



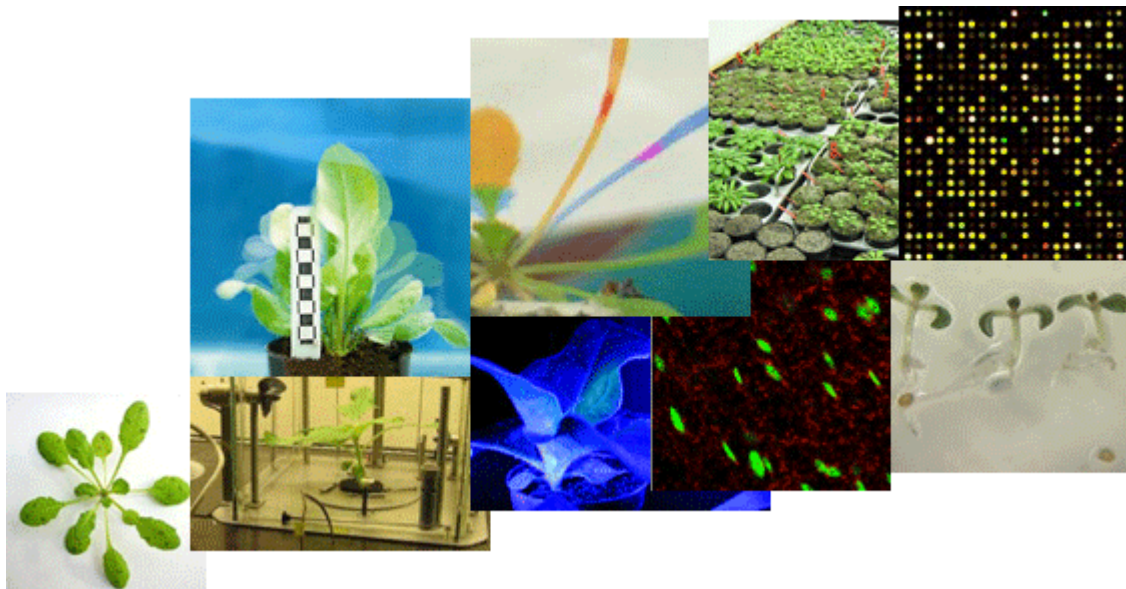
Universidad Michoacana
de San Nicolás de Hidalgo



FACULTAD de BIOLOGÍA

FISIOLOGÍA VEGETAL

Manual de Prácticas
de laboratorio



**Irene Ávila D., Lourdes Ballesteros A.,
Hugo A. Farías Ch., Victoriano R. Ramírez R. y
José Luis Abrego Aranda.**

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO, 2013.

P R E S E N T A C I Ó N

Para que la especie humana logre un manejo y aprovechamiento, de los recursos vegetales, de forma sustentable y con un enfoque ecológico, es indispensable un conocimiento amplio e integrado de los diferentes niveles y aspectos de la vida de las plantas y el medio que les circunda.

La Fisiología Vegetal, al estudiar los diversos procesos o funciones de autotofía, homeostasis y reproducción en los vegetales, constituye una asignatura fundamental en la extensa e interminable formación del Biólogo.

La experimentación en el laboratorio es una actividad esencial para el mejor entendimiento de los procesos y conceptos propios de la Fisiología Vegetal. De manera que, mediante la diligente realización de experimentos, la observación cuidadosa, el análisis de los datos observados en cada experimento y la revisión de literatura, se pretende que el estudiante logre los siguientes objetivos generales:

- I. Conocer varios aspectos morfológicos, anatómicos, orgánicos y tisulares de las plantas superiores.
- II. Observar directamente varios de los fenómenos discutidos en la parte teórica del curso.
- III. Ensayar algunas técnicas de laboratorio usadas en el estudio de los procesos fisiológicos de los vegetales.
- IV. Experimentar con aspectos del desarrollo de los vegetales, usando los conceptos y técnicas aprendidos en este y otros cursos.

NORMAS DE PROCEDIMIENTO

EN EL LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL

- Mostrar interés y dedicación en cada una de las prácticas, mediante la lectura previa y comprensión de la práctica respectiva, lo cual favorecerá el entendimiento de la explicación del instructor del laboratorio.
- Obtener con anticipación el material biológico necesario para cada práctica, esmerándose en la realización y comprensión del experimento.
- Ser cuidadoso y diligente durante el desarrollo de las prácticas, para evitar accidentes, y para un óptimo aprovechamiento de la sesión.
- Usar bata en cada sesión de laboratorio.
- Cada asistente al laboratorio contará con su Manual de Prácticas.
- Entregar en tiempo y forma un digno reporte de cada práctica realizada.
- El reporte escrito de cada una de las sesiones prácticas deberá contener los siguientes aspectos:
 - Un reporte por práctica y por equipo
 - Contener, además de los nombres de los integrantes del equipo, el título, los objetivos, los resultados, el cuestionario y la literatura consultada.

ÍNDICE

PRÁCTICA	TÍTULO DE LA PRÁCTICA	Página
1	MONTAJE Y MANEJO DE UN CULTIVO HIDROPÓNICO	1
2	ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE TEJIDOS DE PLANTAS SUPERIORES	4
3	ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS PRINCIPALES ÓRGANOS DE PLANTAS VASCULARES	8
4	LA TRANSPIRACIÓN EN LOS VEGETALES	11
5	DINÁMICA ESTOMÁTICA	15
6	LA FOTOSÍNTESIS	19
7	IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS C ₃ Y C ₄	21
8	EFFECTO DE LA AUXINA EN EL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ	24
9	EFFECTO DEL ÁCIDO GIBERÉLICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE UNA PLANTA TIPO ROSETA	26
10	GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE PLANTAS SUPERIORES	28
11	MEDIOS DE CULTIVO PARA TEJIDOS VEGETALES Y SU PREPARACIÓN	31
12	OBTENCIÓN DE BROTES POR CULTIVO <i>in vitro</i> DE HOJA	37

1. MONTAJE Y MANEJO DE UN CULTIVO HIDROPÓNICO

INTRODUCCIÓN

El término hidroponía ("*labor en agua*") se refiere a un sistema de producción de vegetales en el que las raíces de las plantas se riegan con una mezcla de elementos nutritivos esenciales disueltos en agua y en el que en lugar de "suelo" se utiliza material inerte como sustrato, o simplemente la misma solución nutritiva.

Los métodos de cultivo en hidroponía suele agruparse en varias categorías:

- a) Cultivos en solución,
- b) Cultivos en grava,
- c) Cultivos en agregados inertes diversos,
- d) Técnicas misceláneas: aeroponía, cultivos verticales, película nutritiva o NFT (*Nutrient Film Technique*).

Cada una de estas categorías sólo son modificaciones para incrementar la eficiencia, reducir costos o adaptar el sistema a condiciones que obedecen a propósitos específicos.

OBJETIVOS

1. Conocer el manejo básico de un cultivo hidropónico.
2. Obtener, mediante el cultivo hidropónico, parte del material biológico requerido en varias de las prácticas del laboratorio de Morfofisiología Vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material por equipo:

- Dos charolas de plástico de diferente tamaño.
- Agrolita.
- Mechero de Bunsen.
- Varilla de vidrio.

