



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

Título del curso
MANUAL DE PRÁCTICAS



**BIOLOGIA: PLAN DE
ESTUDIOS 2008**

Nombre del Profesor:

CONTENIDO

No. de práctica	Nombre de la práctica	No. Página
	<i>Reglas de seguridad en el laboratorio</i>	3
1	LA CÉLULA VEGETAL Y LA TINCIÓN DE TEJIDOS	4
2	DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL HÍDRICO POR EL MÉTODO DE LA CÁMARA DE PRESIÓN SCHOLANDER-HAMMEL Y DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE MASA-ÁREA FOLIAR.	6
3	ESTIMACIÓN DE DENSIDAD ESTOMÁTICA POR MEDIO DE TÉCNICA DE ESMALTE	10
4	ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE CLOROFILA EN HOJAS.	13
5	DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS TOTALES POR TITULACIÓN (ACIDEZ TITULABLE) EN PLANTAS CAM.	16
6	INFLUENCIA DEL PH SOBRE LOS PIGMENTOS VEGETALES: BETALAÍNAS	18
7	INFLUENCIA DEL PH SOBRE LOS PIGMENTOS VEGETALES: ANTOCIANINAS.	20
8	PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE COLEÓPTILOS CON AUXINAS	24
9		29
10		33
11		35
12		37
13		39
14		42

REGLAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO



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

PRACTICA #1

TITULO:

LA CÉLULA VEGETAL Y LA TINCIÓN DE TEJIDOS

INTRODUCCIÓN.

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

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

OBJETIVO:

1. Reconocer las partes de la célula vegetal.
2. Observar y diferenciar varios tipos de células vegetales.
3. Aprender los principios básicos de la tinción de tejidos.
4. Identificar al microscopio algunos de los componentes de las células vegetales.
5. Adquirir destrezas en el uso del microscopio y en la elaboración de cortes a mano alzada de tejidos vegetales.

METODOLOGÍA.

A continuación se presenta una serie de instrucciones para realizar cortes a mano alzada de varias especies vegetales. Realice la práctica con las especies disponibles según lo que indique el profesor.

Tome una muestra de la epidermis de cebolla cabezona (*Allium* sp.), móntela sobre un portaobjetos y obsérvela al microscopio. Luego agréguele una gota de lugol y observe nuevamente. Repita el procedimiento con otro colorante como azul de metileno o tinta china, compárelos. Haga dibujos identificando pared celular, núcleo, nucléolo, protoplasto.

Coja un trozo de papa (*Solanum tuberosum*) y haga un corte a mano alzada. Agregue lugol, móntelo en laminilla, observe y dibuje. Identifique granos de almidón (amiloplastos), protoplasto, núcleo. Haga lo mismo con una semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Compare las muestras, haga dibujos.

A un trozo de tallo joven de poligonio (*Polygonium* sp.), hágale un corte transversal a mano alzada y obsérvelo al microscopio. Es notable la epidermis mono estratificada, el cordón de esclerénquima, el tejido xilemático continuo y la médula de parénquima con abundante almidón. Adicione lugol a un corte para detallar los gránulos de almidón, y tionina a otro corte para resaltar el esclerénquima y el xilema.

Obtenga una hoja de Patebuey (*Bauhinia* sp.) y haga un corte en el peciolo de la hoja. Móntelo y tíñalo con lugol. Observe en la periferia esclerénquima, identifique los haces vasculares y las células de parénquima. A otro corte agréguele tionina. Rotule claramente sus esquemas.

Coja una hoja de guama (*Inga edulis*) y obsérvela al estereomicroscopio para detectar numerosos tricomas. Haga un corte en el peciolo o el raquis y tíñalo con tionina. Observe el abundante esclerénquima y el xilema en cordones separados. Tome una muestra de coquito (*Cyperaceae* sp.) y haga un corte transversal del tallo, móntelo en laminilla y tíñalo con lugol. Identifique las células de sostén en la periferia del corte, las células fotosintéticas y las células de conducción. ¿Qué tipos celulares son? Haga esquemas y rotúlelos.

Coja una hoja de caucho (*Ficus* sp.) y haga un corte transversal incluyendo el peciolo, móntelo en laminilla y tíñalo con lugol. Identifique y dibuje las células que recubren el órgano, además de cristales (sustancias ergásticas) y las células fotosintéticas.

