

# **GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS**



**FISIOLOGÍA VEGETAL**

**F.C.E.F. y N. - U.N.C.**

# AÑO 2025

## Material necesario para los trabajos prácticos

### Individual:

Guardapolvo

### Por mesada:

Tijera

Trincheta o bisturí

Regla

Cepillo limpia tubo

Marcador indeleble

Cucharas descartables

Trapo rejilla

# **Trabajo Práctico 1**

## **INTRODUCCIÓN**

### **Guía de estudio**

- 1- ¿Qué parámetros pueden utilizarse para medir el crecimiento en plantas?
- 2- ¿Qué entiende por nutrición mineral? Defina macro y micro nutrientes.
- 3- ¿Qué define a un elemento mineral como esencial?
- 4- Explique brevemente en que consiste la fijación biológica de nitrógeno
- 5- ¿Qué es la concentración de una solución?
- 6- Indique qué representa cada una de las siguientes formas de expresar la concentración de una solución: % P/P (porcentaje peso en peso), % P/V (porcentaje peso en volumen), M (Molaridad), N (Normalidad)
- 7- Explique cómo prepararía a partir de una solución madre de NaCl 45 % P/V:  
25 ml de una solución de NaCl 65 ppm  
15 ml de una solución de NaCl 25  $\mu$ M
- 8- ¿Cuánto debería pesar de sacarosa para preparar...  
...250 ml de una solución 30 mM?  
...500 ml de una solución 75% P/V?

### **Experimento 1. Efecto de la aplicación foliar del biofertilizante Supermagro sobre el crecimiento, desarrollo y parámetros de interés comercial en plantas de lechuga**

#### **Objetivo**

Diseñar e implementar una experiencia que permita evaluar el efecto de la aplicación foliar de biofertilizantes sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de lechuga.

#### **Materiales**

**Fertilizante foliar Supermagro**



## Actividad 1. Diseño de experimento

En forma grupal planteen una hipótesis y objetivos de trabajo. Luego diseñen un experimento que les permita poner a prueba dicha hipótesis.

## Actividad 2. Trasplante

Realizar el trasplante de plantines siguiendo el siguiente esquema:

Material vegetal: Plantines de lechuga var. Grand Rapid

Sustrato: Tierra/vermiculita 3:1

Unidad experimental: macetas de 1 lt con una planta

Réplicas: 10 (5 de cada tratamiento/comisión)

Tratamiento: Aplicación foliar (por pulverización) semanal de una solución de supermagro al 5% o agua en el control. Comienzo de la pulverización 7 días después del trasplante

## Mediciones

Variables	Procedimiento	Frecuencia
Numero de hojas	Contar desde la más vieja, hasta la hoja más nueva TOTALMENTE DESPLEGADA	Semanalmente durante el TP
Verdor	Comparar con carta colorimétrica y registrar el código que asuma la 2° hoja más nueva.	A cosecha
Peso fresco y seco	Tomar el peso individual de cada plantín	A cosecha
Superficie foliar total	Por análisis de imágenes Software ImageJ	A cosecha

## Experimento 2. Efecto de diferentes formas de aplicación de biofertilizante supermagro como promotor de la germinación de diferentes especies

Realizaremos estas experiencias a lo largo del semestre. Para comenzar realizaremos este esquema:

Tratamiento: Imbibición en supermagro al 2% o en agua, por 24 hs en frío

Siembra: sobre cama de papel húmedo en cápsula de Petri

30 semillas por cápsula, 4 cápsulas por tratamiento

Contar cantidad de semillas germinadas por día, tomando como criterio de germinación la presencia de cotiledones abiertos

## Experimento 3. Rol de la fijación biológica del nitrógeno en el crecimiento de *Glicine max* (soja)

### Objetivo

Diseñar e implementar una experiencia que permita estudiar el rol de la FBN en el crecimiento de plantas de soja.