- Semillas germinadas de dos especies vegetales, una dicotiledónea y otra monocotiledónea. (Maíz, frijol, trigo, chícharo, cebada, haba, garbanzo, rábano, calabaza, entre otras).

Reactivos:

- Agua destilada.
- Solución nutritiva de Hoagland, compuesta por las soluciones siguientes:

Solución A

<i>Reactivo</i>	<i>gramos/litro</i>
KH_2PO_4 (fosfato de potasio monobásico)	0.14
KNO_3 (nitrato de potasio)	0.51
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (nitrato de calcio)	1.18
MgSO_4 (sulfato de magnesio)	0.49

Solución B

<i>Reactivo</i>	<i>gramos/litro</i>
H_3BO_3 (ácido bórico)	0.60
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (cloruro de manganeso)	0.40
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de zinc)	0.05
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre)	0.05
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ácido molíbdico)	0.02

Solución C:

<i>Tartrato de fierro</i>
FeSO_4 al 0.5% + ácido tartárico al 0.4%

Preparación del cultivo hidropónico.

1. Con una varilla de vidrio caliente hacer varias perforaciones en la base de la charola chica.
2. En la charola chica (perforada en su base) colocar la agrolita necesaria para cubrir llenarla hasta un centímetro abajo del borde.
3. Humedecer la agrolita con solución nutritiva.
4. Nivelar bien la superficie de la agrolita y sobre esta trazar una cuadrícula. En cada vértice de la cuadrícula sembrar una semilla previamente germinada.
5. Colocar la charola con el cultivo dentro de la charola grande, para que esta última reciba los excedentes de la solución nutritiva.
6. Etiquetar la charola chica con los datos siguientes: semestre, sección, equipo, semillas sembradas y fecha.

Preparación de la solución nutritiva.

1. Las tres soluciones se preparan con agua destilada.
2. Pesar las cantidades correspondientes de cada una las sales para preparar las Soluciones B y C, y disolverlas en las cantidades respectivas de agua destilada. Guardarlas en frascos ámbar o cubrirlos con papel aluminio y mantenerlas en refrigeración.
3. Preparar la Solución A en el momento que se vaya a regar el cultivo y adicionarle las cantidades respectivas de las Soluciones B y C según se muestra en la siguiente tabla:

Solución A	Solución B	Solución C
1000 ml	1 ml	1 ml

Nota: regar el cultivo 2 veces por semana.

CUESTIONARIO

1. ¿Por qué se usa agua destilada en la preparación de la solución nutritiva?
2. ¿Qué tipos de sales se utilizan en la preparación de la solución nutritiva?
3. ¿Qué utilidad pueden tener los cultivos hidropónicos en la Fisiología Vegetal?
4. ¿Qué aplicaciones prácticas se le pueden dar a los cultivos hidropónicos?

2. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE TEJIDOS DE PLANTAS SUPERIORES

INTRODUCCIÓN

Para ayudar a entender la fisiología de las plantas es necesario conocer su estructura tanto a nivel celular, como de tejidos y de órganos.

Los meristemos, por ejemplo, son tejidos indiferenciados donde se lleva a cabo la división celular en los vegetales. Algunas células conservan su naturaleza meristemática, mientras que otras se diferencian y especializan para formar tejidos. Cada tejido consiste en uno o varios tipos de células diferenciadas capaces de realizar una función específica, determinada por su estructura y viceversa.

Los principales tejidos en una planta angiosperma son de tres tipos básicos:

1. Meristemos.
2. Tejidos permanentes simples.
3. Tejidos permanentes complejos. (Con dos o mas tipos de células)

OBJETIVOS

1. Introducir al estudiante a la gran diversidad de tejidos vegetales.
2. Conocer algunos tejidos vegetales, relacionando su estructura con su función.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material por equipo:

- Microscopio compuesto.
- Microscopio estereoscópico.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Plántulas de cebolla (*Allium sepa*).
- Hojas de "Trueno" (*Ligustrum japonicum* Thunb.).
- Tubérculo de papa, fruto de pera, apio, tilia y geranio.
- Lugol (Yodo de Gram).

Método:

Tejido Meristemático:

1. Con el microscopio estereoscópico localizar la región **meristemática** de la raíz de la plántula de *cebolla*.
2. Realizar algunos cortes de esta zona y observar en el microscopio a 100x.
3. Observar el volumen aproximado del núcleo en el citoplasma y la forma general de las células. (Toma fotografías o realiza dibujos de las mejores preparaciones).

Tejidos permanentes simples:

Estos tejidos están constituidos por células estructural y funcionalmente semejantes, que han perdido su función meristemática. En plantas superiores se encuentran 5 tipos principales:

a) **Epidermis.**

1. Preparar un montaje húmedo de epidermis desprendida de la hoja de "*trueno*".
2. Observar la epidermis en el microscopio con el objetivo de 40x.
3. Registrar en un dibujo o fotografías los diversos tipos de células o estructuras observadas.

b) **Parénquima.**

1. Preparar un montaje húmedo de una sección transversal de *papa*, lo más delgada posible.
2. Observarlo en el microscopio a 40x y 100x.
3. Hacer un esquema de las características celulares, como núcleo y pared celular, o tomar varias fotografías.

c) **Colénquima.**

1. Preparar un corte transversal, muy delgado, de el peciolo de una hoja de *apio*.
2. Observar el corte en el microscopio a 40x y 100x. Las células del colénquima se localizan por debajo de la epidermis, en los surcos de los peciolos y se les puede reconocer por su apariencia blanquecina.
3. Dibujar la forma general de las células y el grosor de sus paredes, o tomar varias fotografías.

d) **Esclerénquima.**

Las células del esclerénquima en su madurez son "células" muertas que presentan una pared celular secundaria gruesa y lignificada. Se compone de dos tipos de células: **fibras** y **esclereidas**. Las fibras son filiformes y de paredes celulares gruesas y uniformes. Las esclereidas varían de forma y tamaño, desde células isodiamétricas hasta células con largas prolongaciones.

1. Macerar en un mortero una pequeña cantidad de "*tilia*", adicionando agua destilada.
2. Colocar una gota de la molienda en un portaobjetos y observar en el microscopio a 40x y 100x, buscando con detenimiento las **fibras**.
3. Dibujar la forma y apariencia de las fibras observadas.
4. Preparar un montaje húmedo de un pequeño corte del fruto de la "*pera*".
5. Observar en el microscopio a 100x una de las partículas puntiformes. La textura áspera de la pera es consecuencia de la presencia de grupos de **esclereidas** esparcidas por la pulpa del fruto.
6. Describir la forma, el grosor de la pared celular, el lúmen y los canales radiales de las esclereidas.

e) **Corcho.**

Cuando la epidermis de una planta se rompe por efecto de su crecimiento, generalmente es reemplazada por el corcho; este se desarrolla antes de que la epidermis desaparezca por completo. Cuando las células del corcho maduran, se impregnan de suberina, la cual las hace impermeables y elásticas.

1. Realizar una preparación de un corte transversal de tallo de "*geranio*", "*tilia*" o de cualquier otro tallo leñoso joven.
2. Observar los cortes en el microscopio a 40x y 100x.
3. Registrar mediante un esquema la localización, la apariencia y número de capas de las células del corcho. O tomar varias fotografías.