Haga un corte transversal de tallo de Calabacita (*Cucurbita* sp.), móntelo en laminilla y tíñalo con tionina. Observe las células de colénquima en grupos periféricos. Haga dibujos.

Obtenga una rama joven de *Senna tomentosa* y haga un corte transversal. Observe los haces vasculares discretos, los tricomas, numerosos cristales y parénquima. Haga una tinción de contraste con azul de metileno y dibuje identificando los tejidos.

Para observar abundante parénquima aerífero (aerénquima), tome una hoja de buchón (*Eichornia* sp.) y haga un corte transversal. Identifique los cordones de parénquima y los espacios aéreos.

En un corte transversal de *Araucaria* (*Araucaria* sp.) identifique abundante clorénquima, en cordones, un haz vascular central, esclerénquima y una capa subepidérmica. Haga dibujos.

Haga un corte de corteza joven de chiminango (*Pythecellobium* sp.), móntelo en laminilla y tíñalo con lugol. Observe el tejido fotosintético y conteste las siguientes preguntas. ¿Qué clases de células lo componen? ¿Qué forma tienen? Identifique los cloroplastos y otras estructuras celulares en sus dibujos.

ACTIVIDADES ANEXAS.

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

PRACTICA #2

TITULO:

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

INTRODUCCION:

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

OBJETIVO:

- a).- Conocer una técnica para la determinación de potenciales hídricos.
- b).- Comparar el potencial hídrico de diferentes especies, individuos o ramas en diferentes condiciones de estrés hídrico.
- c).- Conocer una técnica para determinar el índice de masa-área foliar (LMA, por sus siglas en inglés)

MATERIAL:

- 1).- Tanque de gas nitrógeno
- 2).- Cámara de presión Scholander-Hammel.
- 3).- Lupa (se requiere nada más una por cámara de presión)
- 4).- Navaja
- 5).- Bolsas de plástico del tamaño adecuado como para envolver una hoja

- 6).- Cinta para sellar cajas de cartón o película plástica para envolver alimentos.
- 7).- Un pedazo de papel aluminio del tamaño adecuado como para envolver una hoja
- 8).- Trozos de papel milimétrico.
- 9).- Psicrómetro (de bulbo seco y mojado) para medir humedad relativa. Si no hay, al menos conseguir un termómetro.

METODOLOGÍA:

1. Elegir dos especies a estudiar. Pueden ser con hojas de características muy distintas (por ejemplo duras contra blandas, o grandes contra chicas) o que se encuentren en condiciones de estrés hídrico muy distintas, o que sean especies representativas de climas algo distintos (por ejemplo desierto contra montaña). Medir la temperatura y humedad relativa del ambiente. Tomar muestras de cada especie (de preferencia una muestra por planta, es decir de 5 plantas de la misma especie). Elegir la muestra ya sea hoja (en caso de que tenga peciolo grande, al menos 2 cm de largo) o ramita (en caso que tenga peciolo u hojas pequeñas) y segundos antes de cortar la muestra envolver la hoja o ramita (todas las hojas que se van a medir) con película plástica, tape para sellar cajas o con bolsa de plástico. Cortar la hoja o ramita con una navaja, meterlas a una bolsa de plástico (con papel secante húmedo) y cubrir con papel aluminio para reflejar los rayos del sol. Llevarla rápido al laboratorio. Anotar la hora. Colocar la muestra en la cámara de presión y sellarla bien. Abrir la válvula de aguja para dejar entrar el gas y ajustar para que el aumento en presión sea lento. Observar el corte del peciolo con la lupa. Observar de lado por si acaso sale disparada la ramita. Detectar el punto en el que sale la primera evidencia de agua por el xilema. Rápidamente observar la indicación de presión en el manómetro y anotarla. Cerrar la válvula de aguja de entrada de gas y mover la llave de paso para dejar salir el gas de la cámara. Cuando la presión indique cero se puede sacar la muestra de la cámara. Repetir la medición con cada muestra de las dos especies. Repetir el procedimiento 1.5 horas después con otra serie de muestras de las mismas plantas.

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

PRACTICA #3

TITULO:

ESTIMACIÓN DE DENSIDAD ESTOMÁTICA POR MEDIO DE TÉCNICA DE ESMALTE

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

OBJETIVO:

- a).- Conocer técnicas para la determinación de la densidad estomática e índice estomático.
- b).- Comparar el índice y densidad estomática en el haz y envés de la misma hoja, así como en diferentes especies.
- c).- Conocer una técnica para medir inclinación de la hoja.

