El inicio del periodo oscuro es la hora 0.
- 2.- Mantener los contenedores en la oscuridad durante 14, 15, 16, 17, 18, 20 y 24 h según el esquema adjunto (página siguiente). El periodo de oscuridad debe controlarse estrictamente

Contenedor (número)	plantas intactas (número)	oscuridad (horas)
1	6	14
2	6	15
3	6	16
4	6	17
5	6	18
6	6	20
7	6	24

3.- Tras el período de oscuridad correspondiente, cortar inmediatamente los cotiledones y trasladar las plántulas sin cotiledones a la cámara de cultivo. Cultivar las plántulas en luz continua durante 4-5 semanas.

Las plántulas sin cotiledones crecen muy lentamente y deben regarse solo cuando es necesario para no encharcar la raíz.

4.3.3.3. *Determinación de la floración.*

- La floración se determinará por la presencia de yemas florales a los 18-20 días (plantas intactas) o a las 4-5 semanas (plantas sin cotiledones) de mantener las plantas en irradiación continua.

- Observar detalladamente todas las yemas axilares y la yema apical de cada planta.

Las yemas florales en *P. nil* se forman en las axilas de las hojas y después de una inducción óptima, el ápice terminal del brote también se diferencia en yema floral.

Las yemas florales jóvenes se distinguen por la presencia de dos brácteas de color púrpura, mientras que las yemas vegetativas son de un color blanco grisáceo debido a los numerosos tricomas que recubren los primordios foliares. En caso de duda, observar mediante una lupa binocular.

4.4. Resultados

- Determinar para cada planta, intacta o sin cotiledones, los siguientes parámetros y tabular los resultados:

1.- El primer nudo con yema floral contando la primera hoja por encima de los cotiledones como la número 1.

2.- Presencia o ausencia de yema floral terminal.

3.- Número total de yemas florales por planta.

- Representar gráficamente

1.- Para plantas intactas, el valor medio del número de yemas florales/planta respecto a la duración del periodo oscuro.

2.- Para plantas sin cotiledones, el valor medio del número de yemas florales/planta respecto al tiempo de escisión de los cotiledones.

Nota. Después de la inducción óptima, se producen 6-7 yemas florales en cada planta intacta: 3 en las axilas de hojas sucesivas, una terminal y tres en las axilas de las brácteas que se sitúan en un verticilo por debajo de la yema floral terminal. En las plantas sin cotiledones, el número de brácteas con yema floral generalmente se reduce a 1 ó 2 de modo que el número medio de yemas florales por planta es solo de 4 ó 5.

4.4.1. Tablas de resultados - Equipo de trabajo

Tabla .- Determinación de la longitud crítica de la noche.

Horas de oscuridad = 11

Plantas intactas (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Media $\pm$ ES			

Horas de oscuridad = 12

Plantas intactas (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Media $\pm$ ES			

Horas de oscuridad = 13

Plantas intactas (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Media $\pm$ ES			

Horas de oscuridad = 14

Plantas intactas (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Media $\pm$ ES			

Horas de oscuridad = 15

Plantas intactas (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Media $\pm$ ES			

Horas de oscuridad = 16

Plantas intactas (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Media $\pm$ ES			

Horas de oscuridad = 18

Plantas intactas (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Media $\pm$ ES			

Horas de oscuridad = 20

Plantas intactas (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Media $\pm$ ES			

Tabla .- Transporte del estímulo floral.

Horas de oscuridad = 14

Plantas sin cotiledones (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Media $\pm$ ES			

Horas de oscuridad = 15

Plantas sin cotiledones (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Media $\pm$ ES			

Horas de oscuridad = 16

Plantas sin cotiledones (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Media $\pm$ ES			

Horas de oscuridad = 17

Plantas sin cotiledones (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Media $\pm$ ES			

Horas de oscuridad = 18

Plantas sin cotiledones (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Media $\pm$ ES			

Horas de oscuridad = 20

Plantas sin cotiledones (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Media $\pm$ ES			

Horas de oscuridad = 24

Plantas sin cotiledones (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1			
2			
3			
4			
5			
6			
Media $\pm$ ES			

4.4.2. Tablas de resultados generales - Grupo de prácticas

Tabla .- Determinación de la longitud crítica de la noche.

Horas de oscuridad = 11

Equipo trabajo	Plantas intactas (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Media $\pm$ ES				

Horas de oscuridad = 12

Equipo trabajo	Plantas intactas (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Media $\pm$ ES				

Horas de oscuridad = 13

Equipo trabajo	Plantas intactas (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Media $\pm$ ES				

Horas de oscuridad = 14

Equipo trabajo	Plantas intactas (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Media $\pm$ ES				

Horas de oscuridad = 15

Equipo trabajo	Plantas intactas (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Media $\pm$ ES				

Horas de oscuridad = 16

Equipo trabajo	Plantas intactas (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Media $\pm$ ES				

Horas de oscuridad = 18

Equipo trabajo	Plantas intactas (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Media $\pm$ ES				

Horas de oscuridad = 20

Equipo trabajo	Plantas intactas (número)	Primer nudo con yema floral	Yema floral terminal	Yemas florales/planta
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Media $\pm$ ES				

Tabla .- Transporte del estímulo floral.

Horas de oscuridad = 14

Equipo trabajo	Plantas sin cotiledones (número)	Primer nudo con yema floral	Yema Floral terminal	Yemas florales/planta
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Media $\pm$ ES				

Horas de oscuridad = 15

Equipo trabajo	Plantas sin cotiledones (número)	Primer nudo con yema floral	Yema Floral terminal	Yemas florales/planta
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Media $\pm$ ES				

Horas de oscuridad = 16

Equipo trabajo	Plantas sin cotiledones (número)	Primer nudo con yema floral	Yema Floral terminal	Yemas florales/planta
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Media $\pm$ ES				

Horas de oscuridad = 17

Equipo trabajo	Plantas sin cotiledones (número)	Primer nudo con yema floral	Yema Floral terminal	Yemas florales/planta
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Media $\pm$ ES				

Horas de oscuridad = 18

Equipo trabajo	Plantas sin cotiledones (número)	Primer nudo con yema floral	Yema Floral terminal	Yemas florales/planta
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Media $\pm$ ES				

Horas de oscuridad = 20

Equipo trabajo	Plantas sin cotiledones (número)	Primer nudo con yema floral	Yema Floral terminal	Yemas florales/planta
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Media $\pm$ ES				

Horas de oscuridad = 24

Equipo trabajo	Plantas sin cotiledones (número)	Primer nudo con yema floral	Yema Floral terminal	Yemas florales/planta
1				
2				
3				
4				
5				
6				
Media $\pm$ ES				

Bibliografía

Garner, W.W. and Allard, H.A. (1920). Effects of the relative length of the day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J.Agric.Res.* 18: 553-606.

Garner, W.W. and Allard, H.A. (1923). Further studies on photoperiodism, the response of plants to relative length of day and night. *J.Agric.Res.* 23: 871-920.

Hillman, W.S. (1969). Photoperiodism and vernalization. En: *The Physiology of Plant Growth and Development*. Wilkins, M.B. (ed.) McGraw-Hill, New York, London, pp: 559-601.

Lumsden, P.J. (1998). Photoperiodic induction in short-day plants. En: *Biological rhythms and photoperiodism in Plants*. Lumsden, P.J. y Millar, A.J. (eds.) BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, pp: 167-181.

Thomas, B. (1998). Photoperiodism: An Overview. En: *Biological rhythms and photoperiodism in Plants*. Lumsden, P.J. y Millar, A.J. (eds.) BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, pp: 151-165.

Anexo 4.1. Especies vegetales con requerimientos específicos para florecer

Plantas con requerimiento absoluto de día corto para florecer	Plantas con requerimiento cuantitativo de día corto para florecer
<i>Amaranthus caudatus</i> <i>Bryophyllum pinnatum</i> <i>Cattleya trianae</i> <i>Chenopodium album</i> * <i>Chrysanthemum indicum</i> <i>Chrysanthemum morifolium</i> ** <i>Coffea arabica</i> <i>Euphorbia pulcherrima</i> * <i>Glycine max</i> cv Biloxi <i>Ipomea batatas</i> <i>Impatiens balsamina</i> <i>Kalanchoe blosfeldiana</i> <i>Lemna perpusilla</i> 6746 <i>Nicotiana tabacum</i> cv Maryland <i>Mammoth</i> * <i>Oryza sativa</i> <i>Pharbitis nil</i> * <i>Salvia splendens</i> * <i>Xanthium strumarium</i> <i>Zea mays</i>	<i>Allium cepa</i> ** <i>Amaranthus graecizans</i> <i>Andropogon virginicus</i> <i>Cannabis sativa</i> cv Kentucky <i>Capsicum frutescens</i> <i>Chenopodium rubrum</i> <i>Chrysanthemum morifolium</i> ** <i>Datura stramonium</i> <i>Glycine max</i> cv Mandell <i>Gossypium hirsutum</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Helianthus tuberosus</i> <i>Ipomea batatas</i> <i>Malva verticillata</i> * <i>Oryza sativa</i> <i>Salvia splendens</i> * <i>Senecio cruentus</i> <i>Solanum tuberosum</i> <i>Zinnia x hybrida</i>

(*) a temperatura alta

(**) con requerimiento absoluto o cuantitativo de vernalización

Plantas con requerimiento absoluto de día largo para florecer

Agropyrum smithii
Agrostis palustris
Anagallis arvensis
Anethum graveolens
Arabidopsis thaliana
Avena sativa (cepas de primavera)
Chrysanthemum maximum
Dianthus superbus
Festuca elatior
Fuchsia hybrida cv Lord Byron
Hybiscus syriacus
Hyoscyamus niger (cepas anuales)
Lemna gibba G3
Lolium italicum
Lolium temulentum cv Ceres
Melilotus alba
Mentha piperita cv vulgaris
Nicotiana sylvestris
Oenothera acaulis
Phalaris arundinacea
Phleum pratense
Phlox paniculata
Raphanus sativus
Rudbeckia hirta
Scabiosa ukrainica
Sedum spectabile
Sinapis alba
Spinacea oleracea
Trifolium pratense
 cv English Montgomery

