



Práctica 4: EFECTO DE LA QUINETINA SOBRE LA SENESCENCIA FOLIAR

1. Finalidad

Estudiar el efecto de las citoquininas en el retraso de la senescencia foliar.

2. Material necesario

Material vegetal: Plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) de 15-18 días.

Material de laboratorio: Acetona al 80% (v/v). 8 placas Petri. Tubos graduados de 20 mL. Mortero. Bisturí. Pipetas Pasteur. Papel Whatman N°1. Embudos. Espectrofotómetro.

Disoluciones a preparar: A partir de una solución madre de kinetina de 100 mg/L preparar 100 mL de las siguientes diluciones de kinetina 10, 1 y 0.1 mg/L.

Disolución kinetina	Concentración de la solución madre. Volumen a tomar:	Volumen de agua destilada (mL)
10 mg/L		
1 mg/L		
0.1 mg/L		

Ordenador: Realizar un gráfico con ayuda de un programa informático (Microsoft Office Excel o SigmaPlot).

3. Procedimiento

A. Germinación de las semillas y crecimiento de las plántulas. Sembrar semillas de cebada (*Hordeum vulgare*) en una bandeja con vermiculita. Mantener las plantas en el invernadero durante unos 15 días.

B. Seleccionar hojas sanas de cebada y pesar cuatro lotes de 0.5 g cada uno. A continuación, cortar las hojas en secciones de 1-2 cm de longitud.

C. Preparar 8 placas Petri conteniendo 25 mL de cada uno de las siguientes disoluciones: (1) H₂O destilada, (2) Quinetina 0.1 mg/L, (3) Quinetina 1.0 mg/L y (4) Quinetina 10.0 mg/L

D. Colocar las secciones en las placas, sellar con Parafilm® y, guardar una serie en la luz y otra en la oscuridad durante 7-8 días. Transcurrido este tiempo, determinar el contenido de clorofilas en cada tratamiento utilizando el procedimiento descrito en el siguiente apartado. Determinar, asimismo, el contenido clorofílico de hojas recién cortadas de la planta, que nos permitirá evaluar el porcentaje de retención de clorofila por las hojas en los distintos tratamientos.

E. Determinación del nivel de clorofilas totales

Para determinar el nivel de clorofilas totales, sacad las hojas de las placas Petri y secarlas suavemente con papel de filtro.

a) Extracción de clorofila. Poner el material vegetal 0.5 g (peso fresco) en un mortero limpio. Triturar el tejido hasta obtener una pulpa fina y añadir 4 mL de acetona de 80% (v/v).

Transferir cuidadosamente, con ayuda de una pipeta Pasterur el extracto resultante a un embudo que contiene un filtro de papel Whatman N°1. Mientras se filtra el extracto, triturar otra vez el tejido con otros 4 mL de acetona al 80%. Después de 3 o 4 minutos filtrar el segundo extracto. Después de la segunda extracción el tejido debe carecer de clorofila si no, continuar con la extracción con 3 mL de acetona al 80 %. Filtrar. Por último, añadir 2 mL de acetona, al 80%, y lavar el mortero y las paredes del embudo. Para facilitar el cálculo de la cantidad de clorofila presente, llevar el filtrado hasta un volumen final de 15 ml.

b) Determinación de la cantidad de clorofila. Leer y anotar la absorbancia del extracto clorofílico en el espectrofotómetro a 652 nm. Ajustar el aparato con un blanco con acetona al 80%.

Hojas recién cortadas	A 652	A645	A663

Incubadas en la luz tras ____ días:

[Quinetina]	A 652	A645	A663
0 mg/L			
0.1 mg/L			
1 mg/L			
10 mg/L			

Incubadas en oscuridad tras ____ días:

[Quinetina]	A 652	A645	A663
0 mg/L			
0.1 mg/L			
1 mg/L			
10 mg/L			

Calcular a continuación los miligramos de clorofila por gramo de tejido, utilizando la siguiente ecuación.

$$\text{Clorofila total} = (A_{652} / 34.5) (V/W)$$

A_{652} = Absorbancia del extracto de clorofila a 652 nm

$$\epsilon_{652} = 34.5 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

V = volumen del extracto clorofílico (en mL)

W = Peso fresco (en gramos) del tejido

c) Determinación de la cantidad de clorofila a y b. Medir la absorbancia a 645 y 663 nm. Calcular a continuación los miligramos de clorofila a y b por gramo de tejido foliar extraído utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{mg clorofila a/ g tejido} = (12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}) \times (V / (1000 \times W))$$

$$\text{mg clorofila b/ g tejido} = (22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}) \times (V / (1000 \times W))$$

4. Resultados y Conclusiones

Construir una tabla indicando el contenido de clorofilas totales, a y b en cada tratamiento.

Tratamiento en luz:

Tratamiento	Contenido en clorofilas totales (mg/g)	Contenido en clorofila a (mg/g)	Contenido en clorofila b (mg/g)	Retención de clorofila (%)
Hojas recién cortadas				100 %
H₂O				
Quinetina 0.1 mg/L				
Quinetina 1.0 mg/L				
Quinetina 10.0 mg/L				

Tratamiento en oscuridad:

Tratamiento	Contenido en clorofilas totales (mg/g)	Contenido en clorofila a (mg/g)	Contenido en clorofila b (mg/g)	Retención de clorofila (%)
Hojas recién cortadas				100 %
H₂O				
Quinetina 0.1 mg/L				
Quinetina 1.0 mg/L				
Quinetina 10.0 mg/L				

Construir un gráfico que represente el porcentaje de retención de clorofila (ordenadas) en función de la concentración de quinetina tanto en la luz como en la oscuridad. Establecer las conclusiones oportunas sobre el efecto de la concentración de quinetina sobre la senescencia foliar.

5. Bibliografía

- Machills L, Torrey JG (1956). Plants in Action. W. H. Freeman and Company. San Francisco
- Reiss C (1990). Experiments in Plant Physiology. Prentice-Hall, Inc.
- Sánchez m, Aparicio P, Peña JI (1980). Prácticas de Fisiología Vegetal. Ediciones de la Universidad de Navarra S. A. Pamplona
- Witham FH., Blaydes DF, Devlin RM (1971). Experiments in Plant Physiology. Van Nostrand Reinhold Co. New York