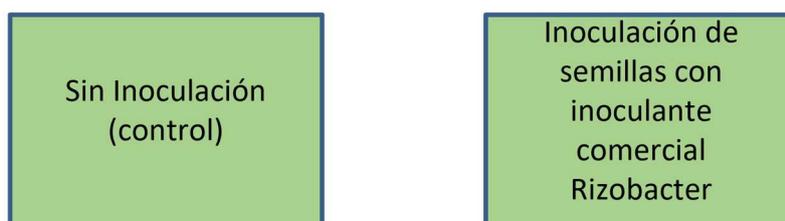
## Actividad 1. Diseño de experimento

En forma grupal planteen una hipótesis y objetivos de trabajo. Luego diseñen un experimento que les permita poner a prueba dicha hipótesis

## Actividad 2. Siembra e inoculación

Realizar el trasplante de semillas pre germinadas siguiendo el siguiente esquema:

- ✓ Material vegetal: semillas de soja
- ✓ Sustrato: Vermiculita
- ✓ Unidad experimental: Vaso con 1 planta
- ✓ Réplicas: 4 plantas de c/tratamiento por comisión
- ✓ Tratamientos: Inoculadas y sin inocular. Inoculo comercial Rizobacter



### Tratamientos

Luego del trasplante de semillas pre germinadas aplicar 1 mL de inoculante líquido a una distancia de 1 cm de la semilla.

### Mediciones

Las mediciones se realizarán para cada variable con la frecuencia que se indica en la siguiente tabla.

<b>Variables</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>Frecuencia</b>
<b>Número de nudos</b>	Contar desde la más vieja, hasta la hoja más nueva TOTALMENTE DESPLEGADA	Semanalmente
<b>Número de hojas</b>	Contar desde la más vieja, hasta la hoja más nueva TOTALMENTE DESPLEGADA	Semanalmente
<b>Altura</b>	Tomar desde la base del plantin hasta la hoja más alta	Semanalmente
<b>Peso fresco aéreo</b>	Tomar el peso individual de cada planta	A cosecha

<b>Peso fresco radical</b>	Tomar el peso individual de cada planta	A cosecha
<b>Peso fresco de nódulos</b>	Tomar el peso individual de cada planta	A cosecha
<b>Número de nódulos</b>	Contar el numero individual de cada planta	A cosecha
<b>Peso seco aereo</b>	Tomar el peso individual de cada planta	A cosecha luego de secar en estufa
<b>Peso seco radical</b>	Tomar el peso individual de cada planta	A cosecha luego de secar en estufa

# Trabajo Práctico 2

## ESTADO HÍDRICO Y SU DETERMINACIÓN

### Contenidos

Potencial químico del agua, potencial hídrico, osmótico y de pared: concepto. Relaciones entre ellos. Métodos para determinar el potencial hídrico de un tejido: fundamentos.

Parámetros de estado hídrico de un tejido: CRA, DSH y % agua: conceptos y determinación. Déficit hídrico: concepto.

Presión de turgencia: concepto e importancia. Déficit hídrico, capacidad de campo, marchitamiento temporario y permanente: conceptos.

### Objetivos

- Conocer y comparar diferentes metodologías para la determinación del estado hídrico de los tejidos.
- Determinar el potencial hídrico mediante diferentes métodos en tejidos con diferente grado de hidratación
- Determinar el CRA, DSH y % agua en plantas sometidas a diferentes condiciones ambientales

### Actividades para realizar previo al Trabajo Práctico

- **Realizar las actividades propuestas en el material complementario,** disponible en la sección Práctico 2. Balance Hídrico del aula virtual.
  - **Guía de estudio**
- 1- ¿Qué parámetros pueden ser utilizados para describir el estado hídrico de una planta?
  - 2- Explique los siguientes conceptos: Difusión, osmosis
  - 3- ¿Qué condición determina el movimiento del agua a larga y corta distancia?
  - 4- ¿Qué es la presión de turgencia? ¿Por qué es importante en células vegetales?
  - 5- ¿Cómo definiría el concepto de déficit hídrico?

# Actividades para realizar durante el Trabajo Práctico

**Actividad 1. Análisis del estado hídrico mediante la determinación de: Contenido relativo de agua (CRA), Déficit de saturación hídrica (DSH) y % de agua.**

## **Materiales**

Tejido vegetal con distinto grado de hidratación

## **Procedimiento**

- 1- Pesar y registrar el peso fresco del material vegetal.
- 2- Colocar el mismo tejido en una capsula de Petri saturada de humedad.
- 3- Embeber todo el material y dejarlo a saturación por 1.5 h.
- 4- Luego de las 2 h tomar el peso saturado.
- 5- Preparar una canasta de papel de aluminio.
- 6- Colocar el tejido en la canasta.
- 7- Colocar en estufa a 80° C hasta obtener peso seco constante.
- 8- Tomar el peso del tejido (Peso Seco)

Calcule el Contenido Relativo de Agua (CRA), Déficit de saturación hídrica (DSH) y % de agua teniendo en cuenta las siguientes ecuaciones.