Con requerimiento adicional absoluto o cuantitativo de vernalización

Beta sacharifera
Beta vulgaris
Hordeum vulgare (cepas de invierno)
Hyoscyamus niger (cepas bienales)
Lolium perenne
Medicago minima
Oenothera biennis
Saxifraga hypnoides
Spinacea oleracea
Triticum aestivum (cepas de invierno)

Plantas con requerimiento cuantitativo de día largo para florecer

Brassica campestris
Brassica rapa
Camellia japonica
Dianthus caryophyllus
Hordeum vulgare (cepas de primavera)
Lolium temulentum cv Ba 3081
Nicotiana tabacum cv Havana
Nigella arvensis
Oenothera rosea
Scrophularia arguta
Secale cereale (cepas de primavera)
Solanum tuberosum
Sonchus oleraceus
Trifolium pratense cv American Medium
Triticum aestivum (cepas de primavera)

Con requerimiento adicional, absoluto o cuantitativo, de vernalización

Agrostema githago
Arenaria serpyllifolia
Campanula persicifolia
Campanula primulifolia
Cheiranthus cheiri
Chicoria endivia
Dianthus caryophyllus
Digitalis purpurea
Iberis intermedia
Lactuca sativa
Leucanthemum cobennense
Lychnis coronaria
Myosotis hispida
Pisum sativum (cepas de floración tardía)
Scabiosa canescens
Secale cereale (cepas de invierno)
Sinapis alba
Teucrium scorodonia
Triticum aestivum (cepas de invierno)

CAPITULO 5. MICROPROPAGACION DE VIOLETAS AFRICANAS

5.1. Introducción

El término **cultivo *in vitro* de tejidos vegetales** se utiliza para describir el cultivo de plantas o de fragmentos de plantas en condiciones asépticas, en un medio nutritivo de composición química determinada y en un ambiente físico perfectamente controlado.

La introducción *in vitro* de una especie vegetal se efectúa a partir de un fragmento de una planta. Estos fragmentos se denominan genéricamente **explantos** y sus características pueden ser muy diversas: microesquejes, fragmentos de órganos, ápices caulinares, células somáticas, granos de polen, protoplastos, etc. Aún cuando la totipotencia es una característica universal de todas las células vegetales y es la base de la tecnología del cultivo *in vitro*, debe considerarse que su expresión puede estar limitada por causas genéticas, epigenéticas y fisiológicas (Vasil and Thorpe, 1994). Por ello, las características del explanto y su orientación respecto al medio de cultivo son factores determinantes del éxito de un cultivo *in vitro*.

La **asepsia** es un aspecto clave del cultivo *in vitro*. Las plantas, en su ambiente natural, son hábitat de numerosos microorganismos. Las células vegetales y los microorganismos tienen requerimientos nutritivos básicos similares; sin embargo, las bacterias y los hongos crecen mucho más rápidamente. Para evitar que los microorganismos invadan el medio nutritivo, tanto el material vegetal, como los medios nutritivos, el material de vidrio y otros utensilios (pinzas, bisturíes, superficies de trabajo) deben **esterilizarse** antes de su uso. Además, puesto que el aire transporta esporas de microorganismos contaminantes, todas las manipulaciones deben efectuarse en un ambiente aséptico y trabajar en cabinas de flujo laminar. En estas cabinas, el aire circula a través de un filtro que retiene los posibles contaminantes y llega estéril a la zona de trabajo. El flujo continuo de aire en la zona de trabajo permite trabajar de forma continua en condiciones de esterilidad. Estas cabinas pueden llevar incorporadas lámparas germicidas (UV).

Los **medios nutritivos** constan de sales minerales (macronutrientes y micronutrientes), vitaminas, aminoácidos, compuestos **reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal**, azúcares (generalmente sacarosa) y agentes gelificantes (agar, alginato, gelrite, etc.). Opcionalmente pueden añadirse antibióticos; sin embargo, es mejor evitarlo porque pueden afectar el desarrollo *in vitro*. Los medios de Murashige y Skoog (1962), Gamborg et al. (1968) y Schenk y Hildebrand (1972) se consideran standards en cuanto a composición de macro y micronutrientes y se usan ampliamente con material experimental nuevo. La especie vegetal determinará la elección del medio basal (macro y micronutrientes) pero el objetivo del trabajo (por ejemplo: producción de callos, regeneración de plantas, embriogénesis somática, etc.) determinará los componentes adicionales, especialmente de tipo hormonal (Krikorian, 1995). En general, las auxinas y las citoquininas son las hormonas más usadas y la relación auxinas/citoquininas regula el patrón de morfogénesis *in vitro*. Sin embargo, en ciertas especies y en casos concretos, también se usan giberelinas y ácido abscísico.

Es evidente que las hormonas tienen un papel primordial en la manipulación del desarrollo *in vitro* pero la respuesta también depende de su interacción con factores ambientales. La temperatura, humedad, ambiente gaseoso, y la cantidad, calidad y duración de la irradiación son parámetros ambientales claves en el cultivo *in vitro*.

El cultivo *in vitro* es una herramienta básica en la investigación fundamental y aplicada. Entre sus numerosas aplicaciones destaca la **micropropagación** (Tabla 5.1) de plantas salvajes o de plantas modificadas genéticamente ya sea de especies de interés agrícola, hortícola o forestal.

La **micropropagación**, es decir, la multiplicación de plantas *in vitro*, se introdujo para facilitar la **propagación clonal**. Este tipo de reproducción asexual genera individuos idénticos a la planta progenitora, es decir, son miembros de un mismo clon. La propagación clonal es ventajosa, especialmente en híbridos, ya que permite conservar caracteres deseables que se perderían a través de la reproducción sexual. Se usa satisfactoriamente en violetas africanas.

Tabla 5.1.- Algunas estrategias de multiplicación de plantas superiores *in vitro*

-
- Organogénesis directa (sin la intervención de callos)
formación de brotes y/o raíces adventicias en un explanto
 - Organogénesis indirecta
formación de brotes y/o raíces adventicias en un callo.
 - Embriogénesis somática
formación directa de embriones en el explanto.
formación indirecta a partir de callos o suspensiones celulares.
 - Formación de brotes a partir de
yemas
meristemos apicales (sin primordios foliares)
ápices de brotes (con primordios foliares)
nudos
 - Regeneración de plantas a partir de órganos perennes formados *in vitro*
tubérculos, bulbillos, protocormos
 - Cultivo de óvulos
 - Rescate de embriones.
 - Cultivo de anteras y microsporas.
-

adaptado de Krikorian (1995).

La micropropagación vía **organogénesis** procede a través de la formación de una estructura unipolar, principalmente un primordio del brote o de la raíz, cuyo sistema vascular está conectado con el del tejido parental. La organogénesis puede darse **directa** o **indirectamente**. A través de la vía directa, las plantas se regeneran directamente sobre el explanto. En cambio, por la vía indirecta, las plantas se forman a partir de callos, agregados de células desorganizadas y escasamente diferenciadas que se dividen continuamente. El **cultivo de callos** tiene un grado inherente de heterogeneidad y es fuente de **variabilidad genética** incontrolada y aleatoria (variación somaclonal). El continuado subcultivo de callos da lugar a pérdida de potencial morfogénico.

La micropropagación vía organogénesis consta de varias fases (Werbrouck y Debergh, 1994) cada una de las cuales tiene unos requerimientos específicos en cuanto a composición del medio nutritivo y ambiente.

La etapa preparativa (etapa 0) incluye la selección del material vegetal donante de explantos y su cultivo con el fin de obtener plantas sanas y en estado fisiológico óptimo para introducirlas *in vitro*.

La etapa inicial (I) incluye la **iniciación y establecimiento del cultivo**. Requiere la selección del explanto, su desinfección y cultivo en un medio de iniciación y en determinadas condiciones ambientales.

En la etapa (II) de **multiplicación**, las citoquininas *per se* o con las auxinas inducen la formación y brotación de yemas adventicias y el desarrollo de yemas axilares. Una elevada relación citoquininas/auxinas estimula la formación del brote y una elevada relación auxinas/citoquininas favorece la diferenciación de raíces. Esto no implica que para la formación de brotes adventicios o la ramificación axilar ambas hormonas deban encontrarse en el medio. Los requerimientos exógenos de hormonas dependen de los niveles endógenos en la planta. En ciertos casos, la adición de **citoquininas** al medio de cultivo estimula la multiplicación (brotación de yemas axilares y adventicias). Aproximadamente, a las 4-8 semanas, el explanto original genera numerosos brotes. Estos diminutos brotes pueden aislarse de forma individual o en pequeños grupos y transferirse a un medio de multiplicación fresco. De este modo se inicia otro ciclo de multiplicación y, en un período de tiempo relativamente corto, pueden obtenerse un número muy elevado de brotes.

La etapa (III) de **enraizamiento** de los brotes axilares y adventicios requiere, normalmente, alterar la composición hormonal del medio y elevar el contenido de **auxinas**. En algunos casos el enraizamiento se induce *ex vitro*.

La **aclimatación** (etapa IV) consiste en la adaptación de las plantitas a un ambiente *ex vitro* de condiciones cambiantes.

Las técnicas de micropropagación tienen numerosas ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación clonal. La propagación en condiciones asépticas genera plantas sanas, libres de microorganismos. La tasa de multiplicación es exponencial y se obtienen gran número de plantas en un espacio muy reducido. Además, induce el rejuvenecimiento de las plantas y la producción se mantiene a lo largo de todo el año. No obstante, si el objetivo final de la micropropagación es la obtención de clones, debe evitarse la regeneración a partir de callos debido a la inestabilidad genética de este cultivo.

5.2. Objetivos

El **objetivo** de esta práctica es la **micropropagación *in vitro* de violetas africanas** (híbridos de *Saintpaulia ionantha*) a partir de fragmentos de hojas. *Saintpaulia* es, sin duda, uno de los géneros más empleados en floricultura. Existen gran cantidad de variedades con flores de distintos colores (rosado, morado, blanco,...). Son plantas herbáceas y las hojas, con un pecíolo largo y de un color verde intenso y brillante, se disponen horizontalmente. Las *Saintpaulia* tienen una elevada capacidad de regeneración y, por ello, son adecuadas para estudios de micropropagación.