RESULTADOS

TIPO DE TEJIDO	Características estructurales	FUNCIÓN	E S Q U E M A
Meristemático			
Epidermis			
Parénquima			
Colénquima			
Fibras			
Esclereidas			
Corcho			

CUESTIONARIO

1. En la punta de las raíces, ¿Se presenta la diferenciación celular o la maduración? Explica.
2. ¿Cuál es la función general de el parénquima?
3. ¿Qué relación hay entre la estructura y la función del colénquima?
4. ¿Qué características estructurales de la epidermis se consideran importantes para que esta pueda cumplir con su función?
5. Las células del esclerénquima observadas, ¿Son células vivas o "muertas"?, ¿Cómo lo distingues?
6. ¿Qué sucede con las células de parénquima al aplicarles yodo?

3. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS PRINCIPALES ÓRGANOS DE PLANTAS VASCULARES

INTRODUCCIÓN

Una planta vascular está compuesta de diversos tipos de células y tejidos, que a su vez se encuentran organizados conformando los órganos de los vegetales. Los principales órganos son: **raíz, tallo y hoja**.

Las raíces son típicamente órganos subterráneos, cuyas principales funciones son la *fijación* de la planta al sustrato y la *absorción* de agua y minerales.

El tallo en la mayoría de las plantas es aéreo. Las principales funciones del tallo son de *soporte* para hojas, flores y frutos, así como de *conducción* de agua, minerales y sustancias elaboradas en las hojas.

La hoja es el principal órgano *fotosintético* de las plantas superiores, jugando también un papel fundamental en la *transpiración*.

OBJETIVO

Observar la estructura de los principales órganos vegetales y relacionarla con la función de estos en las plantas vasculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material por equipo:

- Microscopio estereoscópico.
- Microscopio compuesto.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Navajas.
- Solución de Rojo Congo (0.5%)
- Plántulas de rábano, de 4 a 5 días.
- Dos plantas dicotiledóneas, una herbácea y otra leñosa.
- Dos plantas monocotiledóneas.

Método:

A) *Pelos radicales*.

Realizar varios cortes delgados de la región de los pelos radicales de las raíces de las plántulas de rábano y de alguna de

las plantas de tu cultivo hidropónico, y observarlas en el microscopio tratando de distinguir un pelo radical completo.

B) *Raíz y tallo.*

1. Un día antes de la práctica de laboratorio sumergir cada una de las plantas a observar en una solución de rojo congo. En el laboratorio realizar cortes delgados de raíz y tallo de cada una de las plantas y observarlos en el microscopio.
2. Localizar la estele, la corteza, la epidermis, el xilema y el floema en los cortes de raíz.
3. En los cortes de tallo identificar la médula, el xilema, el floema, la corteza y la epidermis. Además, en el tallo leñoso, localizar el cambium y su crecimiento secundario (xilema y floema).

C) *Hoja.*

1. Realizar varios cortes delgados de 2 hojas de dicotiledóneas y de 2 hojas de monocotiledóneas.
2. Colocar los cortes en el portaobjetos de tal forma que se pueda observar en el microscopio la epidermis superior e inferior y los tejidos que se localizan entre ambas.
3. Elaborar dibujos de cada una de las mejores preparaciones, indicando cada una de sus partes, como la cutícula, las epidermis, los estomas, los parénquimas, entre otras.

RESULTADOS

PELOS RADICALES

Plántula de rábano	Planta en cultivo hidropónico
Raíz de Monocotiledónea	Raíz de Dicotiledónea
Tallo de Monocotiledónea	Tallo de Dicotiledónea

--	--

Hojas de Monocotiledóneas	

Hojas de Dicotiledóneas	

CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la función de la endodermis?
2. ¿Qué tipo de tejido constituye a la médula?
3. ¿Qué función tiene el "cambium"?
4. ¿Cuál es la función del periciclo?
5. Explica la estructura de la hoja en relación a su función.

4. LA TRANSPIRACIÓN EN LOS VEGETALES

INTRODUCCIÓN

La transpiración consiste en la pérdida de moléculas de agua por la parte aérea de los vegetales. La liberación de estas moléculas puede seguir varios caminos: las células *epidérmicas*, las *lenticelas* o los *estomas*.

Son varios los factores que determinan la tasa de transpiración. Estos factores pueden ser ambientales (luz, temperatura, humedad relativa, entre otros) o *intrínsecos* a la planta (área foliar, estructura cuticular, ubicación y abundancia de estomas, etc.).

Se han usado diversos métodos para demostrar y/o medir la transpiración. El método del "*potómetro*" sirve para medir la velocidad de transpiración y el método del *cloruro de cobalto* para demostrarla. Ambos métodos son sencillos.

OBJETIVOS

1. Medir, con el auxilio de un potómetro la velocidad de transpiración de una planta madura.
2. Observar cualitativamente el fenómeno de la transpiración usando el método del cloruro de cobalto.

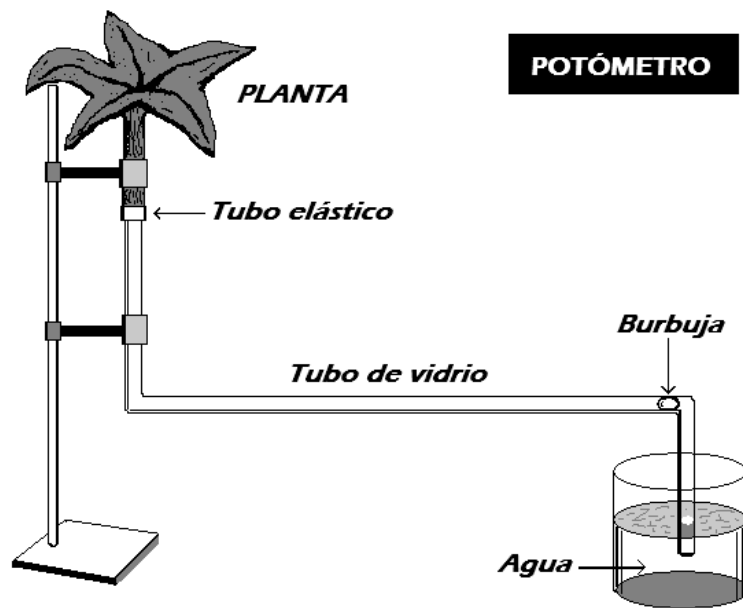
MATERIALES Y MÉTODOS

Material por equipo:

- Soporte universal con dos pinzas para bureta.
- Vaso de precipitado de 2,000 ml.
- Mechero Bunsen o Fisher.
- Tubo de vidrio de 50 cm.
- Mangera para mechero de 10 cm.
- Marcador o plumón.
- Regla de geometría.
- Papel filtro.
- Cuatro portaobjetos.
- Clips grandes.
- Solución de cloruro de cobalto (3%).
- Planta con hojas grandes y delgadas como el "tabaquillo" (*Nicotiana glauca*) o la "higuerilla" (*Ricinus communis*).