PF= Peso fresco  
PS= Peso seco  
PSat= Peso saturado  
CRA= Contenido relativo de agua  
DHS= Deficit de saturacion hidrica

$$\% \text{ de Agua} = \frac{\text{Peso Fresco} - \text{Peso Seco}}{\text{Peso Fresco}} \times 100$$

$$\text{CRA} = \frac{\text{Peso Fresco} - \text{Peso Seco}}{\text{Peso Saturado} - \text{Peso Seco}} \times 100$$

$$\text{DSH} = \frac{\text{Peso Saturado} - \text{Peso Fresco}}{\text{Peso Saturado} - \text{Peso Seco}} \times 100$$

## **Actividad 2. Determinación del potencial hídrico usando el método densitométrico de Chardakov.**

### **Procedimiento:**

- 1- Preparar 20 ml de las siguientes concentraciones de sacarosa: 0- 0.15- 0.30- 0.6 M (a partir de una solución madre 1 M). Calcular el potencial hídrico de cada una
- 2- En cada uno de los casos (distintas concentraciones) colocar 5 ml en un tubo de ensayo, y 10 ml en otro. Rotular los tubos.
- 3- A los 5 ml agregar 1 ínfima gota de azul de metileno y mezclar.
- 4- Colocar el material vegetal (provisto por el docente) en cada tubo de las soluciones no coloreadas (10 ml). Dejar en la solución 1.5 h.
- 5- Remover el material de los tubos.
- 6- Tomar una gota de la solución coloreada con una pipeta y lentamente colocarla en el centro de las soluciones no coloreadas. Observar el comportamiento de la gota y tomar nota de lo que ocurre.

### **Nota:**

El potencial hídrico de las soluciones se relaciona con su concentración mediante la ecuación de VantHoff:

$$\text{Potencial Hidrico} = -miRT$$

dónde:

- m: molalidad de la solución
- i: Es la constante de disociación del soluto (1 para la sacarosa)
- R: Constante de los gases  $8,31 \text{ m}^3\text{PaK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
- T: Temperatura absoluta en grados kelvin ( $^{\circ}\text{C}+273,15$ )

# Trabajo Práctico 4

## REGULACIÓN DE LA FOTOSÍNTESIS POR INTENSIDAD DE LUZ- METABOLISMOS FOTOSINTÉTICOS

### Contenidos

Fotosíntesis. Ubicación subcelular del proceso y ecuación química general.

Reacción clara: Ubicación. Pigmentos Fotosintéticos: función. Los fotosistemas y las reacciones asociadas a ellos: El papel de la luz. Cadena de transporte de electrones: componentes, funcionamiento y productos: principales características.

Reacciones de fijación de CO<sub>2</sub>: Ubicación en el cloroplasto. Productos. La utilización de los productos de la reacción clara en la fijación y reducción del CO<sub>2</sub>.

Punto de compensación de la luz y el CO<sub>2</sub>: Concepto, gráficos.

Plantas C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y CAM: Principales características morfológicas y fisiológicas.

Factores ambientales que regulan la fotosíntesis.

### Objetivos

-Conocer de qué manera la intensidad de luz afecta la tasa fotosintética, trabajando en forma de investigación dirigida

- Determinar, mediante técnicas de laboratorio, el tipo de metabolismo fotosintético de diferentes especies.

### Guía de estudio

1- ¿Qué tipo de reacción bioquímica es la fotosíntesis?

2- ¿Qué son y qué función cumplen los pigmentos fotosintéticos?

3- ¿Qué tipos de pigmentos forman parte del complejo antena?

4- ¿Cómo se define el complejo de evolución de oxígeno? ¿Cuál es su función general dentro del proceso fotosintético?

- 5- ¿Qué entiende por fase clara y fase oscura de la fotosíntesis? ¿Dónde se lleva a cabo cada una de ellas?
- 6- Explique el concepto de punto de compensación de CO<sub>2</sub>.
- 7- ¿Qué factores ambientales influyen sobre la fotosíntesis?
- 8- Indique las diferencias anatómicas y funcionales entre los metabolismos C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y CAM.
- 9- Teniendo en cuenta la ecuación general de la fotosíntesis, ¿qué parámetros pueden ser utilizados para medir este proceso?