5.3. Material y métodos

5.3.1. Material vegetal

Plantas sanas de *Saintpaulia ionantha*

5.3.2. Material y equipamientos

5.3.2.1. Reactivos:

Solución stock de macronutrientes (x10) Murashige y Skoog (1962)
Solución stock de micronutrientes (x100) Murashige y Skoog (1962)
Solución stock de FeNa-EDTA (x10)
Solución stock de vitaminas y aminoácidos (x100)
Acido indolbutírico (IBA, 1 mg/ml) (x100)
Benziladenina (BA, 0,3 mg/ml) (x10)
Agar
Sacarosa
KOH 0,1 M
Solución desinfectante recién preparada (lejía comercial 30% con gotas de Tween 20)
Tween 20
Etanol 70% y 99%
Agua destilada

5.3.2.2. Material fungible:

Material a esterilizar (para cada equipo de trabajo):

2-4 pinzas de metal punta roma (tamaño pequeño y grande)
2-4 bisturíes
4 botes de cultivo de 350-500 ml (con 75-100 ml de medio nutritivo)
4 frascos 750-1000 ml (con agua destilada)
1 paquete Kleenex
8-10 hojas de papel (cuartillas = ½ DIN A4)

Material para preparar el medio de micropropagación:

1 botella Pyrex, erlenmeyer o vaso precipitados de 1 l.
3-4 probetas de 100 ml.
Pipetas de 1 y 10 ml.
1 matraz aforado de 1 l.
1 embudo.
1 varilla magnética.

Otro material:

1 vaso precipitados 1 l (con solución desinfectante)
1 frasco pulverizador con etanol 70%
Papel de aluminio
Film de plástico
1 rotulador
Cinta autoclave
Bolsas autoclave
Dosificador regulable de 50 ml

5.3.2.3. Equipamiento

Agitador magnético
 Autoclave
 Balanzas
 Baño termostático
 Bunsens de alcohol o de gas.
 Cabina de flujo laminar
 Microondas
 pHmetro
 Cámara de cultivo - condiciones controladas

5.3.3 Metodología

5.3.3.1. Preparación del medio de micropropagación. Esterilización

Preparar 1 litro de medio de propagación (ver composición en tabla 1, anexo 5.1).

- Partir de soluciones stock (ver composición en tabla 2, anexo 5.1) y proceder según la tabla adjunta. Puede usarse una botella Pyrex. Debe mantenerse la agitación.

Componente	volumen (ml)
agua destilada	± 100
stock macronutrientes (x10)	100
stock micronutrientes (x100)	10
stock FeNa-EDTA (x10)	100
vitaminas/aminoácidos (x100)	10
stock IBA (1mg/ml)	1
stock BA (0,3 mg/ml)	10

- Añadir 20 g de sacarosa (sólida) y continuar agitando hasta su total disolución.
- Enrasar a ≈ 950 ml con agua destilada y ajustar el pH aproximadamente a 5,5.
- Transferir el medio a un matraz aforado y enrasar a 1 l.
- Transferir, de nuevo, el medio a la botella Pyrex. Añadir 6-8 g de agar. Agitar ligeramente y disolverlo perfectamente usando un microondas.
- Mantener el medio líquido en un baño maría (≈ 50°C) y mediante un dosificador repartir 75-100 ml por frasco de cultivo.
- Precintar los frascos con film de plástico, marcarlos con la cinta de autoclave, etiquetarlos y esterilizarlos en el autoclave (20 min. a 121°C).

5.3.3.2. Preparación y esterilización del resto del instrumental.

Antes de iniciar la obtención y desinfección de los explantos cada equipo debe preparar y esterilizar en el autoclave (20 min. a 121°C) el siguiente material:

- 1 paquete con 10-12 hojas de papel (envolver con papel de aluminio),
- 1 paquete de Kleenex (envolver con papel de aluminio),
- las pinzas y los bisturís envueltos individualmente con papel corriente,
- 4 botes con agua destilada. Precintar los frascos con film de plástico.

* Marcar todo el material con la cinta de autoclave antes de esterilizar con el fin de verificar una correcta esterilización.

Importante: Durante la obtención y esterilización de los explantos e iniciación del cultivo, se debe:

- esterilizar las pinzas y los bisturíes sumergiéndolos en etanol 99% y flameándolos. Después de flamearlos y antes de usarlos, dejarlos enfriar sobre un soporte (por ejemplo, puede usarse una gradilla). Conservar el material estéril, evitando que los extremos de las pinzas y los bisturíes contacten con el soporte.
- flamear la boca y tapadera de los recipientes estériles (con medio nutritivo o agua) antes de abrirlos y de cerrarlos.

5.3.3.3. Obtención de los explantos: desinfección e iniciación del cultivo

1.- Cortar 4-5 hojas jóvenes y limpias de una planta sana de *Saintpaulia*. Seleccionar hojas del mismo tamaño y estado de desarrollo. Lavarlas cuidadosamente con agua corriente.

2.- Desinfección del material vegetal.

Sumergir una hoja en etanol 70% durante 30 segundos (sujetarla, mediante unas pinzas, por el pecíolo). Tras eliminar el exceso del alcohol, sumergir la hoja durante 10 min. en lejía 30% (a la que se habrán adicionado unas gotas de Tween 20). Repetir esta operación con las hojas restantes. Durante la desinfección, agitar suavemente (aproximadamente cada 2 minutos) para asegurar la desinfección de la superficie de las hojas.

3.- Lavar en agua destilada estéril (4 x 5 minutos) para eliminar el exceso de desinfectante. Mediante unas pinzas estériles traspasar las hojas a un frasco que contenga agua destilada estéril. Mantenerlas sumergidas durante 5 min., agitando suavemente cada 2 minutos. Repetir esta operación 3-4 veces.

4.- Obtención de los explantos (ver Fig. 5.1).

Colocar una hoja desinfectada, sujetandola por el pecíolo con unas pinzas estériles, sobre una hoja de papel estéril. No dañar el limbo foliar (Fig. 5.1A).

Mediante un bisturí estéril eliminar los márgenes laterales (Fig.5.1B) y el ápice de la hoja. Conservar el nervio central y la parte del limbo que lo rodea. Efectuar cortes limpios sin desgarrar el material vegetal. Fragmentar la parte de la hoja conservada en cuadrados de aproximadamente 1 cm de lado (Fig.5.1C). Cada cuadrado debe incluir el nervio central y parte del limbo. Realizar esta operación con sumo cuidado evitando alterar la posición de los explantos.

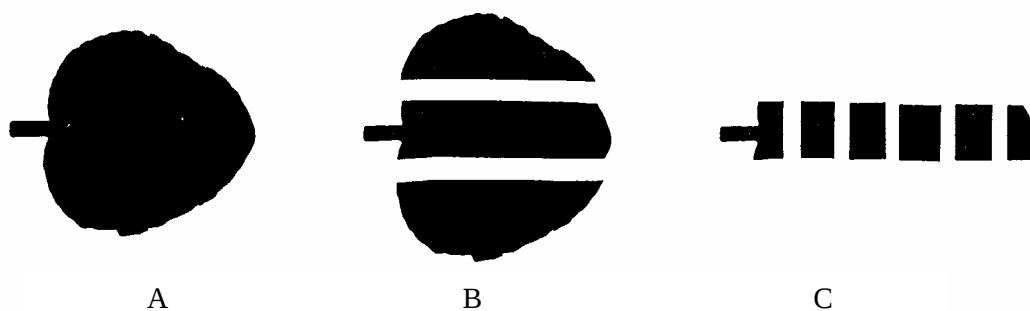


Fig. 5.1.- Representación esquemática de la obtención de explantos de *Saintpaulia*

5.- Iniciación del cultivo.

Mediante unas pinzas y cuidadosamente para no dañar el material, transferir cada uno de los explantos a un frasco con medio de micropropagación. La parte basal de cada explanto (es decir, el lado del cuadrado más próximo al pecíolo) debe introducirse ligeramente en el medio.

Colocar 10-15 explantos en cada frasco de cultivo. Para evitar contaminación, flamear la boca del vaso y su tapa antes de abrirlo y cerrarlo.

Para evitar que el material se deshidrate no acumular explantos sobre la hoja de papel estéril. A medida que se obtienen los explantos, éstos deben transferirse al recipiente con medio de propagación.

Finalmente, precintar el bote de cultivo con film de plástico, etiquetarlo y dejarlo en la cámara de ambiente controlado (ciclos de 16 h luz blanca / 8 h oscuridad, 25°C).

Las etapas 1 y 2 pueden realizarse en el laboratorio (ambiente no estéril) manteniendo la superficie de trabajo perfectamente limpia. A partir de la etapa 3 conviene trabajar en un ambiente estéril, a ser posible en cabina de flujo laminar. Conectar la cámara 30 minutos antes de su uso.

5.4. Resultados

- Examinar los cultivos regularmente (cada semana) para observar el desarrollo de callos en los bordes de los explantos. A las 6 semanas pueden observarse brotes adventicios desarrollados a partir del limbo foliar.

Bibliografía

- Gamborg, O.L., Miller, R.A.; Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp.Cell.Res.* 550: 151-158.
- Hall, RD. (1999). An introduction to plant-cell culture: pointers to success. En: *Plant cell culture protocols*. Humana Press Inc. 1-18.
- Krikorian AD (1995). Hormones in Tissue Culture and Micropropagation. En: *Plant Hormones*. Davies, P.J. (ed.). Kluwer Academic Pub. Netherlands.pág: 774-796.
- Murashige T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Schenk, R.U.; Hildebrand A.C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J. Bot* 50: 199-204.
- Vasil, IK, Torphe, TA. (1994). *Plant cell and tissue culture*. Kluwer Acad. Pub. London.
- Werbrouck, S.P.O., Debergh, P.C. (1994). Applied aspects of plant regeneration. Micropropagation. En: *Plant Cell Culture. A Practical approach*. Rickwood, D.; Hames, B.D. (eds.). Oxford University Press. New York.