Método del potómetro:

1. Doblar el tubo de vidrio en cada uno de sus extremos en sentido opuesto.
2. Insertar la manguera de 10 cm en uno de los extremos del tubo de vidrio.
3. Sumergir el tubo en agua para que su interior quede lleno de agua, sin burbujas.
4. Sin sacar el tubo del agua inserta en la manguera unida al tubo la planta por la base de su tallo.
5. Sacar todo del agua (tubo de vidrio+manguera+planta). Si el agua dentro del tubo no se sale por gravedad, está listo para usarse; caso contrario hay que hacer todo el montaje de nuevo.
6. Cuando el aparato está listo, introducir una burbuja en el tubo con agua, esta burbuja deberá ser mayor que el diámetro interior del tubo.
7. Introducir el extremo libre del tubo en un recipiente con agua, procurando que la burbuja quede en el primer doblez del tubo.
8. Fijar el aparato en un soporte universal, cuidando que la parte media del tubo quede horizontal y marcar con un plumón la posición inicial de la burbuja.
9. Marcar la posición de la burbuja en el tubo cada 5 minutos hasta tener 4 ó 5 marcas en el interior del laboratorio; enseguida llevar todo el aparato para colocarlo en condiciones de luz directa del sol y marcar cada 5 minutos la posición de la burbuja.
10. Desmontar el aparato y medir las distancias entre las marcas en el tubo. Además medir el diámetro interno del tubo de vidrio.
11. Calcular el área foliar de la planta que se usó en el potómetro. Para esto, pesar 3 cm² de hoja, anotar el peso, y ahora pesar todas las hojas de la planta incluyendo los 3 cm² ya pesados; y por regla de tres calcular el área foliar total.



Método del cloruro de cobalto:

1. Sumergir dos tiras de papel filtro en una solución de cloruro de cobalto (al 3%) y secarlas cerca de la flama del mechero hasta que se tornen azules, cuidando no quemar el papel.
2. Colocar de forma rápida los dos papeles azules en una hoja de una planta "in situ" que sea de la misma especie de la que se usó en el potómetro, uno en el haz y el otro en el envés de la misma hoja. Empezar a medir el tiempo para registrar los cambios en la coloración de ambos papeles. Cubrir ambos papeles con un portaobjetos cada uno y sujetarlos con clips.
3. Registrar el tiempo que tardan en virar de color ambos papeles, primero de azul a blanco y luego de blanco a rosa pálido.

RESULTADOS

A) Método del potómetro:

Anotar los datos que se necesitan en la **tabla** siguiente, y a partir de estos datos construir una **gráfica** con dos curvas: la de *tiempo* contra *volumen transpirado* y la de *tiempo* contra *tasa transpiratoria*.

TIEMPO (minutos)	DISTANCIA (cm o mm)	VOLUMEN TRANSPIRADO (cm ³ o ml) ($\pi \times r^2 \times d$)	TASA TRANSPIRATORIA (Vol/área foliar/tiempo)

Área foliar total: _____ cm².

B) Método del cloruro de cobalto:

En la tabla siguiente anotar los tiempos observados para los cambios de coloración en el papel filtro impregnado con la solución de CoCl₂ (al 3%).

CAMBIO DE COLOR	HAZ (minutos o segundos)	ENVÉS (minutos o segundos)
<i>De azul a blanco</i>		
<i>De blanco a rosa</i>		

CUESTIONARIO

1. Menciona ventajas y desventajas del método del potómetro.
2. ¿Cómo influyen la luz y la temperatura sobre la velocidad de transpiración en las plantas?
3. ¿Qué ventajas y desventajas ofrece la transpiración a los vegetales?

5. DINÁMICA ESTOMÁTICA

INTRODUCCIÓN

Los estomas son un mecanismo homeostático que regula las demandas de absorción del CO₂ así como la pérdida de agua. La mayor parte de el agua transpirada por una planta es a través de los estomas. Este proceso está controlado por la planta, aunque impuesto por el medio. Por ello, se espera que existan controles de retroalimentación mediante los cuales el H₂O y el CO₂ determinen la apertura y cierre de los estomas. Hay otros factores, como la luz y la temperatura, que también afectan el movimiento de las células estomáticas.

OBJETIVOS

1. Observar estructura y disposición de los estomas en diversos tipos de plantas.
2. Inducir el movimiento estomático bajo diferentes condiciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material por equipo:

- Microscopio compuesto.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Tres matraces Erlenmeyer.
- Un vaso de precipitado de 2,000 ml.
- Algodón.
- Un cigarro.
- Navajas.
- Barniz para uñas (incoloro).
- Plantas del cultivo hidropónico.

Método:

Nota 1. Una hora antes de iniciar la práctica regar el cultivo hidropónico.

Nota 2. Observar en el microscopio la estructura, disposición y abundancia relativa de estomas en el haz y envés, tanto de una hoja de monocotiledónea como de una hoja de dicotiledónea.

Nota 3. Para hacer las preparaciones de las epidermis de la hoja y poder observar los estomas usar el método del "colodi6n" para hojas de monocotiled6neas y el método del "raspado" para dicotiled6neas. Luego, colocar la preparaci6n en el portaobjetos agregando una gota de agua sobre esta antes de colocar el cubreobjetos.

Nota 4. Realizar los dibujos (o las fotografías) y aportar los datos que se piden en la secci6n de RESULTADOS.

Baja concentraci6n de CO₂. Colocar dentro de un matraz la hoja de una planta de dicotiled6nea, sin desprender la hoja de la planta, dejándola así por dos horas.

Alta concentraci6n de CO₂. Llenar de humo de cigarro un matraz Erlenmeyer y colocar dentro de dicho matraz la hoja de una planta dicotiled6nea, sin desprenderla de la planta, dejándola así por dos horas.

Transcurridas las dos horas cortar las hojas de ambos tratamientos y obtener la epidermis inferior de las dos hojas bajo el agua para evitar la deshidrataci6n de las dos preparaciones. Observarlas en el microscopio en 40x para contar el n6mero total de estomas en el campo de observaci6n y tambi6n el n6mero de estomas abiertos en el mismo campo.

Sequía. Cortar una hoja de una planta dicotiled6nea y esperar 20 minutos. De esa hoja realizar una preparaci6n de la epidermis inferior y contar el n6mero de estomas abiertos y n6mero total de estomas en un campo de observaci6n (40x).

Alta humedad. Cortar una hoja de dicotiled6nea y obtener una preparaci6n de epidermis inferior bajo el agua; en esta preparaci6n contar el n6mero de estomas abiertos y el n6mero total de estomas en el campo de observaci6n.

RESULTADOS

1. Reportar esquemas (o fotografías) de la estructura y distribuci6n de los estomas en la siguiente tabla:

MONOCOTILED6NEA	
HAZ	ENVÉS

--	--

DICOTILEDÓNEA

HAZ	ENVÉS

2. Elaborar una tabla donde se compare el número de estomas por campo visual en haz y envés tanto de monocotiledóneas como de dicotiledóneas.

3. En la siguiente tabla aportar los datos que se te piden de estomas abiertos y total de estomas en el envés de las hojas de dicotiledónea, observados bajo cuatro condiciones diferentes.

	Baja concentración de CO ₂	Alta concentración de CO ₂	Sequía	Humedad
Número total de estomas				
Número de estomas abiertos				

CUESTIONARIO

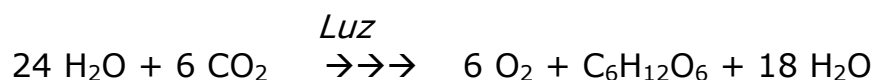
1. ¿Existe alguna relación entre el número de estomas/cm² y la especie de planta?