MATERIAL:

- 1).- Microscopio óptico (uno por persona).
- 2).- Portaobjetos muy limpio. Se requieren 10 por equipo.
- 3).- Portaobjetos con escala micrométrica (puede ser uno para todo el grupo).
- 4).- Contador manual (uno por persona).
- 5).- Esmalte para uñas (transparente). Conseguir uno por equipo antes de la sesión de laboratorio.
- 6).- Cinta adhesiva completamente transparente. Conseguir uno por equipo antes de la sesión de laboratorio.

- 7).- Clinómetro fabricado con transportador, hilo y algún objeto pesado (tuerca, piedra, pesa). Llevar las partes para fabricar uno por equipo.
- 8).- Tijera. Conseguir una por equipo antes de la sesión de laboratorio.

METODOLOGÍA:

Seleccionar 5 hojas de cada especie (de preferencia una hoja por planta, es decir de 5 plantas distintas de la misma especie). Medir con el clinómetro el ángulo de inclinación de la hoja. Elegir la numeración que va de 0 a 90 grados en el transportador para cada medición. No preocuparse por convertir los ángulos para que correspondan a 90 grados en la vertical. Esto se hará después en la hoja de cálculo (Excel). Mejor anotar tal como viene en el transportador. Si la hoja está en un lugar poco accesible para colocar la cara plana del clinómetro, entonces auxiliarse con una regla o tabla para extender una superficie paralela (con la misma inclinación) hacia una zona donde se pueda usar el clinómetro.

En cada hoja se van a comparar sus dos superficies: el haz (adaxial) y el envés (abaxial). Aplicar una capa generosa de esmalte de uñas a un área de más o menos 1 cm² a cada lado de la hoja. Dejar secar por algunos minutos (entre 5 y 10 min). Una vez seco, con la cinta adhesiva pegar sobre el esmalte y desprender con mucho cuidado la impresión foliar sin tocar la parte de la cinta en contacto con la impresión foliar. Pegar la cinta a un portaobjetos (en forma perpendicular). Cortar el sobrante de la cinta adhesiva en uno de los extremos. En el otro extremo, dejar un pequeño sobrante para etiquetar la muestra. Pegar un pedazo de papel indicando el número y superficie de la hoja a que corresponde la muestra. Al mismo portaobjetos tal vez se le puedan agregar otras muestras (impresiones foliares). Colocar el portaobjetos con la escala micrométrica y medir el diámetro del campo de observación del objetivo 40x. Calcular el área en mm². Colocar un portaobjetos con impresión foliar. Seleccionar un campo con muchos estomas, pero libre de huellas dactilares, basura, daños o nervaduras. Contar estomas (usar contador manual en caso necesario) y anotar; contar células epidérmicas y anotar. Seleccionar otro campo de la misma impresión y repetir el conteo. Repetir el procedimiento (dos campos) para cada impresión foliar. Calcular el índice y la densidad estomática según las siguientes ecuaciones:

Densidad estomática (estomas mm⁻²) = (# estomas por campo / Área del campo en mm²)
Índice estomático (%) = [# estomas por campo / (# células epidérmicas por campo + # estomas por campo)] (100)

Determinar si las hojas de las especies analizadas son epiestomáticas, hipoestomáticas o ambiestomáticas.

Consideraciones adicionales:

- 1). El esmalte para uñas debe ser el más claro que puedan conseguir. No debe tener color u opacidad.
- 2). La cinta adhesiva debe ser la más clara y uniforme (en el pegamento) que puedan conseguir. Observen Diferentes tipos de cinta adhesiva y usen la que menos burbujas, manchas y opacidad le agregue a la observación.
- 3) Deben evitar tocar la cinta adhesiva en la zona donde se encuentra la impresión foliar (esmalte) porque esto agregaría la huella dactilar como ruido extra en la observación.
- 4). Se puede despegar el barniz de la hoja sin usar cinta adhesiva y colocar directamente la impresión foliar (esmalte) en el portaobjetos. Si se mejora la observación usen entonces esta técnica.
- 5). Si observan mejor en otro aumento (por ejemplo 100x en lugar de 400x, sobre todo en hojas o superficies con pocos estomas) pueden cambiar de objetivo. Pero entonces deben medir el diámetro de ese otro campo de observación y calcular su área.
- 6). Si los tricomas de las hojas imposibilitan la observación pueden “depilar” la superficie de la hoja con cinta adhesiva antes de poner esmalte en la superficie elegida.
- 7). Se puede intentar con la cinta adhesiva hacia arriba para probar si se ve mejor. Se puede poner aceite y luego el cubreobjetos.
- 8). Se puede cortar la epidermis de algunas hojas, en algunas especies son fáciles de despegar. Se puede intentar. Si es más fácil cortar toda la epidermis y contar entonces hacerlo así. Se corta la epidermis se coloca sobre un portaobjetos se le agrega una gotita de agua y se cubre con un cubreobjetos.