Anexo 5.1

Tabla 1.- Composición del medio de micropropagación de violetas africanas (Murashige y Skoog, 1962)

Componentes	Concentración
Macronutrientes (g/l)	
KNO ₃	1,9
NH ₄ NO ₃	1,650
MgSO ₄ .2H ₂ O	0,37
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,44
KH ₂ PO ₄	0,17
Micronutrientes (mg/l)	
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
FeNa.EDTA (g/l)	0,0403
Vitaminas / Aminoácidos (mg/l)	
mio-inositol	100
ácido nicotínico	5
tiamina.HCl (B ₁)	5
piridoxina (B ₆)	5
glicina	2
Acido Indolbutírico (mg/l)	1
Benziladenina (mg/l)	3
Sacarosa	20 g
Agar	6-8 g

Tabla 2.- Composición y preparación de soluciones stock de medio de micropropagación de violetas africanas (Murashige y Skoog (1962))

Componente	Concentración solución stock	Volumen de stock por litro de medio	Conservación
Macronutrientes (x10)		100ml	+ 4°C
KNO ₃	19,00 g/l		
NH ₄ NO ₃	16,50 g/l		
MgSO ₄ .2H ₂ O	3,70 g/l		
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,40 g/l		
KH ₂ PO ₄	1,70 g/l		
Micronutrientes (x100)		10 ml	+ 4°C
H ₃ BO ₃	620 mg/l		
MnSO ₄ . 4H ₂ O	2230 mg/l		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860 mg/l		
KI	83 mg/l		
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25 mg/l		
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5 mg/l		
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5 mg/l		
FeNa.EDTA (x10)	0,403 g/l	100 ml	+ 4°C
Vitaminas/aminoácidos (x 100)		10 ml	- 20°C (en alícuotas de 10 ml)
mio-inositol	10000 mg/l		
ácido nicotínico	500 mg/l		
tiamina.HCl (B ₁)	500 mg/l		
piridoxina (B ₆)	500 mg/l		
glicina	200 mg/l		
Acido Indolbutírico (x100)	1 mg/ml	1 ml	+ 4°C
Benziladenina (x 100)	0,3 mg/ml	10 ml	+ 4°C

Preparación solución stock de **ácido indolbutírico (IBA)** (1mg/ml)

- Disolver 100 mg de IBA en 1 ml NaOH 1N.
- Añadir, muy lentamente, agua destilada hasta 100 ml.

Preparación solución stock de **benciladenina (BA)** (0,3 mg/l)

- Disolver 30 mg de BA en 1 ml NaOH 1N.
- Añadir, poco a poco, agua destilada hasta 100 ml.

CAPITULO 6. PROPAGACIÓN CLONAL DE ORQUIDEAS

6.1 Introducción

Morel y Martin (1952) fueron pioneros en la obtención de plantas (*Dahlia*) libres de virus a partir del **cultivo de meristemos**, es decir, a partir de explantos constituidos por el meristemo apical y dos-tres incipientes primordios foliares. Estos explantos son muy diminutos (longitud inferior a 1 mm) y es poco probable que contengan virus, bacterias u otros patógenos que pueden encontrarse, en forma activa o en estado latente, en el resto de la planta. La causa de la escasez de virus en los meristemos ha sido muy debatida, barajándose distintas hipótesis como la ausencia de tejidos vasculares, la presencia de inhibidores víricos o la elevada concentración de hormonas (auxinas y citoquininas) en los tejidos meristemáticos.

El éxito del cultivo de meristemos, en cuanto a producción de plantas libres de virus, depende del tamaño del explanto (Grout, 1999). Las nuevas plantas sólo están libres de virus si se usan explantos meristemáticos de aproximadamente 1 mm, (con dos primordios foliares como máximo) y no se pasa por una etapa de callo. Explantos de mayor tamaño, formados por el ápice y la región subapical del brote (1-5 mm), son más fáciles de obtener y manipular, tienen más posibilidad de supervivencia y más capacidad de regeneración pero no aseguran plantas libres de virus. Actualmente el cultivo de meristemos *per se* o con tratamientos de termoterapia, quimioterapia y/o crioterapia se usa para **eliminar virus** de muchas especies de interés comercial (Nehra y Kartha, 1994).

Otra ventaja del cultivo de meristemos es la estabilidad genética del material. Los brotes se regeneran directamente a partir del meristemo, sin pasar por una etapa de callo. Por ello, esta técnica también se usa para la **propagación clonal** masiva de muchas especies vegetales. Morel (1960) aplicó esta técnica para la propagación clonal de orquídeas, en concreto de *Cymbidium*, género pseudobulboso que se cultiva por sus espléndidas flores de excepcional duración. A partir de ápices de brotes se formaban unas masas tisulares, **cuerpos protocórmicos**, que por la forma y características eran similares a un embrión en las etapas iniciales de su desarrollo. Estos protocormos proliferaban y se diferenciaban dando nuevos vástagos con hojas y raíces. Alternativamente, los protocormos podían dividirse de forma espontánea o manual en 6-8 fragmentos, cada uno de los cuales podía generar un nuevo vástago o dividirse. Por repetición de este proceso fué posible conseguir millares de plantas idénticas a partir de un solo meristemo. Posteriormente esta tecnología se ha aplicado con éxito en otros géneros como *Cattleya*, *Dendrobion*, *Miltonia* y *Odontonia* y ha permitido la transformación del cultivo artesanal de algunas orquídeas en una auténtica producción industrial de plantas idénticas (clones).

La familia Orchidaceas agrupa más de 450 géneros y 15.000 especies que se usan tanto para el cultivo en maceta como para la obtención de flor cortada. Por cruzamiento de diferentes géneros y especies se han producido muchos híbridos, a menudo, de calidad muy superior a las especies naturales de las que provienen. También se han obtenido variedades en miniatura. A través del cultivo tradicional, tanto las especies naturales como los híbridos, pueden propagarse por semillas o de forma vegetativa.

Sin embargo, ya que son plantas altamente heterocigóticas sólo la propagación vegetativa produce plantas idénticas. La propagación convencional vegetativa es extremadamente lenta. La reproducción sexual da lugar a una descendencia muy heterogénea y distinta del material inicial.

En la actualidad, las orquídeas se producen *in vitro* a partir de semillas o por micropropagación. La obtención de orquídeas a partir de semillas germinadas *in vitro* fue introducida por Knudson (1925) y se usa de forma rutinaria en muchas orquídeas tropicales y subtropicales. La propagación clonal está ampliamente extendida entre las orquídeas monopodiales y simpodiales (Tabla 6.1). Las monopodiales poseen un solo eje de crecimiento indeterminado y no ramificado con unos pocos brotes axilares. Las simpodiales se caracterizan por un rizoma multiramificado que puede suministrar numerosos brotes. La mayoría de las orquídeas epífitas han transformado sus tallos en órganos de reserva de tal forma que presentan un abultamiento parecido a un bulbo, de ahí el nombre de pseudobulbos. El crecimiento de cada brote es determinado, cesa después de una o más raramente dos estaciones.

Tabla 6.1.- Algunos géneros de orquídeas monopodiales y simpodiales

Monopodiales		
<i>Aerides</i>	<i>Cyrtorchys</i>	<i>Renanthera</i>
<i>Aerangis</i>	<i>Doritis</i>	<i>Rhynchostylis</i>
<i>Angraecum</i>	<i>Neofinetia</i>	<i>Vanda</i>
<i>Ascocentrum</i>	<i>Phalaenopsis</i>	<i>Vandopsis</i>
Simpodiales		
<i>Brassavola</i>	<i>Cymbidium</i>	<i>Masdevalia</i>
<i>Brassia</i>	<i>Dendrobium</i>	<i>Miltonia</i>
<i>Broughtonia</i>	<i>Encyclia</i>	<i>Odontoglossum</i>
<i>Cattleya</i>	<i>Epidendrum</i>	<i>Oncidium</i>
<i>Cochlioda</i>	<i>Laelia</i>	<i>Sophronitis</i>

Tanto en las monopodiales como en las simpodiales la micropropagación se inicia a partir de distintos explantos – brotes vegetativos, hojas, inflorescencias y ápices de raíces y brotes – que se cultivan en medios de composición relativamente simple suplementados con homogenado de plátano o leche de coco. La micropropagación puede darse por organogénesis o por embriogénesis, directa o indirectamente a través de la formación de callos y unas estructuras similares a protocormos (Tisserat y Jones, 1999). Generalmente la propagación vía callo es más rápida pero conlleva la introducción de variabilidad genética. Se observa diversidad de respuestas dependiendo del genotipo, género y especie.

La propagación de orquídeas por cultivo de meristemos comprende tres fases: a) transformación del meristemo en cuerpo protocormico; b) multiplicación de los protocormos por fragmentación; c) conversión de los protocormos en vástagos con raíces capaces de aclimatarse a un cultivo *ex vitro*.

En el caso de *Cymbidium*, orquídeas epífitas provistas de pseudobulbos que crecen normalmente en simbiosis con un hongo, explantos de meristemos florales y protocormos pueden cultivarse *in vitro* en un medio con vitaminas B. Se acepta que estas vitaminas sustituyen el aporte de nutrientes del hongo simbiótico. Los cultivos de varias especies de *Cymbidium* se inician a partir de la yema principal o de las yemas laterales de los llamados “pseudobulbos” que se forman en la base del brote de plantas adultas. Durante el cultivo, estos meristemos proliferan pasan por una secuencia de acontecimientos similares a los que experimenta un embrión de orquídea durante la germinación. Puede distinguirse claramente el

estado de protocormo y el desarrollo de la plántula. Los protocormos y, en menor grado, los brotes muy jóvenes de *Cymbidium* poseen un alto potencial de regeneración y constituyen un material adecuado para las técnicas convencionales de micropropagación *in vitro*. Si estas estructuras se subdividen, cada fragmento reiniciará el proceso, pasando por las etapas de protocormo y formación de brote. Con estas técnicas de micropropagación, usando protocormos o meristemos, pueden obtenerse con mucha rapidez grandes cantidades de material híbrido genéticamente homogéneo. Además, generalmente, se obtienen plantas libres de virus.