2. Mencionar tres diferencias sobre la estructura y distribución de estomas entre plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.
3. ¿Qué otros factores, además de el agua y el CO₂, influyen en la dinámica estomática?
4. Explicar el efecto de la concentración del CO₂ en movimiento estomático.

6. LA FOTOSÍNTESIS

INTRODUCCIÓN

La fotosíntesis es el proceso por el cual las plantas capturan la energía luminosa y la transforman en energía química. La energía luminosa absorbida por la clorofila y pigmentos accesorios, es una serie compleja de reacciones en las que existe transferencia de electrones de la clorofila a otras moléculas. En las algas y plantas superiores, a partir de CO_2 y H_2O , en presencia de luz se desprende oxígeno molecular y se forman compuestos hexósicos como la glucosa.



OBJETIVO

Demostrar el intercambio de gases en la fotosíntesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material por equipo:

- Recipiente transparente de 4 litros de capacidad.
- Embudo de vidrio.
- Tubo de ensaye.
- Marcador o plumón.
- Ácido acético.
- Bicarbonato de sodio.
- Fenolftaleina (1% en etanol al 60%).
- Planta acuática (Elodea o Hydrilla).

Método:

1. En el recipiente de 4 litros vaciar una solución de bicarbonato de sodio al 1% en cantidad suficiente para cubrir totalmente al embudo colocado en el fondo del recipiente. Sacar el embudo y agregar a la solución de bicarbonato un poco de solución de fenolftaleina hasta que la solución de bicarbonato se torne de color rosa tenue. Ahora, agregar gotas de ácido acético a la solución de bicarbonato hasta que pierda el color rosa, quedando incolora.

2. Introducir en la solución de bicarbonato a la planta (*elodea* o *Hydrilla*) y el embudo boca abajo, de manera que la planta quede dentro del cono del embudo.
3. Sobre el tallo del embudo colocar boca abajo un tubo de ensaye lleno de la solución del mismo recipiente.
4. Mantener todo el sistema (solución de bicarbonato, planta y embudo con tubo) en condiciones de laboratorio por 45 minutos, marcando en el tubo cada 15 minutos el espacio ocupado por la burbuja en crecimiento dentro del tubo.
5. Llevar el sistema a la luz directa del sol para marcar en el tubo, cada 15 minutos, los aumentos de tamaño de la burbuja por 45 minutos.
6. Observar posibles cambios en la coloración de la solución.
7. Con el auxilio de agua y una pipeta graduada de 1 ml (1/100), medir en el tubo de ensaye el volumen ocupado por la burbuja en cada una de las marcas.

RESULTADOS

1. Aportar los datos de la siguiente tabla.

TIEMPO (minutos)	GAS ACUMULADO EN EL TUBO (ml)	
	En el laboratorio	Luz directa del sol
15		
30		
45		

2. Construir una gráfica con los datos de la tabla anterior.
3. Mencionar los cambios observados en la solución.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué explicación tienen los cambios de coloración en la solución de bicarbonato durante el experimento?
2. ¿Qué factores del medio afectan la tasa de fotosíntesis en los vegetales?

7. IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS C₃ y C₄

INTRODUCCIÓN

Los aspectos morfológicos y anatómicos de los vegetales están estrechamente relacionados con los aspectos fisiológicos y estos a su vez dependen del ambiente en donde se habitan tales plantas.

En el proceso fotosintético de las plantas superiores se ha encontrado que existen variantes en la fijación de CO₂, que muestran aspectos que hacen más eficiente este proceso o se adaptan mejor a las condiciones de un medio cambiante.

En las plantas C₃ la RuDP tiene la desventaja de que sólo capta el CO₂ cuando hay altas concentraciones de este gas; cosa que no ocurre en las plantas C₄, donde la PEP es muy eficiente a bajas concentraciones de CO₂.

Una forma de diferenciar entre las plantas C₃ y las C₄ es a través de su anatomía, dado que las hojas de plantas C₃ presentan células de *parénquima en empalizada*, y las plantas C₄ tienen células de la vaina del haz y células del mesófilo, conformando una anatomía especial llamada *tipo Kranz*.

Otra manera de identificar ambos tipos de vegetales es por el patrón de acumulación del *almidón* en las hojas. En las plantas C₄ las células de la vaina del haz realizan el ciclo de Calvin, en cambio, en las plantas C₃ los azúcares se acumulan en las células del parénquima (empalizada y esponjoso). Por lo tanto, si se extraen los pigmentos de una hoja y se tiñe el almidón con lugol, se esperaría que en las plantas C₄ se tiñesen preferentemente las nervaduras de la lámina por lo que se formaría una especie de red; por su parte en las plantas C₃ se teñiría uniformemente la lámina.

OBJETIVOS

1. Identificar plantas C₃ y C₄ a través de el patrón de distribución de almidón en la lámina foliar.
2. Observar diferencias anatómicas entre las hojas de plantas C₃ y C₄.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material por equipo:

- Microscopio estereoscópico.
- Microscopio compuesto.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Matraz Erlenmeyer.
- Caja de Petri.
- Baño María.
- Navajas.
- Alcohol al 80%.
- Lugol.
- Hojas frescas de frijol, trigo, maíz, quelite, pasto y verdolaga.

Método:

1. Sumergir las hojas por un minuto en agua en ebullición.
2. Colocar las hojas hervidas en alcohol (al 80%) en un matraz Erlenmeyer y ponerlo en baño maría hasta que las hojas pierdan totalmente el color verde. Cambiar el alcohol del matraz cuantas veces sea necesario para lograr una extracción óptima de los pigmentos de las hojas.
3. Pasar las hojas decoloradas a una caja de petri con agua por cinco minutos.
4. Tirar el agua de la caja de petri. Cubrir las hojas, en la caja, con la solución de lugol por cinco minutos; y lavar las hojas con agua para quitarles el exceso de lugol.
5. Observar las hojas en el microscopio estereoscópico para determinar el patrón de tinción de almidón en cada una de las hojas tratadas.

Tomar otro grupo de hojas de las mismas especies de plantas que se usaron en el método de tinción de almidón y realizar cortes transversales para observar en el microscopio compuesto la anatomía transversal de cada tipo de hoja. Realizar los dibujos respectivos (o fotografías).

RESULTADOS

Patrones de tinción del almidón, observados en plantas C₃ y C₄.

Anatomía transversal de hoja, observada en plantas C₃ y C₄.

De acuerdo a las observaciones realizadas agrupar a las plantas usadas en la práctica:

Plantas C₃:

Plantas C₄:

CUESTIONARIO

1. Explicar la anatomía de las láminas foliares de plantas C₃ y C₄ en relación con su función.
2. Explicar las ventajas adaptativas de las plantas C₄ en relación con los hábitats en que se encuentran.

8. EFECTO DE LA AUXINA EN EL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ

INTRODUCCIÓN

La evidencia experimental parece indicar que el crecimiento de la raíz generalmente está controlado por la auxina. La concentración óptima de AIA necesaria para el desarrollo de la raíz es muy baja.