9). Despegar epidermis: Pegar la cinta adhesiva en la cara de la hoja que se quiere observar. Raspar la hoja por el otro lado con una navaja y dejar solamente la epidermis. Observar al microscopio. Si hay mucha clorofila y no se puede observar bien entonces agregar una gota de cloro (hipoclorito de sodio, *clorox* o *cloralex*) al 5%. Dejar por unos minutos hasta que se ponga transparente. Enjuagar con agua. Observar con la cinta adhesiva pegada hacia abajo. Se puede teñir con safranina al 1% por 10 min. En caso necesario, se puede agregar una gota de agua destilada para montar y cubrir con cubreobjetos.

Practica # 4

Titulo:

ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE CLOROFILA EN HOJAS.

INTRODUCCION:

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

OBJETIVO:

- a).- Conocer La técnica de extracción de clorofila
- b).- Conocer la técnica de estimación de contenido de clorofila por medio de espectrofotometría de luz.

MATERIAL:

100 ml de 80% de acetona en agua por equipo. 1 litro para todo el grupo.

Etanol puro para limpiar celdas del espectrofotómetro

Espectrofotómetro

1 gradilla

16 tubos de ensayo de 13x100mm con tapon de hule

Papel aluminio para cubrir 8 tubos de ensayo

2 Morteros y mazos

1 Matraz Erlenmeyer de 125 o 250 ml para almacenar la acetona (con tapon de hule)

1 homogenizador

1 Pipeta graduada de 1ml

1 Pipeta graduada de 10ml

1 pipeteador

1 Sacabocados (para cortar de forma consistente porciones de hojas)

Navaja de un filo y papel milimétrico (se puede usar en lugar del sacabocados)

1.- Extracción de clorofilas:

Usar una solución de 80% (v/v) de acetona en agua, amortiguada con buffer 2.5 mM de fosfato de sodio al pH 7.8 (el ajuste del pH es para minimizar la conversión de las clorofilas a feofitinas). Elegir dos especies a estudiar, de preferencia que sus hojas tengan diferente tonalidad de verde. Cortar 4 hojas de cada especie elegida. Cortar círculos con un sacabocado de 16 mm de diámetro, esto equivale aproximadamente a 200 mm² de área de la hoja. Si no se cuenta con el sacabocado cortar un trozo de hoja de 1 cm x 2 cm usando como guía un pedazo de papel milimétrico. En hojas color verde pálido usar 300 mm² de área. Pesar cada muestra en una balanza analítica. Poner el trozo en el mortero y agregar 2 ml del solvente (acetona). Moler. Recibir el homogeneizado en un tubo de ensayo. Sellar el tubo. Lavar el mortero y el mazo tres veces con la solución de acetona, usando 1.5 ml cada vez (total 4.5 ml). Recibir el lavado en el mismo tubo. Sellar.

Centrifugar a 2,500 r.p.m. por 10 min. Recuperar el sobrenadante en un tubo de ensayo. El material sedimentado vaciarlo al homogenizador y homogenizar con 1 ml de acetona para remover los pigmentos aun presentes. Volver a centrifugar y juntar los sobrenadantes. Ajustar a un volumen final de 8 ml en acetona (i.e.

agregar 0.5 ml de acetona). Repetir el procedimiento para cada hoja y cada especie (usar 4 replicas por especie). Sellar el tubo. Rotular cada tubo con clave para sobrenadante, especie y numero de replica. La solucion contiene clorofilas a y b y carotenoides como principales pigmentos.