6.2. Objetivos

El objetivo de esta práctica es la obtención de plantas de *Cymbidium*, libres de virus, a partir del cultivo de yemas axilares de **pseudobulbos** de plantas adultas. Se utilizará el mismo medio de nutritivo para el cultivo de los meristemos, la proliferación y el desarrollo de los cuerpos protocórmicos.

6.3. Material y métodos

6.3.1. Material vegetal

Plantas de *Cymbidium* con pseudobulbos jóvenes.
Cada equipo de trabajo precisa, como mínimo, un pseudobulbo.

6.3.2. Material y equipamientos

6.3.2.1. Reactivos:

Solución stock de macronutrientes (x10) Murashige y Skoog (1962)
Solución stock de micronutrientes (x100) Murashige y Skoog (1962)
Solución stock de FeNa-EDTA (x10)
Solución stock de vitaminas y aminoácidos (x100)
Agar
Sacarosa
KOH 0,1 M
Solución desinfectante recién preparada
(lejía comercial 30% con una gota de Tween 20)
Etanol 70% y 99%

6.3.2.2. Material fungible:

Material a esterilizar (para cada equipo de trabajo):
2-4 pinzas de metal punta roma (tamaño pequeño y grande)
2-4 bisturíes
8-10 tubos de cultivo Pyrex (15x2,5 cm) con 10-15 ml de medio nutritivo
6-10 cápsulas de Petri (9 cm diámetro)
4 frascos de 500ml (con $\approx$ 300 ml agua destilada)

Material para preparar el medio de micropropagación:
1 botella Pyrex, erlenmeyer o vaso precipitados de 1 l.
3-4 probetas de 100 ml.
Pipetas de 1 y 10 ml.

- 1 matraz aforado de 1l.
- 1 embudo.
- 1 varilla magnética.

Otro material:

- 2-3 cápsulas de Petri
- 1 vaso precipitados 1l (con solución desinfectante recién preparada)
- 1 frasco pulverizador con etanol 70%
- 1 bote con etanol 99% (esterilizar pinzas y bisturíes)
- Papel de aluminio
- Film de plástico
- 1 rotulador resistente al agua
- Cinta autoclave
- Bolsas autoclave
- Dosificador regulable 1-25 ml

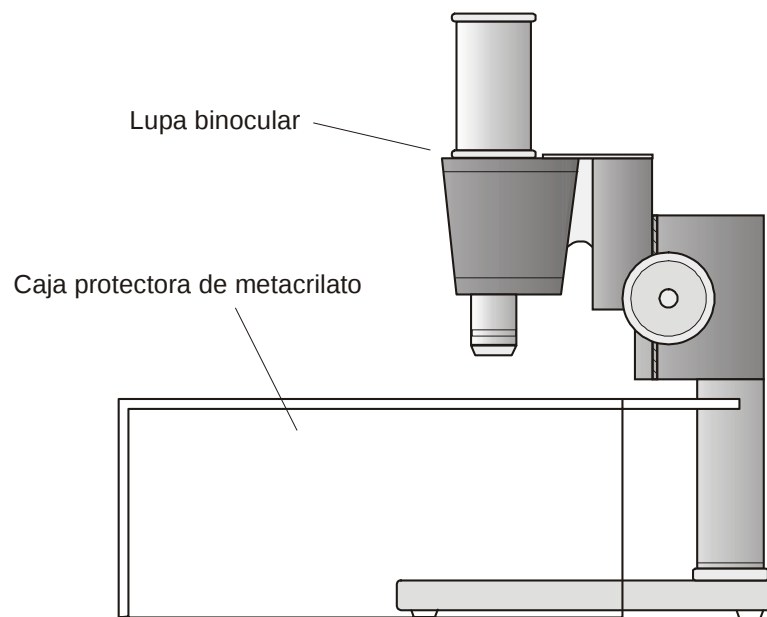


Fig. 6.1. Lupa binocular con caja protectora de metacrilato transparente para evitar en lo posible la contaminación ambiental.

6.3.2.3. Equipamiento

Agitador magnético
 Autoclave
 Balanzas
 Baño termostático
 Bunsen de alcohol o de gas
 Cabina de flujo laminar
 Lupa binocular con una caja de plexiglas acoplada (ver Fig. 6.1)
 Microondas
 pHmetro
 Cámara de cultivo - condiciones controladas

6.3.3. Metodología

6.3.3.1. Preparación del medio de cultivo. Esterilización.

Preparar 1 litro de medio de propagación (ver composición en tabla 1, anexo 6.1).

- Partir de soluciones stock (ver composición en tabla 2, anexo 6.1) y proceder según la tabla adjunta. Puede usarse una botella Pyrex. Debe mantenerse la agitación.

Componente	volumen (ml)
agua destilada	± 100
stock macronutrientes (x10)	100
stock micronutrientes (x100)	10
stock FeNa-EDTA (x10)	100
vitaminas/aminoácidos (x100)	10

- Añadir 20 g de sacarosa (sólida) y continuar agitando hasta su total disolución.
- Enrasar a ≈ 950 ml con agua destilada y ajustar el pH aproximadamente a 5,8
- Transferir el medio a un matraz aforado y enrasar a 1 l.
- Transferir, de nuevo, el medio a la botella Pyrex. Añadir 6-8 g de agar. Agitar ligeramente y disolverlo perfectamente usando un microondas.
- Mantener el medio líquido en un baño maría ($\approx 50^{\circ}\text{C}$) y mediante un dosificador repartir 10-15 ml/tubo de cultivo. Dejar los tubos en una gradilla.
- Precintar la gradilla con los tubos de cultivo con film de plástico, marcar con la cinta de autoclave, etiquetar y esterilizar en el autoclave (20 minutos a 121°C).

6.3.3.2. Preparación y esterilización del resto del instrumental.

Antes de iniciar la obtención y esterilización de los explantos cada equipo debe preparar y esterilizar en el autoclave (20 minutos a 121°C) el siguiente material:

- las pinzas y los bisturís envueltos, de forma individual, con papel
- 3 botes de 500 ml con aproximadamente 300 ml de agua destilada. Precintar los frascos con film de plástico.
- Si procede, cápsulas de Petri (pueden usarse cápsulas de Petri de plástico ya estériles)

* Marcar todo el material con la cinta de autoclave antes de esterilizar con el fin de verificar una correcta esterilización.

Importante:

Durante la obtención y desinfección de los explantos e iniciación del cultivo, se debe:

- a) esterilizar las pinzas y los bisturíes sumergiéndolos en etanol 99% y flameándolos. Antes de usar este material dejarlo enfriar sobre un soporte (por ejemplo, puede usarse una gradilla). Conservar el material estéril, evitando que los extremos de las pinzas y los bisturíes contacten con el soporte.
- b) flamear la boca y los tapones de los recipientes estériles (tubos de cultivo con medio nutritivo y botes con agua) antes de abrirlos y de cerrarlos.
- c) Limpiar exhaustivamente, antes de su uso, la lupa binocular y la caja de plexiglas con etanol 70% .

6.3.3.3. Obtención de los meristemas. Desinfección. Iniciación del cultivo.

1.- Separar un "pseudobulbo" de la planta y eliminar las hojas viejas y tejidos necróticos hasta visualizar las yemas laterales que contienen los meristemas (Fig. 6.2, A,B,C).

2.- Aislar cada yema lateral cortándola por la base mediante un bisturí. Sumergir cada yema en etanol 95% durante 10 segundos. A continuación, tras sacudir el exceso de alcohol, sumergir la yema en la solución desinfectante durante 25 minutos. Transferir el recipiente con la solución desinfectante y el material vegetal a la cabina de flujo laminar. Una vez finalizada la desinfección eliminar la solución desinfectante mediante tres lavados (3 x 10 min.) con agua destilada estéril. Para agilizar la desinfección y los lavados, varias yemas (6-7) pueden envolverse con una gasa y procesarse conjuntamente.

3.- Colocar cada yema en una cápsula de Petri estéril y eliminar cuidadosamente las hojas jóvenes hasta obtener el meristemo con 2-3 primordios foliares. Después de eliminar cada hoja sumergir la yema brevemente (10 segundos) en etanol 95% y eliminar el etanol con agua estéril. Finalmente, colocar este material vegetal estéril en una nueva cápsula de Petri estéril.

4.- Con la ayuda de una lupa binocular y mediante un bisturí, aislar el meristemo eliminando los 2-3 primordios foliares (Fig. 6.3). Trabajar con sumo cuidado para no dañar el meristemo. Antes de iniciar esta operación, limpiar exhaustivamente la lupa y la caja de plexiglas con etanol 70% .

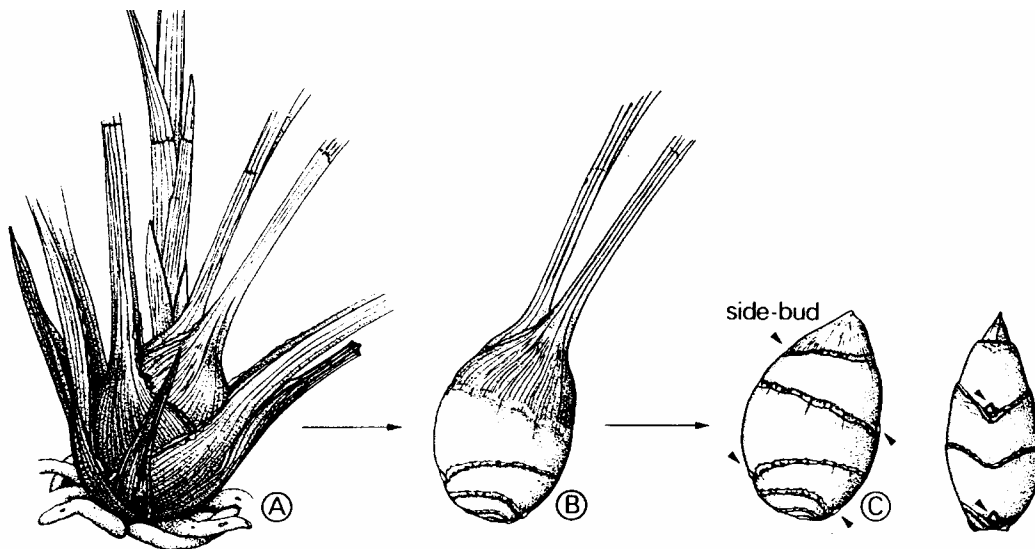


Fig. 6.2. Visualización de las yemas laterales de un "pseudobulbo" para su posterior separación

5.- Transferir cuidadosamente el explanto de meristemo al tubo de cultivo. El meristemo debe quedar sobre la superficie del medio agarizado.