En la raíz, así como en otros tejidos, es muy probable que el tipo y velocidad de desarrollo depende no sólo de la presencia de fitorreguladores, sino del balance entre ellos.

OBJETIVOS

1. Observar el efecto de la auxina sobre el crecimiento de la raíz.
2. Ensayar la preparación de soluciones seriadas.

MATERIALES Y MÉTODO

Material por equipo:

- Dos probetas de 100 ml.
- Cuatro vasos de precipitado de 200 ml.
- Pipetas graduadas de 5 ó 10 ml.
- Papel aluminio.
- Regla de 30 cm.
- Solución de auxina (0.1 ppm).
- Cinco platos desechables.
- Servilletas de papel.
- 150 semillas de lechuga, germinadas.

Método:

Poner a germinar las 150 semillas de lechuga tres días antes de la práctica.

1. Marcar los cinco platos indicando la concentración de auxina en cada uno (0.00, 0.10, 0.01, 0.001 y 0.0001 ppm).
2. Colocar en cada plato una pila de 5 servilletas de papel.

3. Vaciar en cada plato, sobre las servilletas, la solución de auxina respectiva; en el plato marcado como 0.00 sólo adicionar agua.
4. De las 150 semillas germinadas, seleccionar 100 plántulas que tengan raíces de tamaños similares, y repartirlas en grupos de 20 por plato. Cubrir los 5 platos con papel aluminio y dejarlos así por 24 horas, aproximadamente.
5. Al día siguiente, medir la longitud de la raíz de cada una de las 20 plántulas de cada plato. Calcular la media para cada uno de los 5 tratamientos.

RESULTADOS

1. Completar la siguiente tabla.

Concentración de AIA (ppm)					
	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00
Media de la longitud de las 20 raíces de cada tratamiento					

2. Con los datos de la tabla construir una gráfica.
3. Discutir los resultados obtenidos.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son los principales efectos del ácido indolacético en los vegetales?
2. ¿Cuál es el objetivo de colocar en la obscuridad las semillas tratadas?
3. ¿En qué sitios de la planta se sintetiza el AIA?
4. ¿Cuál es un posible mecanismo de formación del AIA?

9. EFECTO DEL ÁCIDO GIBERÉLICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE UNA PLANTA TIPO ROSETA

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las actividades fisiológicas de los vegetales están reguladas por un conjunto de sustancias denominadas fitorreguladores o reguladores del crecimiento, cuyos efectos en las plantas son variados.

El estudio de los efectos de estos fitorreguladores ha permitido conocer algunos aspectos de la fisiología de las plantas, y su utilización ha beneficiado al campo de la agricultura.

OBJETIVOS

1. Observar el efecto del ácido giberélico en una planta tipo roseta.
2. Ensayar la preparación de soluciones seriadas.

MATERIALES Y MÉTODO

Material por equipo:

- Dos probetas de 100 ml.
- Cuatro vasos de precipitado de 200 ml.
- Dos pipetas graduadas de 5 ó 10 ml.
- Solución de ácido giberélico, a 100 ppm.
- 6 platos desechables.
- Servilletas de papel.
- 200 semillas de lechuga, germinadas.

Método:

Poner a germinar 200 semillas de lechuga tres días antes de la práctica. A partir de la solución de ácido giberélico de 100 ppm preparar cuatro diluciones: 10.0 ppm, 1.0 ppm, 0.1 ppm y 0.01 ppm.

1. Marcar los seis platos indicando la concentración de ácido giberélico en cada uno (100.0, 10.0, 1.0, 0.1, 0.01 y 0.00 ppm).
2. Colocar en cada plato una pila de 5 servilletas de papel.

3. Vaciar en cada plato, sobre las servilletas, la solución de ácido giberélico respectiva; en el plato marcado como 0.00 sólo adicionar agua.
4. De las 200 semillas germinadas, seleccionar 120 plántulas que tengan tamaños similares, y repartirlas en grupos de 20 por plato. Cubrir cada uno de los platos con otro plato y dejarlos bajo luz difusa por 5 días, aproximadamente. Diariamente revisar que las servilletas tengan suficiente humedad, sí no, adicionar un poco de agua.
5. Al final de los cinco días medir la longitud de los 20 hipocotilos de cada tratamiento. Calcular la media para cada uno de los 6 tratamientos.

RESULTADOS

Completar la siguiente tabla:

	Concentración de ácido giberélico (ppm)					
	100	10	1	0.1	0.01	0.00
Media de la longitud de 20 hipocotilos						

Con los datos de la tabla anterior construir una gráfica.

CUESTIONARIO

1. ¿Por qué se usan semillas de lechuga en este experimento?
2. Discutir los resultados.
3. ¿Qué otros efectos tiene el ácido giberélico en los vegetales?
4. Menciona las aplicaciones del ácido giberélico en la agricultura.

10. GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE PLANTAS SUPERIORES

INTRODUCCIÓN

La germinación de las semillas consiste en la reiniciación del desarrollo del embrión hasta el establecimiento de la plántula. El tiempo que la semilla conserva su capacidad para germinar (viabilidad), una vez que es producida por la planta, depende principalmente de la especie, aunque también influyen factores externos. Es común expresar la *viabilidad* en porcentaje de semillas germinadas a determinada edad.

Muchas semillas viables germinan tan pronto se presentan las condiciones externas favorables (humedad, temperatura o luz), mientras que otras no lo hacen debido a factores internos, es decir, tales semillas presentan *latencia*. Esta latencia puede deberse a varios mecanismos como: dureza de la testa, inhibidores químicos, requerimiento de un periodo de baja temperatura (estratificación), o impermeabilidad de la testa al oxígeno y al agua.

OBJETIVOS

1. Determinar viabilidad en semillas.
2. Demostrar el efecto de la impermeabilidad de la testa durante la latencia.
3. Comprobar el efecto de inhibidores y estimuladores químicos sobre la germinación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material por equipo:

- Siete platos desechables.
- Navajas
- Servilletas de papel.
- Solución de NaCl 0.3 M. (PM/10 x 3/1000ml)
- Solución de Tiourea al 0.5%. (5g/1000ml)
- Solución de 2, 3, 5 trifenil-tetrazolium (0.2%). (0.1g/50ml)
- 50 semillas de alfalfa.
- 50 semillas de cebada.
- 200 semillas de lechuga.

Métodos:

A) *Determinación de viabilidad.*

1. Seleccionar 20 semillas de **cebada**, previamente sumergidas en agua por un mínimo de 2 horas.
2. De las veinte, colocar 10 en un plato que contenga 5 servilletas de papel y adicionarles agua. Cubrir el plato con papel aluminio y luego de 4 días verificar el porcentaje de germinación.
3. Las 10 semillas restantes cortarlas por la mitad y colocarlas en una caja de petri; adiciona la solución de **Tetrazolium** sobre las semillas partidas y cubrir la caja con papel aluminio. Luego de una hora contar las semillas que se tiñeron de un color rojizo.

B) *Efecto de la testa sobre la latencia.*

1. Seleccionar 20 semillas de **alfalfa** y, de estas, colocar 10 en un plato que contenga 5 servilletas de papel y adicionar agua suficiente para humedecerlas.
2. A las 10 semillas restantes practicarles una pequeña **fisura** en la testa, procurando no cortar al embrión, y colocarlas en plato con 5 servilletas de papel húmedas.
3. Cubrir ambos platos con papel aluminio; y a los 7 días verificar y registrar los porcentajes de germinación de ambos tratamientos.