## **Actividad 1. Determinación de CO<sub>2</sub> consumido**

### **Material vegetal**

Plantas de maíz crecidas en condiciones de luz óptimas y baja intensidad lumínica. Estas plantas serán provistas por el docente. Los tratamientos se realizaron siguiendo el esquema presentado en la sección "Diseño del experimento".

### **Procedimiento**

- 1- Coloque en dos tubos de ensayo grandes 3 ml de solución indicadora.
- 2- Presente el soporte de telgopor en la boca del tubo.
- 3- Plante las plantas en el telgopor del lote de baja intensidad, previamente cortadas según instrucción del docente.
- 4- Con mucho cuidado empuje el soporte de modo que las hojas queden dentro del tubo.
- 5- Tapar los tubos con film adherente.
- 6- Incubar por 1.5 h, uno de los tubos expuesto a alta y el otro a baja intensidad lumínica. Para cada una de las condiciones de luz se agregará un tubo que contenga solo la solución indicadora (por comisión).
- 7- Registrar el color observado.

<b>Incubación</b>	<b>Color</b>
Baja Intensidad Trat.	
Baja Intensidad Control	
Alta Intensidad Trat.	
Alta intensidad Control	

## **Actividad 2. Fluorescencia con luz UV**

Realizar un extracto alcohólico, colocando 4 segmentos foliares (3 cm de largo) de hojas de maíz en un tubo de ensayo con 8 mL de alcohol etílico 70%. Tapar con papel de aluminio y calentar a 80° C (cuidar la temperatura!!!) hasta que las hojas estén decoloradas. Dejar enfriar y retirar las hojas.

Iluminar el extracto alcohólico con luz visible y luego, en oscuridad, con luz UV. Registrar y discutir lo observado.

Se puede repetir el procedimiento de iluminación con otras sustancias: Agua tónica vs agua de red, extracto de cúrcuma... (revisar material de fluorescencia en Anexo1).

## **Actividad 3. Determinación de la acidez de los tejidos para inferir el tipo de metabolismo fotosintético**

Determinar los valores de pH y concentración de ácidos orgánicos en hojas de distintos tipos de plantas tomadas en dos momentos del día:

- a) Al amanecer (plantas de noche)
- b) Al anochecer (plantas de día)

**Procedimiento** (Se repite para cada lote de planta)

1- Tomar 10 gr de hoja y machacar en un mortero junto con 5 ml de agua destilada. El líquido resultante se filtra y se recoge en un tubo de centrifuga. Se añaden al mortero otras 5 ml de agua destilada y se repite la operación. Este paso se repite para cada muestra, lavando el mortero entre cada procedimiento. Los extractos resultantes se centrifugna a 2000 rpm durante 5 min. Si transcurrido este tiempo el sobrenadante no se ve transparente, se repite la operación.

2- Rescartar el sobrenadante y medir su pH

3- Para medir la concentración de ácidos orgánicos, el extracto se diluye hasta aproximadamente 50 ml con agua destilada y se le añaden unas gotas de

fenolftaleína. Esta solución se valora añadiéndole, NaOH 0.01 N hasta que aparezca una coloración rosa.

4- Para calcular el % de ácido málico de cada muestra utilice la siguiente fórmula

$$\% \text{ Ácido Málico} = \frac{(\text{ml NaOH utilizados}) (\text{Concentración del NaOH})}{(0.067) (\text{Vol. total}) (100)} \cdot \frac{100}{(\text{Peso de la muestra}) (\text{Vol. de la alícuota})}$$

Donde: % **Ácido málico**, es el porcentaje de ácido málico contenido en la solución por cada 100 unidades de tejido fresco

**ml NaOH** utilizados, son los ml de hidróxido de sodio gastados hasta observar el cambio de color de la solución

**Vol. total**, son los ml de la solución en los que se maceró la muestra;

**100** es el factor para expresar el resultado en porcentaje;

**Peso de la muestra**, corresponde a la (masa) en gramos (g) **Vol. de la alícuota**, corresponde a los mL de solución individual valorada.

## Trabajo Práctico 4

### COLOQUIO INTEGRADOR 1

# Trabajo Práctico 5

## CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES EN TILACOIDES AISLADOS

### Objetivos

- Estudiar el transporte de electrones en tilacoides aislados en presencia de aceptores alternativos de electrones e inhibidores del transporte fotosintético de electrones.