6.- Cultivar los meristemas a 25° C con luz blanca continua (2000 lux). Si el explanto de meristemo no se ha dañado durante el asilamiento y la desinfección, debería adquirir un color verde a los 8 días y producir un protocormo a las 4-6 semanas.

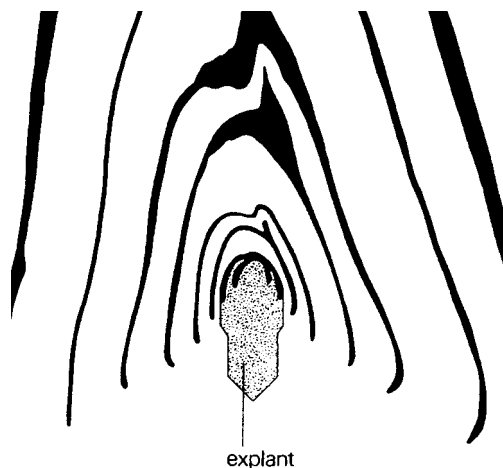


Fig. 6.3. Localización del explanto de meristemo en el interior de la yema axilar

7.- Subdividir los protocormos perfectamente formados dentro del tubo de cultivo y manteniendo las condiciones asépticas. Flamear los tubos de cultivo antes de abrirlos y de cerrarlos. Mediante unas pinzas, separar el protocormo del agar y desplazarlo hasta que quede en contacto con la pared lateral del tubo. A continuación, mediante un bisturí estéril, cortarlo en 4-6 fragmentos. Con unas pinzas, dejar cada uno de los fragmentos sobre la superficie del medio nutritivo.

8.- Cultivar este material a 25° C con luz blanca continua (2000 lux) y cada fragmento dará un nuevo protocormo que a su vez podrá subdividirse de nuevo.

6.4.Resultados

- Anotar la fecha de inicio del experimento, su duración, el número de tubos iniciales y el número de tubos contaminados. Calcular el % de éxito de no contaminación.
- Describir el aspecto del material vegetal al inicio del experimento y los cambios observados a intervalos regulares. Indicar el tiempo necesario para que los meristemas adquieran color verde, para la formación y división de los protocormos.

Bibliografía

- Knudson, L. (1925). Physiological study of the symbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 29: 345-379.
- Grout, B.W.W. (1999). Meristem-Tip culture for propagation and virus elimination. En: Plant Cell Culture Protocols. Hall R.D. (ed.) Humana Press Inc. Totowa NJ. 115-125.
- Morel, G. (1960). Producing virus-free Cymbidiums. Am.Orchid Soc.Bull. 29: 495-497.
- Morel, G. y Martin, C. (1952). Guérison des dahlias atteints d'une maladie à virus. C.R. Acad. Sci. Paris 235: 1324-1325.

Nehra, N.S. y Kartha, K.K. (1994). Meristem and shoot tip culture: Requeriments and applications. En: Plant Tissue and Tissue Culture. Vasil I.K. y Thorpe, T.A. (eds.) Kluwer Acad. Pub. 37-70.

Tisserat, B. y Jones, D. (1999). Clonal Propagation of Orchids. En: Plant Cell Culture Protocols. Hall R.D. (ed.) Humana Press Inc. Totowa NJ. 127-134.

Anexo 6.1

Tabla 1.- Composición del medio de micropropagación de *Cymbidium* (Murashige y Skoog, 1962)

Componentes	Concentración
Macronutrientes (g/l)	
KNO ₃	1,9
NH ₄ NO ₃	1,650
MgSO ₄ .2H ₂ O	0,37
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,44
KH ₂ PO ₄	0,17
Micronutrientes (mg/l)	
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
FeNa.EDTA (g/l)	0,0403
Vitaminas	
/ Aminoácidos (mg/l)	
ácido nicotínico	0,5
tiamina.HCl (B ₁)	0,1
piridoxina (B ₆)	0,1
glicina	3,0
Sacarosa	20 g
Agar	6-8 g

Anexo 6.1

Tabla 2.- Composición y preparación de soluciones stock de medio de micropropagación de *Cymbidium* (Murashige y Skoog (1962))

Componente	Concentración solución stock	Volumen de stock por litro de medio	Conservación
Macronutrientes (x10)		100ml	+ 4°C
KNO ₃	19,00 g/l		
NH ₄ NO ₃	16,50 g/l		
MgSO ₄ .2H ₂ O	3,70 g/l		
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,40 g/l		
KH ₂ PO ₄	1,70 g/l		
Micronutrientes (x100)		10 ml	+ 4°C
H ₃ BO ₃	620 mg/l		
MnSO ₄ . 4H ₂ O	2230 mg/l		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860 mg/l		
KI	83 mg/l		
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25 mg/l		
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5 mg/l		
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5 mg/l		
FeNa.EDTA (x10)	0,403 g/l	100 ml	+ 4°C
Vitaminas/aminoácidos (x 100)		10 ml	- 20°C (alícuotas de 10 ml)
ácido nicotínico	50 mg/l		
tiamina.HCl (B ₁)	10 mg/l		
piridoxina (B ₆)	10 mg/l		
glicina	300 mg/l		

CAPITULO 7. SENESCENCIA FOLIAR: EFECTO DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO Y DE LA LUZ

7.1. Introducción

La senescencia se define como un conjunto de procesos degradativos genéticamente programados que conducen irreversiblemente a la degradación y muerte de una planta, órgano, tejido o célula. En esta última etapa del desarrollo vegetal se producen cambios – totalmente ordenados y coordinados - en la estructura celular, el metabolismo y la expresión génica (Gan y Amasino, 1997). La degeneración pasiva, no regulada endógenamente y desencadenada por factores ambientales se denomina **envejecimiento** (Leopold, 1975; Noodén, 1988). El envejecimiento es consecuencia de lesiones que se van acumulando en el curso del tiempo, no provoca directamente la muerte pero disminuye la resistencia a diferentes estreses y, por tanto, aumenta la probabilidad de morir (Noodén, 1988).

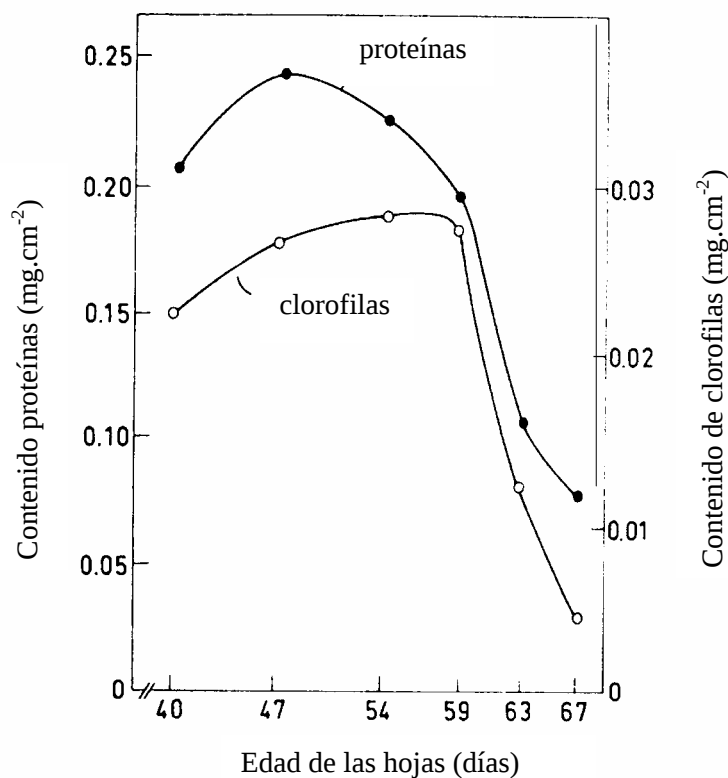


Fig. 7.1. Variación del contenido de clorofilas y proteínas en las hojas en función de la edad foliar.
(Adaptado de Wollhouse, 1967)

La **senescencia foliar** constituye la etapa final del desarrollo de una hoja (Mohr Schopfer, 1995). A **nivel estructural** se inicia con la degradación de los cloroplastos y prosigue con la de otros orgánulos (ribosomas, dictiosomas y conversión de peroxisomas en glioxisomas). Las mitocondrias y el núcleo se mantienen hasta el final del proceso. A **nivel bioquímico** se caracteriza por la degradación de clorofilas (Matile et al., 1996), almidón, ácidos nucleicos y proteínas (Fig. 7.1). La degradación de las clorofilas desenmascara los carotenoides, pigmentos que disminuyen o se acumulan, según las especies, durante la senescencia. El amarilleo de las hojas – a consecuencia de la degradación de la clorofila – se usa como indicador visual de senescencia. Estos cambios están asociados con un incremento de la actividad de enzimas hidrolíticas. Paralelamente se detecta un acusado aumento de la peroxidación de lípidos y se deterioran las membranas (pérdida de la integridad estructural y funcional) a causa de la formación de radicales libres (del Río et al., 1998). A **nivel metabólico**, disminuye la fotosíntesis y aumenta la respiración (Fig. 7.2). A **nivel molecular**, se producen cambios en la expresión génica. Se inhibe la expresión de los genes *CAB* (codifican proteínas que se unen a clorofilas y forman parte de las antenas colectoras de luz de los fotosistemas) y *RBCS* (codifica la subunidad menor de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RubisCo)). En cambio, aumenta la transcripción de genes que codifican proteínas que intervienen activamente en la senescencia (Quirino et al., 2000).