C) *Efecto de compuestos químicos sobre la germinación.*

1. Colocar en un plato 5 servilletas de papel y, sobre estas, colocar 50 semillas de **lechuga**; ahora adicionar la solución de **tiourea** sobre las semillas. Cubrir el plato con papel aluminio y a las 24 horas cambiar las 50 semillas a otro plato que contenga servilletas de papel humedecidas sólo con agua, cubriendo nuevamente el plato con papel aluminio.
2. En otro plato colocar 5 servilletas de papel y 50 semillas de lechuga, adicionando la solución de **NaCl** y cubrir el plato con papel aluminio.
3. En un plato más, colocar 5 servilletas de papel y 50 semillas de lechuga, humedeciendo las servilletas sólo con agua y, por último, cubrir el plato con papel aluminio.
4. A los tres días, registrar los porcentajes de germinación de cada uno de los tres tratamientos.

RESULTADOS

Suministrar los datos requeridos en las siguientes tablas.

Semillas de CEBADA

	Prueba directa (germinación)	Prueba indirecta (tetrazolium)
VIABILIDAD (%)		

Semillas de ALFALFA

	Semillas sin fisura	Semillas con fisura
GERMINACIÓN (%)		

Semillas de LECHUGA

	Tiourea	NaCl	Agua
GERMINACIÓN (%)			

CUESTIONARIO

1. ¿Por qué se tornan rojizas las semillas tratadas con tetrazolium?
2. Interpreta los resultados sobre el efecto de la testa en la latencia.
3. ¿Cuáles fueron los efectos de la tiourea y el NaCl sobre la germinación?

11. MEDIOS DE CULTIVO PARA TEJIDOS VEGETALES Y SU PREPARACIÓN

INTRODUCCIÓN

Un medio de cultivo es una solución que proporciona los elementos y sustancias que requiere un tejido u organismo para mantener alguna o todas sus funciones biológicas. Para el cultivo de tejidos vegetales existen diversos medios establecidos, dependiendo del uso u objeto de estudio (MS, B5 y White, descritos en la Tabla 1).

Por lo tanto, los medios de cultivo pueden variar en la composición química y en el estado físico requerido (sólidos, semisólidos o líquidos). También se les clasifica según la finalidad para la que se destine el medio:

- Medios de adaptación.
- Medios de multiplicación.
- Medios de enraizamiento.
- Medios de conservación.

En general, un medio de cultivo está constituido por macro y micronutrientes, azúcares, vitaminas, aminoácidos, y por reguladores de crecimiento vegetal, los cuales siempre se disuelven en agua desionizada.

Para la obtención de medios semisólidos se requiere adicionar un gelificante (agar) en concentraciones que van desde 0.60 % hasta 1.2 %. El pH del medio debe estar entre 5.7 y 5.8, aunque este puede variar conforme al objetivo del estudio.

La preparación de los medios de cultivo comprenden los siguientes pasos generales:

1. Cálculo y peso de reactivos.
2. Preparación de soluciones concentradas.
3. Preparación del medio de cultivo.
4. Calibración del pH.
5. Adición del agar.
6. Envasado del medio de cultivo.
7. Esterilizado.

Soluciones concentradas.

Las soluciones concentradas son esenciales dado que se almacenan en refrigeración y facilitan la preparación de los medios. En la Tabla 2 se muestra una lista de preparación de soluciones concentradas (con agua desionizada) para la elaboración del medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

TABLA 1

CONSTITUYENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO MS, B5 y WHITE
(mg/l)

COMPONENTE	<i>MS</i>	<i>B5</i>	<i>WHITE</i>
(NH ₄) SO ₄		134	
(NH ₄) NO ₃	1650		
KNO ₃	1900	2500	80
Ca (NO ₃) ₂			300
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	150	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	250	720
Na ₂ SO ₄			200
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O		150	16.5
KCl			65
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	27.8	
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	
Fe ₂ (SO ₄) ₃			2.5
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3		7.0
MnSO ₄ · H ₂ O		10.0	
ZnSO ₄ · H ₂ O	8.6	2.0	3.0
H ₃ BO ₃	6.2	3.0	1.5
HI	0.83	0.75	0.75
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.25	
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.025	
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.025	
Myo-Inositol	100	100	
Ac. Nicotínico	0.5	1.0	0.5
Piridoxina HCl	0.5	1.0	0.1
Tiamina HCl	0.1	10.0	0.1
Glicina	2.0	3.0	
Ac. Pantoténico			1.0
Sacarosa	30,000	20,000	20,000
Ph	5.7 - 5.8	5.5	5.5

Preparación de reguladores de crecimiento.

Los reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) se preparan en soluciones concentradas y deben mantenerse a temperatura de congelación. Se pueden preparar en moles o en mg/l.

- Preparación de auxinas (AIA, ANA, 2,4-D, AIB).

Se pesan en tubos de ensaye, se añaden gotas de solución básica (KOH 1N), y se agita suavemente hasta disolución total. Finalmente, aforar con agua desionizada.

- Preparación de citocininas (BA, KIN, 2iP)

Se pesan en tubos de ensaye, se añaden gotas de solución ácida (HCl 1N), se agita suavemente hasta la disolución total. Por último, aforar con agua desionizada.

TABLA 2

SOLUCIONES CONCENTRADAS PARA EL MEDIO MS

SOLUCIÓN Reactivos	Volumen (ml)	Cantidad (g)	Alícuota (ml) ¹
SOLUCIÓN I CaCl ₂ · 2H ₂ O	50	25	1
SOLUCIÓN II MgSO ₄ · 7H ₂ O KH ₂ PO ₄	250	9.25 4.25	1
SOLUCIÓN III FeSO ₄ · 7H ₂ O Na ₂ EDTA	100	0.577 0.745	5
SOLUCIÓN IV MnSO ₄ · 4H ₂ O ZnSO ₄ · 7H ₂ O H ₃ BO ₃ KI Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O CuSO ₄ · 5H ₂ O CoCl ₂ · 6H ₂ O	100	1.69 1.059 0.62 0.083 0.025 0.0025 0.0025	1
SOLUCIÓN V (*) Myo-Inositol Ac. Nicotínico Piridoxina HCl Tiamina HCl Glicina	250	2.5 0.0125 0.0125 0.0025 0.05	10
SOLUCIÓN VI (NH ₄) NO ₃ KNO ₃	250	41.25 47.50	10

(*): Guardar la solución a temperatura de congelación.

1: Cantidad en ml para preparar 1000 ml de medio.

Métodos de cultivos *in vitro* para la micropropagación.

Seleccionar las plantas donadoras de explantes (segmentos de plantas), las cuales deben presentar características óptimas de cultivo, libres de enfermedades y en estado de baja productividad (poca proliferación de brotes, flores o frutos). Los explantes a usar en la micropropagación también deben ser cuidadosamente seleccionados. Esto significa usar explantes o tejido cuyo grado de diferenciación se asemeje al tejido parenquimatoso, es decir, tejidos con células que presentan poca lignificación y poco grado de vacuolización.