### Guía de estudio

- 1- Realice un esquema de la cadena de transporte electrónico fotosintético.
- 2- Defina la reacción de Hill.
- 3- Investigue el mecanismo de acción del DCMU (diuron) y el MetilViológeno MV (paraquat) en la cadena de transporte de electrones fotosintético
- 4- Grafique en la cadena del punto 1 el sitio donde actúan el DCMU y el MV.
- 5- Explique el fundamento de la espectrofotometría de absorción. Concepto de error espectrofotométrico y su solución.
- 6- En ese tipo de técnicas ¿qué utilidad tiene, y como se prepara un tubo testigo, un tubo problema y un tubo blanco?
- 7- ¿Qué es y cómo se construye una curva patrón?

### Actividad 1. Preparación de la suspensión de tilacoides

#### Material vegetal

Hojas de espinaca, hidratadas e incubadas en luz 24 hs. antes del experimento. Este material será provisto por el docente

#### Procedimiento

- 1- Colocar en la jarra de la licuadora 20 g de acelga (retirar las nervaduras) o espinaca y 40 ml de buffer de ruptura FRIO.
- 2- Licuar hasta que quede una pasta homogénea. Colar en un filtro de gaza (previamente humedecido con buffer de ruptura o con agua destilada fría).
- 3- Centrifugar 1 min a 8000 g (2 min a 6000). Tirar el sobrenadante.
- 4- Resuspender el pellet en 15 ml de medio de lavado FRIO.

- 5- Centrifugar 3 min a 300 g. Rescatar el sobrenadante.
- 6- Centrifugar 10 min a 1000 g (5 min a 2000). Rescatar el precipitado.
- 7- Resuspender el pellet en 20 ml de medio de lavado FRIO, y conservarlo refrigerado.

La suspensión de tilacoides siempre debe mantenerse refrigerada

8- Cuantificar clorofilas: Leer la DO a 420 nm. y realizar las diluciones necesarias para obtener una suspensión de tilacoides de absorbancia = 1.

## Reacciones

### Calibración previa

Antes de comenzar las reacciones se realizará una prueba de velocidad de reacción con distintos volúmenes de suspensión de tilacoides, para ajustar su concentración:

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
Buffer (de reacción)	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Suspensión de tilacoides	1 ml	0.75 ml	0.5 ml	0.25 ml
DCPIP	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl

Incubar 10 min a la luz y leer la DO a 590 nm

Una vez ajustada la concentración (volumen de la suspensión de tilacoides que utilizaremos), complete la columna de susp. de tilacoides del "Protocolo de trabajo".

## Reacciones propiamente dichas

Siguiendo el siguiente protocolo llevar a cabo las reacciones en cubetas plásticas rotuladas con la letra a, b, c, d, e o f según corresponda

### Protocolo de trabajo

Cubeta	tilacoides	Buffer	DCPIP	DCMU	MV	Agua	Luz
A		2 ml				75 µl	+
B (osc.)		2 ml	75 µl			-	-

C		2 ml	75 $\mu$ l			-	+
D		2 ml	75 $\mu$ l	10 $\mu$ l (T0)		-	+
E		2 ml	75 $\mu$ l	10 $\mu$ l (T10min)		-	+
F		2 ml	75 $\mu$ l		10 $\mu$ l (T0)	-	+
G		2 ml	75 $\mu$ l	10 $\mu$ l (T10min)	10 $\mu$ l (T10min)	-	+
H		2 ml	75 $\mu$ l	-	10 $\mu$ l (T10)	-	+

A intervalos de 10 min se leerá la absorbancia a 590nm. Se recomienda hacerlo siempre en el mismo orden.

Registrar los datos en la siguiente tabla

Tiempo	A	B (osc)	C	D	E	F	G	H
0								
10 min								
20 min								
30 min								
40 min								

## Actividad 2. Análisis de resultados

- 1- Grafique, para cada tratamiento, la absorbancia a 590 nm en función del tiempo.
- 2- Discuta con el docente y sus compañeros los resultados obtenidos.
- 3- A partir de la experiencia proponga a que nivel de la cadena de transporte fotosintético es que el DCPIP recibe electrones. Recuerde que el DCPIP oxidado es azul y a medida que se reduce se torna transparente.
- 4- Agregue a la cadena dibujada en la actividad 1 el DCPIP.