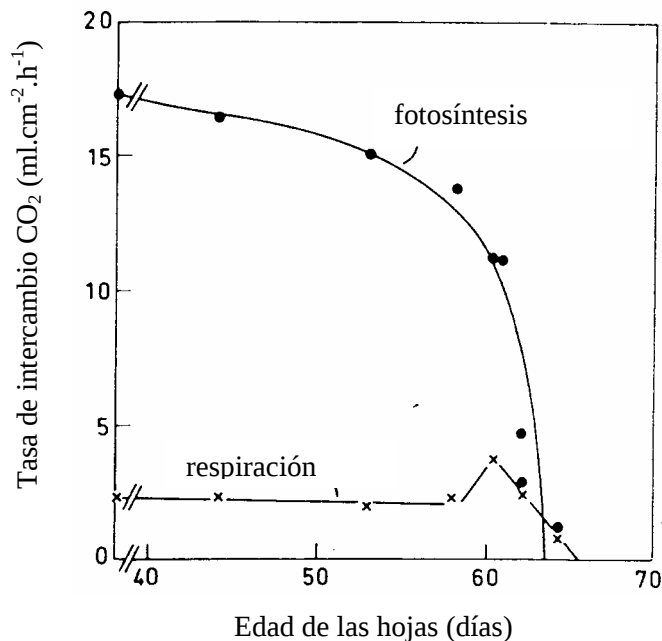


Fig. 7.2. Variación de la tasa de fotosíntesis y respiración en las hojas en función de la edad (Adaptado de Wollhouse, 1967)

La senescencia foliar no es solamente un **proceso degradativo** sino también un proceso de **reciclaje**. Los productos que se forman de la degradación de pigmentos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos son transportados desde las células senescentes hacia órganos que crecen activamente (hojas jóvenes, frutos o semillas en desarrollo) o bien se acumulan en órganos de reserva. En muchas especies, la abscisión marca el fin de la senescencia foliar.

La senescencia está **programada genéticamente** pero su inicio resulta de una compleja interacción entre **factores endógenos** (edad, desarrollo reproductor, hormonas) y **factores ambientales** (fotoperíodo, sombra, temperaturas extremas, sequía, ozono, déficit de nutrientes, infección de patógenos y heridas). Condiciones ambientales desfavorables provocan un prematuro inicio de la senescencia. Sin embargo, la senescencia foliar es parte del programa de desarrollo de una especie vegetal. Tanto en plantas anuales como en perennes, las hojas tienen una vida limitada y cuando alcanzan una determinada edad entran en senescencia aún cuando las condiciones ambientales sean óptimas para el desarrollo de las plantas. En esta situación, los niveles endógenos de citoquininas y etileno, señales procedentes de sumideros (por

ejemplo, frutos en desarrollo) y el nivel de fotoasimilados podrían actuar de forma coordinada regulando el inicio de la senescencia (Buchanan-Wollaston, 1997).

La importancia de los distintos factores ambientales como reguladores de la senescencia varía considerablemente entre distintas especies. Así, la senescencia foliar simultánea de los árboles caducifolios puede ser consecuencia de una disminución del fotoperiodo y la temperatura. En cambio, la senescencia foliar secuencial o progresiva puede ser desencadenada por una competencia de nutrientes entre hojas jóvenes y maduras. En general, la luz retrasa la senescencia pero intensidades muy elevadas la favorecen al provocar la fotooxidación de las clorofilas.

Las **hormonas vegetales**, principalmente las citoquininas y el etileno, son importantes moduladores de la senescencia (Buchanan-Wollaston, 1997). Las **citoquininas** retrasan la senescencia al inhibir la degradación de clorofilas, proteínas, RNA y modular la expresión de genes asociados a senescencia. Experimentos realizados con plantas transgénicas han demostrado que los niveles de citoquininas de una hoja son un factor clave regulando el inicio de la senescencia. Estas hormonas contrarrestan los síntomas de senescencia inducidos por los jasmonatos y su acción es local ya que sólo aquellas zonas donde han sido aplicadas se mantienen de color verde. En cambio, el **etileno** estimula la senescencia foliar en muchas especies pero es totalmente inefectivo en otras. El etileno acelera la degradación de proteínas, almidón y clorofilas sólo cuando las hojas han alcanzado cierta edad. El papel de otros reguladores del crecimiento es menos claro y consistente y, además, la respuesta puede variar en distintas plantas. En general, el **ácido abscísico** actúa como promotor si bien no ha podido demostrarse una correlación entre el contenido de esta hormona y la senescencia foliar. Las **giberelinas** y las **auxinas** retardan la senescencia pero esta respuesta no es universal. Las **poliaminas** también retrasan la senescencia posiblemente al interferir en la producción de etileno.

Numerosos estudios sobre las causas, progresión y regulación de la senescencia foliar se han realizado en hojas aisladas o en fragmentos de hojas mantenidas en la oscuridad. Tanto la escisión foliar como la oscuridad inducen senescencia. La escisión, además, acelera el proceso y evita cualquier interacción de las hojas con el resto de la planta. Mediante esta metodología se ha demostrado que una hoja madura aislada (mantenida en una solución de sales minerales) empieza a perder clorofilas, RNA, proteínas y lípidos de las membranas más rápidamente que si está unida al resto de la planta. Esta senescencia prematura se evidencia por amarilleo de las hojas, ocurre más rápidamente en la oscuridad y se retrasa si se forman raíces adventicias en la base del pecíolo. Las citoquininas contrarrestan parcialmente el efecto de la oscuridad y el requerimiento de raíces. Además, el contenido de estas hormonas en el limbo aumenta con la formación de raíces adventicias.

Así pues, las hojas aisladas, son un sistema adecuado para investigar el efecto de tratamientos químicos y hormonales y de factores ambientales sobre la senescencia. Sin embargo, en la interpretación de los resultados debe asumirse que se trata de un sistema artificial que no recibe hormonas procedentes del resto de la planta y que carece de sumideros para almacenar los productos generados durante la senescencia. Además, esta senescencia inducida artificialmente se solapa con el estrés inducido por la herida y la oscuridad. Este solapamiento dificulta conocer los procesos fisiológicos que, en último término, son responsables de los cambios metabólicos observados en el tejido vegetal senescente.

7.2. Objetivos

El **objetivo** de esta práctica es investigar el efecto de varios **reguladores del crecimiento** en **la senescencia** de fragmentos foliares de *Hordeum vulgare*, L. y/o *Triticum aestivum*, L. mantenidos en la oscuridad o en ciclos luz-oscuridad. El envejecimiento se evaluará determinando el contenido de **clorofilas** y **carotenoides** al inicio de la experiencia (día 0) y al final (día 8) de la misma, una semana más tarde.

7.3. Material y métodos

7.3.1. Material vegetal

Plantas de *Hordeum vulgare*, L. (cebada) o de *Triticum aestivum*, L. (trigo) de aproximadamente 1 mes de edad cultivadas al aire libre o en ciclos 16 horas de luz/8 horas de oscuridad.

7.3.2. Material y equipamientos

7.3.2.1. Reactivos:

- CaCO₃
- Acetona 80%
- Arena de mar
- NaOH 60%
- HCl 1:1
- Quinetina (KK, 6-furfurilamino purina) 10⁻⁴M y 10⁻⁵ M
- Acido abscísico (ABA) 10⁻⁵ M y 2.10⁻⁶M
- Etefón 5-10 ppm
- Espermidina 12 mM.

7.3.2.2. Material fungible:

Cada equipo de trabajo necesita:

- 6 - 8 cápsulas de Petri (6-10 cm diámetro)
- 1 mortero + mano de mortero (mantener en nevera)
- 3 tubos de ensayo (mantener en nevera)
- 1 embudo
- 1 tubo de centrífuga (mantener en nevera)
- Pipetas de 5-10 ml y pipetas Pasteur
- 2 – 4 probetas 100 ml
- 1 varilla de vidrio
- 2 cubetas espectrofotómetro
- Papel de filtro
- Papel de aluminio
- Rotulador resistente al agua
- Caja con hielo

7.3.2.3. Equipamiento

Balanza de precisión
 Centrífuga
 Espectrofotómetro
 Cámara de ambiente controlado (16 h luz/8 h oscuridad, 25°C)
 Cámara de temperatura controlada (oscuridad, 25°C).

7.3.3 Metodología

7.3.3.1. Preparación del material vegetal. Tratamientos hormonales y de luz.

1.- Distribuir los tratamientos hormonales (tabla adjunta) entre los equipos de trabajo. Ver anexo 7.1 para la distribución de los distintos tratamientos entre los diferentes equipos de trabajo

	Tratamientos luminosos	
	Ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad	Oscuridad
Tratamientos Hormonales	Agua destilada (control) KK 10^{-4} M o 10^{-5} M ABA 10^{-5} o $2 \cdot 10^{-6}$ M KK 10^{-4} M + ABA 10^{-5} M Etefon 5 – 10 ppm Espermidina 12 mM	Agua destilada (control) KK 10^{-4} M o 10^{-5} M ABA 10^{-5} o $2 \cdot 10^{-6}$ M KK 10^{-4} M + ABA 10^{-5} M Etefon 5 – 10 ppm Espermidina 12 mM

2.- Identificar y marcar la base de 6 cápsulas de Petri con el tratamiento hormonal correspondiente y añadir 10-30 ml de la solución problema.

3.- Seleccionar 14 hojas sanas, totalmente expansionadas y de tamaño similar. Agruparlas de 2 en 2 y pesarlas (balanza de precisión). Anotar el peso de los 7 lotes de dos hojas. Esta operación debe efectuarse lo más rápidamente posible para evitar que el material se deshidrate.

4.- Reservar 1 lote de 2 hojas para la extracción de los pigmentos fotosintéticos correspondiente al día 0. En tanto no se inicia el proceso envolver las hojas en papel de aluminio y conservarlas en la nevera.