Se han utilizado explantes de toda la planta:

- Yemas, meristemos, peciolas, hoja y tallo
- Cotiledones y embriones
- Anteras, ovarios, polen, raíz, etc.

Actualmente se dispone de bastante literatura sobre especies propagadas *in vitro*, donde se reportan el medio empleado, el tipo de explante usado, las condiciones de esterilización, de incubación y de esterilización. Cuando se trabaja con especies silvestres o de las cuales no hay información, debe de iniciarse con la experimentación de los denominados “barridos hormonales”, usando diferentes tipos de explantes, medios de cultivo, reguladores de crecimiento y condiciones de cultivo.

Preparación del área de siembra.

La preparación del área de siembra es una tarea sencilla pero requiere se realice con diligencia y exactitud para prevenir al máximo la contaminación. Ya sea que se cuente con campana de flujo laminar o con algún sustituto (mecheros de flama alta), se recomienda observar las siguientes precauciones:

1. El área debe estar aislada de corrientes de aire y del tránsito de personas.
2. El área debe ser de materiales fáciles de limpiar.
3. Debe poseer excelente iluminación.
4. Contar con mecheros de gas, mecheros de alcohol, herramientas de disección, algodón y etanol al 70%.

Lavado y desinfección del explante.

Independientemente del tipo de explante, para su lavado y desinfección se utiliza un detergente biodegradable (extrán), agente germicida (alcohol etílico) y el agente desinfectante hipoclorito de sodio (cloro comercial). Los rangos de concentración y tiempos de exposición más usados son:

Sustancia	Concentración	Tiempo de tratamiento (minutos)
EXTRÁN	5 gotas/100 ml	5
ETANOL	70%	2-5
HIPOCLORITO DE SODIO	10-20% de concentración comercial	10-20

Luego de la desinfección, los explantes se someten a lavados continuos (3) con agua destilada estéril en el área aséptica.

Disección del explante.

Los cortes deben realizarse en el área aséptica sobre cajas de petri, tomando las siguientes precauciones:

- Hacer los cortes entre 0.1 y 0.5 cm de tamaño
- Evitar dañar severamente al explante
- Evitar oxidación y deshidratación
- Sembrar rápidamente en el medio de cultivo respectivo

Condiciones de incubación.

Las condiciones de incubación dependerán de la respuesta esperada, del tipo de explante, y de la especie vegetal; aunque las condiciones generales son de 16 h de luz de lámpara fluorescente y 25° C. En ocasiones se requiere oscuridad.

OBJETIVO

Conocer y ensayar una técnica para la preparación de medios de cultivo, para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material por equipo

- Autoclave
- Vaso de precipitados de 500 ml
- Matraz Erlenmeyer de 500 ml
- Agitador
- Balanza
- Pipetas
- Papel aluminio grueso
- 10 frascos tipo "Gerber"
- KOH 1N

Medio B

250 ml de medio nutritivo MS + 1 mg/l ANA + 1mg/l BA

0.7 g de agar/100 ml

3 g de sacarosa/100 ml

pH 5.75

En un vaso de precipitado de 500 ml vaciar 200 ml de agua desionizada y añadir las alícuotas de las soluciones concentradas (según se indica en la Tabla 2), agregar la sacarosa, agitar, adicionar 0.25 ml de ANA (1 mg/l) y 0.25 ml de BA (1 mg/ml), medir pH (ajustar con KOH 1N), aforar a 250 ml y en un matraz erlenmeyer de 500 ml agregar el agar. Fundir por 1 minuto a 121° C y 1.5 kg/cm² de presión. Vaciar en frascos "Gerber" (20 ml/frasco), sellar con papel aluminio doble y esterilizar por 20 minutos a 121° C y 1.5 kg/cm² de presión.

RESULTADOS

Indicar el porcentaje de contaminación de tus frascos con medio de cultivo.

CUESTIONARIO

1. ¿Por qué se usa agua desionizada en la preparación de las soluciones concentradas?
2. ¿Cuál etapa puede considerarse como más crítica o compleja en la preparación de los medios de cultivo?, y ¿Por qué?

LITERATURA CONSULTADA

12. OBTENCIÓN DE BROTES POR CULTIVO *in vitro* DE HOJA

INTRODUCCIÓN

A pesar de que todos los cultivos de tejidos se originan de órganos o de sus secciones, la organización del progenitor no siempre se mantiene durante el desarrollo *in vitro*. Sin embargo, un cultivo de órganos tiene el objetivo de alcanzar, a partir de una estructura organizada, la morfología y la fisiología que lo identifican con los órganos de su especie.

La mayoría de los trabajos se han realizado con primordios de hojas de helecho canela (*Osmunda cinnamomea*), además de primordios muy pequeños de plantas como el "Girasol" (*Helianthus sp*) y el "Tabaco" (*Nicotiana sp*). Los primordios de hoja requieren de un medio nutritivo muy simple para completar su desarrollo.

Las hojas que crecen en cultivo desde el primordio hasta la madurez tienen una forma típica, pero disminuyen tanto en tamaño como en su complejidad morfológica. La reducción en tamaño es el resultado de un decremento en el número celular y no en el tamaño de las células.

El cultivo de hojas se ha usado también en la propagación masiva. Por ejemplo, en el "cafeto" se usan secciones de hoja para obtener embriones somáticos vía formación de un callo intermediario; y con secciones de hoja de "violeta africana" se ha experimentado para obtener brotes, y posteriormente enraizarlos para una multiplicación clonal rápida.

OBJETIVOS

1. Observar los diferentes estados de desarrollo y la formación de órganos, tales como brotes y raíces, en respuesta al desarrollo de las secciones de hoja de "violeta africana".
2. Demostrar el potencial morfo genético del tejido de hoja en esta especie vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material por equipo

- 3 vasos con agua destilada estéril
- Un matraz Erlenmeyer de 100 ml
- Una probeta de 100 ml

- Un vaso de precipitado de 100 ml
- 2 cajas Petri estériles
- 2 hojas grandes de “violeta africana”
- Frascos con Medio B

Se usarán hojas jóvenes de violeta africana, de apariencia sana y que no estén dañadas de la lámina; también se utilizarán los peciolo.

Desinfección de las hojas.

Lavarlas con Extrán (5 gotas en 100 ml de agua) por 5 minutos, sumergirlas en etanol al 70% por 2 minutos y, sumergirlas en cloro comercial al 10% por 10 minutos. Por último, en área aséptica, enjuagar 3 veces con agua destilada estéril.

Siembra del explante.

En una caja de petri, hacer cortes de hoja de aproximadamente 1 cm², redondos o cuadrados, y sembrar 5 de estos cortes en la superficie del medio de cada frasco. Tapar los frascos con papel aluminio doble y sujetarlo con “*Kleen Pack*”. Incubar en luz a 25° C.

RESULTADOS

Reportar para cada frasco los cambios ocurridos, cada cuatro días, en los fragmentos de hoja sembrados en el medio, hasta cubrir un total de 28 días.

CUESTIONARIO

1. ¿Por qué se usan hojas de violeta?
2. ¿Con qué objetivo se desinfectan las hojas?
3. Cita otras cinco especies vegetales que pudieran usarse en el cultivo *in vitro* de plantas.

LITERATURA CONSULTADA