# Trabajo Práctico 6

## EFECTO DE BIOFERTILIZANTES

### **Actividad 1. Registro del experimento**

Tomar fotografías individuales y comparativas de los tratamientos.

**Actividad 2. Determinación de verdor utilizando carta colorimétrica y/o SPAD (para referencia de la tecnología: <https://www.konicaminolta.eu/eu-en/hardware/measuring-instruments/colour-measurement/chlorophyll-meter/spad-502plus>)**

### **Actividad 3. Determinación de parámetros de crecimiento**

Medir por última vez cantidad de hojas por planta.

Registrar el peso fresco/ planta. Si es posible discriminar parte aérea de radicular

Separar las hojas, ponerlas sobre un papel y tomar fotografía para calcular área foliar. Este paso se repite para cada planta

Colocar hojas en canastas de aluminio para obtener peso seco (se registra próxima semana)

### **Actividad 4. Nueva tanda de experimentos**

En función de los resultados obtenidos, realizar un nuevo trasplante para repetir el experimento

# Trabajo Práctico 7

## Fijación Biológica del Nitrógeno

### Contenidos

Metabolismo del nitrógeno y la fijación biológica del nitrógeno (FBN) como mecanismo en plantas.

Fijación del nitrógeno atmosférico y la nitrogenasa.

Regulación de la nodulación y la fijación biológica del nitrógeno.

Morfofisiología de la nodulación y de la FBN en leguminosas.

FBN, crecimiento y desarrollo en plantas.

Microorganismos benéficos simbiotes.

### Objetivo

A través de un experimento integrador a largo plazo estudiar los diferentes factores y procesos que modulan el crecimiento y productividad de las plantas.

### Guía de estudio

1. Realice un esquema de las diferentes formas de interacción/infección radical de microorganismos simbiotes fijadores de nitrógeno en plantas.
2. Realice una búsqueda de los usos de la fijación biológica del nitrógeno en cultivos de uso agrícola.
3. Indique la relación entre la fijación del nitrógeno atmosférico y la fijación del carbono ¿cómo se relacionan ambos metabolismos en leguminosas?
4. ¿Qué factores regulan la fijación biológica del nitrógeno en plantas?
5. ¿Cómo se relaciona la fijación biológica del nitrógeno con la acumulación de biomasa, el crecimiento y el desarrollo?

### Actividad 1. Extracción de pigmentos

1- Colocar 70 mg de hojas en un tubo de ensayo (un tubo por cada tratamiento) y agregue 10 ml de etanol al 80%. **Debe tomarse la precaución de que todo el material vegetal quede completamente sumergido en la solución de etanol.**

2- Con un marcador indeleble, marcar el volumen

- 3- Tapar con papel de aluminio y colocar en baño de María durante 20 min a 80°C (**es muy importante mantener esta temperatura durante los 20 min**).
- 4- Transcurrido ese tiempo se retiran los tubos del baño María y se dejan enfriar a temperatura ambiente.
- 5- Comprobar el volumen y si es necesario agregar etanol 80% hasta llegar a la marca realizada antes de la incubación.
- 6- Retirar los segmentos con una pinza.

## Actividad 2. Cuantificación de clorofilas

Utilizando el extracto alcohólico preparado en la actividad 3, cuantifique las clorofilas presentes en cada lote de plantas

1- Leer la DO del extracto alcohólico a 654 nm. (Diluir con etanol en caso de ser necesario)

2- Cálculo: la concentración de clorofila del extracto se calcula con la siguiente fórmula (Wintermans, JF and De Mots A., (1965), *Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol*. Biochim. Biophys. Acta 109:448-453):

$$\mu\text{g clorofila a + b / ml extracto} = \frac{1000 \cdot DO_{654nm}}{39.8}$$

Se calcula el total de clorofila de la extracción y se expresa por alguna unidad de masa o área (mg de PF, segmento foliar o cm<sup>2</sup>). Tener en cuenta si se realizó una o más diluciones para obtener el resultado final.

## Actividad 3. Determinación de proteínas totales

**Método de Bradford:** (Bradford, M. Anal. Biochem., 72:248, 1976), el mismo está basado en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del Azul Brillante de Coomasie G-250 de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína. Experimentalmente se mide la absorbancia a 595 nm.