2.- Determinación de clorofilas con el espectrofotómetro:

Prender el espectrofotómetro o colorímetro al menos 15 minutos antes para que se estabilice. Selecciona el modo absorbencia (A) con la tecla ATC. Para determinar la cantidad de clorofila solamente necesitas medir las absorbencias a **647 nm, 664 nm y 750 nm**. Primero selecciona con las teclas ▼ ▲ la longitud de onda **664 nm**. Pon 5 ml de una de las muestras en uno de los tubos del espectrofotometro. En otro tubo pon 5 ml de acetona al 80% (blanco). Sellar ambos tubos. Limpiar con alcohol cualquier huella dejada en los tubos del espectrofotómetro y poner el tubo con el blanco en el espectrofotómetro cuidando que queden alineadas las marcas del tubo. Cerrar la cámara. Presionar la tecla 0ABS/100%T. Aunque una pequeña cantidad de luz es absorbida por el solvente y el tubo eso se nulifica con el ajuste a cero. Quitar el tubo con el blanco. Meter ahora el tubo con la muestra, alinear bien. Cerrar la cámara. Registra la absorbencia. Si es mayor de 0.8 diluir con acetona al 80% (con cantidades conocidas para poder conocer la concentración al final) hasta que la absorbencia sea debajo de 0.8 a 664nm. Esto asegurara que las absorbencias medidas estén en la parte de mayor exactitud del aparato. Ahora, cambiar a **647 nm y 750 nm**, y en cada una de esas longitudes de onda asegurarse que primero se ajuste a cero con el blanco de acetona para después registrar la absorbencia de la muestra.

Con los resultados anteriores ya puedes determinar la cantidad de clorofila total en esa muestra. Con la ayuda de las ecuaciones de Porra (1989) calcular la concentración de clorofila a, b y a+b del tejido. Concentracion ($\mu\text{g/ml}$) clorofila a = $(12.25 * (A_{664} - A_{750})) - (2.55 * (A_{647} - A_{750}))$ Concentracion ($\mu\text{g/ml}$) clorofila b = $(20.31 * (A_{647} - A_{750})) - (4.91 * (A_{664} - A_{750}))$ Concentracion clorofila a + b (clorofila total) = $(17.76 * (A_{647} - A_{750})) + (7.34 * (A_{664} - A_{750}))$

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

PRACTICA # 5

Titulo:

**DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS TOTALES POR TITULACIÓN (ACIDEZ TITULABLE)
EN PLANTAS CAM.**

INTRODUCCIÓN

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

OBJETIVOS:

- Evaluar por medio del método de titulación la variación temporal en la concentración de acidez en tejidos vegetales de diferentes plantas de metabolismos ácido crasuláceo
- Que el alumno aprenda una técnica de evaluación de acidez en las plantas
- Que el alumno comprenda el metabolismo ácido crasuláceo de las plantas

MATERIALES.

NaOH 0.01N, fenolftaleína, balanza, potenciómetro (pH-metro).

1 soporte universal

1 Pinzas para bureta

1 buretas de 25 ó 50 ml

1 termoplato

1 agitador magnético

1 embudo

2 mortero y mazo

2 Espátula

1 piseta con agua destilada

1 Probeta de 50ml

2 Matraz Erlenmeyer de 125 ml.

2 Pipeta graduada de 5ml.

2 pipeteadores

1 pipeta Pasteur

1 gradilla

16 tubos de ensaye de 13x100mm

8 tapones de hule para tubos de ensaye de 13x100mm

1 sacabocados

METODOLOGÍA

- 1) Elegir dos especies suculentas a estudiar, o una especie suculenta creciendo en dos condiciones diferentes de humedad o a diferentes horas del día. Tomar **4 muestras** de cada especie o de cada condición elegida. Cortar con sacabocados (horador o perforador) un área de 2cm de diámetro. Utilizar la parte verde del tejido y descartar la parte clara (la interna). Pesar el tejido en una balanza analítica. Utilizar 2.5 g por muestra.
- 2) Poner el trozo en el mortero y macerar 2.5 g de tejido de la planta suculenta que elijas. Agregar 10mlde agua destilada. Macerar hasta que un homogenado muy fino

resulte (agregar agua en porciones y enjuagar el mortero con las porciones finales). Vaciar el homogenizado en un tubo de ensayo. Sellar el tubo.