5.- Colocar los 6 lotes restantes en las cápsulas de Petri con las soluciones control y problema cuyo efecto sobre la senescencia se pretende determinar. Las hojas deben fragmentarse y los fragmentos (de 5-7 cm) deben quedar completamente sumergidos en las soluciones.

6.- Envolver las cápsulas 2, 4 y 6 con papel de aluminio para preservarlas de la luz y mantenerlas en estas condiciones durante una semana. Las cápsulas 1, 3 y 5 se mantendrán en ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad durante una semana.

Importante: Conservar todas las cápsulas a la misma temperatura (25°C) ya que ésta afecta a la senescencia.

7. Al término de la semana (día 8) se observará el aspecto (color) del material, se pesará de nuevo y se procederá a determinar su contenido de pigmentos fotosintéticos.

7.3.3.2. Extracción y determinación de pigmentos fotosintéticos.

Advertencia: Durante la extracción es básico: a) trabajar lo más rápidamente posible, b) emplear material de vidrio frío y, c) mantener el material vegetal en frío (cubeta con hielo) y preservarlo de la luz.

1.- Calibrar un tubo de ensayo a 20 ml con agua destilada. Señalar el nivel de agua con un rotulador y desechar el agua. Recubrir el tubo con papel de aluminio e introducirlo (vertical) en la cubeta con hielo.

2.- Cortar las hojas en fragmentos y colocarlas en el mortero para su homogenización. Añadir una pequeñísima cantidad de CaCO_3 (con la punta de una tijera) para evitar la posible acidificación del extracto por los jugos vacuolares, una pequeña cantidad de arena de mar y 5 ml de acetona 80%.

3.- Filtrar el homogenizado a través de papel de filtro (usar un filtro sencillo, sin repliegues, que no sobresalga del embudo) y recogerlo en el tubo de ensayo previamente calibrado a 20 ml. Utilizar una varilla para decantar el extracto. Lavar cuidadosamente con acetona 80% el mortero, la mano de mortero y el papel de filtro, para recuperar la totalidad de pigmentos extraídos, hasta llegar al enrase.

4.- Tapar el tubo con parafilm y agitar el extracto por inversión o mediante vortex. Traspasar parte del extracto a un tubo de centrifuga y centrifugar a 3000 rpm, 5 minutos.

Tener presente al centrifugar que los tubos de centrifuga en situación opuesta han de estar perfectamente equilibrados. Equilibrar por pesada sacando con una pipeta Pasteur el extracto del tubo de mayor peso. No añadir acetona porque se diluiría el extracto previamente ajustado a 20 ml.

5.- A continuación, pasar cuidadosamente (no agitar) parte del extracto a una cubeta del espectrofotómetro y medir, en el espectrofotómetro, la absorbancia a 470 nm, 646,8 nm, 663,2 nm y 750 nm. La absorbancia a 750 nm es un indicador de turbidez y su valor debe restarse de los valores obtenidos en las otras longitudes de onda. Si la absorbancia a 750 nm es superior a 0,050 centrifugar de nuevo el extracto y repetir las lecturas.

6.- Calcular las concentraciones de pigmentos a partir de las fórmulas de Lichtenthaler (1987):

$$\text{Cl a} = 12,25 A_{663,2} - 2,79 A_{646,8} \quad \mu\text{g clorofila a/ml}$$

$$\text{Cl b} = 21,50 A_{646,8} - 5,10 A_{663,2} \quad \mu\text{g clorofila b/ml}$$

$$\text{Cl a} + \text{Cl b} = 7,15 A_{663,2} + 18,71 A_{646,8} \quad \mu\text{g clorofila total/ml}$$

$$\text{Carot}_x + c = (1.000 A_{470} - 1,82 \text{Cl a} - 85,02 \text{Cl b}) / 198 \quad \mu\text{g carotenoides/ml.}$$

7.3.3.3. Observación de algunas propiedades de la molécula de clorofila.

Llenar dos tubos de ensayo con 2 ml del extracto y observarlos a la luz ultravioleta. Se verá la **fluorescencia** rojo sangre de las clorofilas.

Las clorofilas contienen un átomo de magnesio central que puede ser intercambiado por dos átomos de hidrógeno al reaccionar con ácidos; se originan, de este modo, las feofitinas. Esta transformación provoca cambios en el espectro de absorción y la desaparición de la fluorescencia típica. Comprobarlo añadiendo 2 ml de HCl 1:1 en el primer tubo y agitando posteriormente.

La fluorescencia principal también desaparece pero más lentamente por saponificación de las clorofilas, pero persiste una fluorescencia remanente debida a las porfirinas. Comprobarlo añadiendo 1 ml de NaOH 60%, gota a gota, en el segundo tubo y mantenerlo tres minutos al baño María.

7.4 Resultados

- Calcular la concentración de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides al inicio (día 0) y al final (día 8) del experimento. Expresar los resultados como mg clorofila/g peso fresco o mg carotenoides/gr peso fresco.
- Calcular (día 0 y día 8) la relación clorofila a/clorofila b y clorofila/carotenoides
- Graficar los resultados, de modo que quede clara la variación pigmentaria desde el día inicial (día 0) al final (día 8) y los efectos de los distintos tratamientos hormonales y luminosos.
- Comentar y discutir los resultados.

7.4.1 Tabla de resultados – Equipo de Trabajo

Tabla.- Efecto de distintos reguladores del crecimiento sobre los cambios en el contenido de pigmentos fotosintéticos durante la senescencia foliar. El material se ha mantenido - durante 8 días - en la oscuridad o en ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad.

Especie vegetal:

Fecha (día)	Tratamiento Químico	Tratamiento Luminoso	Pigmentos fotosintéticos					
			Cl a mg / g PF	Cl b mg / g PF	Cl a + Cl b mg / g PF	Carotenoides mg / g PF	Cl a / Cl b	Cl total / Carotenoides
0	Control							
8	Control	Oscuridad						
		Luz/oscuridad						
8	-	Oscuridad						
		Luz/oscuridad						
8	-	Oscuridad						
		Luz/oscuridad						

7.4.2 Tablas de resultados generales – Grupo de Prácticas

Tabla.- Cambios en el contenido de pigmentos fotosintéticos durante la senescencia foliar. El material se ha mantenido durante 8 días en la **oscuridad**.

Especie vegetal:

Fecha (día)	Equipo Trabajo	Tratamiento Químico	Pigmentos fotosintéticos					
			Cl a Mg / g PF	Cl b mg / g PF	Cl a + Cl b mg / g PF	Carotenoides mg / g PF	Cl a / Cl b	Cl total / Carotenoides
0	1	Control						
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							
8	1	Control						
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							

Tabla.- Efecto de distintos reguladores del crecimiento sobre los cambios en el contenido de pigmentos fotosintéticos durante la senescencia foliar. El material se ha mantenido durante 8 días en la oscuridad.

Especie vegetal:

Fecha (día)	Equipo Trabajo	Tratamiento Químico	Pigmentos fotosintéticos				
			Cl a mg / g PF	Cl b mg / g PF	Cl a + Cl b mg / g PF	Carotenoides mg / g PF	Cl a / Cl b
8		KK 10 ⁻⁵ M					Cl total / Carotenoides
8		KK 10 ⁻⁴ M					
8		ABA 10 ⁻³ M					
8		ABA 2.10 ⁻⁶ M					
8		Etefón 5 ppm					
8		Etefón 10 ppm					
8		Spm 12 mM					

Anexo 7.1 Distribución de los tratamientos hormonales y de luz.

Equipo de Trabajo	Cápsula	Tratamiento hormonal	Tratamiento luminoso
1	1	agua destilada (control)	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	2	agua destilada (control)	oscuridad
	3	KK 10^{-5} M	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	4	KK 10^{-5} M	oscuridad
	5	ABA 10^{-5} M	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	6	ABA 10^{-5} M	oscuridad
2	1	agua destilada (control)	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	2	agua destilada (control)	oscuridad
	3	KK 10^{-4} M	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	4	KK 10^{-4} M	oscuridad
	5	ABA $2 \cdot 10^{-6}$ M	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	6	ABA $2 \cdot 10^{-6}$ M	oscuridad
3	1	agua destilada (control)	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	2	agua destilada (control)	oscuridad
	3	KK 10^{-5} M	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	4	KK 10^{-5} M	oscuridad
	5	etefón 5 ppm	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	6	etefón 5 ppm	oscuridad
4	1	agua destilada (control)	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	2	agua destilada (control)	oscuridad
	3	etefón 10 ppm	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	4	etefón 10 ppm	oscuridad
	5	ABA 10^{-5} M	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	6	ABA 10^{-5} M	oscuridad
5	1	agua destilada (control)	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	2	agua destilada (control)	oscuridad
	3	Spm 12 mM	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	4	Spm 12mM	oscuridad
	5	etefón 5 ppm	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	6	etefón 5 ppm	oscuridad
6	1	agua destilada (control)	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	2	agua destilada (control)	oscuridad
	3	etefón 10 ppm	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	4	etefón 10 ppm	oscuridad
	5	KK 10^{-4} M	ciclos 16 h luz / 8 h oscuridad
	6	KK 10^{-4} M	oscuridad

Bibliografía

Buchanan-Wollaston, V. (1997). The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 48: 181-199.

Del Río, L.A.; Pastori, G.M., Palma, J.M.; Sandalio, L.M.; Sevilla, F.; Corpas, F.J.; Jiménez, A.; López-Huertas, E.; Hernández, J.A. (1998). The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol.* 116: 1195-1200.

Gang, S.; Amasino, R.M. (1997). Making sense of senescence. *Plant Physiol.* 113: 313-319.

Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomenbranes. *Methods in Enzymology* 148: 360-370.

Matile P.; Hörtensteiner, S.; Thomas, H.; Kräutler, B. (1996). Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiol* 112: 1403-1409.

Mohr, H., Schopfer, P. (1995). *Plant Physiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Quirino, B.F.; Noh, Y-S., Himmelblau, E.; Amasino, R.M. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* 5(7): 278-282.