### Extracción de proteínas

1- Pesar 0,1 g de material vegetal y colocar en un mortero.

- 2- Agregar 0.5 ml de buffer fosfato de potasio 100 mM Ph 7.5.
- 3- Homogenizar.
- 4- Tomar con la pipeta el extracto y colocar en un tubo eppendorf.
- 5- Colocar 0.5 ml de buffer fosfato de potasio 100 mM Ph 7.5 en el mortero para lavar
- 6- Tomar con la pipeta el extracto remanente y colocar en un tubo eppendorf.
- 7- Centrifugar 30 minutos a 6000 RPM a 4°C.
- 8- Rescatar el sobrenadante (extracto proteico)

### Cuantificación de proteínas

- 9- Colocar 1 ml de reactivo Coomasie en una cubeta
- 10- Agregar 100 µl del extracto proteico.
- 11- Mezclar por inversión utilizando papel parafilm. Dejar 5 min.
- 12- Medir A<sub>595</sub> de las muestras contra el blanco (con 100 µl de buffer fosfato de potasio 100 mM Ph 7.5).
- 13- Calcular el contenido de proteínas a partir de la fórmula de la curva de calibración provista por el docente

### **Actividad 4. Determinación de parámetros de crecimiento**

Determinar para cada tratamiento las variables indicadas en la tabla del TP 1.

Luego de realizar las mediciones colocar el material aéreo y radicular en sobres de papel de aluminio y llevar a estufa para su desecación.

## Trabajo Práctico 8

### **COLOQUIO INTEGRADOR 2**

### **Analisis de resultados experiencia biofertilizante**

# Trabajo Práctico 9

## VISITA A BIOFABRICA

# Trabajo Práctico 10

## REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO

### Contenidos

Reguladores del crecimiento. Las hormonas del crecimiento. Concepto y definición. Clasificación de las fitohormonas. Auxinas, Giberelinas, Citocininas, Ácido abscísico y etileno: principales efectos biológicos.

Algunas aplicaciones de los reguladores del crecimiento en la agricultura. Cultivo de tejidos.

### Objetivos

- Conocer el rol de las hormonas vegetales en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas
- Rol de las auxinas en la elongación del coleoptilo de cereales

### Guía de estudio

- 1- ¿Cómo define el crecimiento?
- 2- Describa el mecanismo de elongación celular vegetal
- 3- Mencione que factores endógenos y ambientales afectan el crecimiento.
- 4- ¿Qué es una hormona?
- 5- Realice un cuadro comparativo de las diferentes hormonas vegetales y sus funciones
- 6- Mencione usos de hormonas vegetales en agricultura

### Actividad 1. Determinación del sitio de síntesis de auxinas en el coleoptilo

**Material vegetal:** Plántulas de maíz etioladas de 4 a 6 días de edad (la primera hoja no debe haber emergido)

#### Procedimiento:

Extraer 35 coleoptilos.

- 1- A 5 de ellos no retirarles el ápice
- 2- A los 30 restantes cortar el ápice (2 mm).

- 3- Cortar segmentos de 5 mm de longitud. En el caso de los coleoptilos con ápice 5 mm segmento + 2 mm ápice.
- 4- Lavarlos y secarlos con suavidad.
- 5- Tratamiento hormonal: Incubar los segmentos en oscuridad por 48 hs en las siguientes soluciones de auxina 0 -1- 5 y 10 ppm. El tratamiento control se realiza con segmentos con y sin ápice.
- 6- Tratamiento de azúcares: Incubar segmentos sin ápice en 5mM de sacarosa y 5mM de sacarosa + 5ppm de auxina.
- 7- A las 48 hs retirar los segmentos incubados el práctico anterior y tomar su longitud.
- 8- Calcular el aumento de longitud en cada caso: **largo final –largo inicial**

## **ANÁLISIS DE RESULTADOS (BIOFERTILIZANTE)**

### **CONFECCIÓN DE INFORMES**

#### **Trabajo Práctico 11**

#### **COLOQUIO INTEGRADOR 3**

### **ANÁLISIS DE RESULTADOS. CONFECCIÓN DE INFORMES**

#### **DISCUSIÓN RESULTADOS DE ROL DE AUXINAS EN EL CRECIMIENTO DE COLEOPTILOS**

#### **Trabajo Práctico 12**

### **ENTREGA DE INFORME**