- 3) Centrifugar a 1,500 r.p.m. por 10 min.** Recuperar el sobrenadante en otro tubo de ensayo. Sellar el tubo. Repetir el procedimiento para cada tejido y cada especie (usar 4 réplicas por especie). Rotular cada tubo con clave para sobrenadante, especie o condición y número de réplica.
 - 4) Medir el pH de cada muestra con el potenciómetro. Lavar el potenciómetro con agua destilada cada vez que se cambia de muestra. Se quita el exceso de agua con un papel apenas tocando la punta.
 - 5) Titular con NaOH 0.01N.** Agregar una gota de fenolftaleína a la muestra y vaciar la muestra en un matraz el cual se coloca bajo la bureta. Anotar la cantidad de ml de NaOH 0.01N presentes en la bureta. Agitar el matraz manualmente o colocarlo sobre un termoplato, agregar el agitador magnético y encender la agitación del termoplato. Agregar gota a gota NaOH 0.01N hasta que vire de color, es decir de incoloro a ligeramente rosa. Anotar la cantidad de ml de NaOH 0.01N presentes en la bureta y calcular la cantidad de NaOH 0.01N utilizada en cada muestra. Calcular los mililitros de NaOH 0.01N gastados por gramo de peso fresco de tejido. Esta será la forma de reportar los resultados.
 - 6) Medir el pH final de cada muestra con el potenciómetro.
- Nota:** El valor de la acidificación nocturna puede ser el valor del amanecer menos el valor del anochecer.

Práctica # 6

TITULO:

INFLUENCIA DEL PH SOBRE LOS PIGMENTOS ANTOCIANINAS Y BETALAÍNAS

INTRODUCCIÓN:

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

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

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

.

Materiales:

HCl 0.1N y 1N, KOH 0.01N y 0.1N, Balanza.
2 mortero y mazo 2 Matraz Erlenmeyer de 125 ml.
2 Embudo Buchner 2 Pipetas graduadas de 1 ml
2 Manguera para vacío 1 Pipeta graduada de 5ml.
2 Matraz Kitazato de 250 ml
1 pipeta
4 Papel filtro 20 tubos de ensaye de 13x100mm
2 Espátula 1 gradilla
1 Piseta con agua destilada 1 agitador de vidrio
1 Probeta de 100ml

METODOLOGÍA

En forma separada moler en un mortero 2 g de col roja (repollo morado) y de betabel en 40 ml de agua hasta que resulte un homogeneizado muy fino (agregar agua en porciones y enjuagar el mortero con las porciones finales). Filtrar cada homogeneizado a través del papel filtro acomodado en el embudo y el matraz Kitazato. Usar vacío conectado al matraz Kitazato para acelerar el proceso. Descarte el material sólido del papel y ponga el filtrado de cada especie en un contenedor separado. Agregar 5 ml del jugo de la col roja en cada uno de 5 tubos de ensayo numerados del 1 al 5. Repetir para el betabel pero etiquetar los tubos del 6 al 10. Conservar los tubos #1 y #6 como controles sin tratamiento. Agregar 1 ml de HCl 0.1N a los tubos #2 y #7. Mezclar bien con el agitador de vidrio y anotar cualquier cambio de color si éste ocurre. Agregar

0.5 ml de KOH 0.01N a los tubos #3 y #8 y mezclar bien. El extracto de col roja debe ponerse violeta o si está muy básico azul. Registrar el color de ambas soluciones. Agregar 1 ml de KOH 0.1N a los tubos #4 y #9 y registrar los colores. Finalmente agregar una bolita de cristales de KOH o NaOH a los tubos #5 y #10. La antocianina debe hacerse amarilla. Registrar estos colores, después determinar si los cambios de color son reversibles agregando gotas de KOH 0.1N a los tubos #2 y #7, gotas de HCl 0.1N a los tubos #3, #8, #4, #9, y finalmente HCl 1N para los tubos #5 y #10. Agitar con el agitador de vidrio cada vez que se agreguen gotas. Toma una muestra de cualquier tejido vegetal (de **dos o tres especies** diferentes) de los alrededores de la escuela para que la compares con estas dos muestras y realiza el mismo proceso. Dos de esas especies (con antocianinas) se usarán en la sesión de la siguiente semana para la determinación de antocianinas. El reporte completo se entrega después de la segunda sesión cuando se determinen antocianinas y se generen datos que se puedan analizar estadísticamente. La contribución de esta primera sesión en el

PRACTICA # 7

TITULO:

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS.

INTRODUCCIÓN:

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

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

diferencial hacia el cambio de pH, especialmente con el tratamiento de una base como el KOH. Esta respuesta será estudiada en el presente experimento usando betanina, la abundante betacianina de las raíces del betabel o remolacha roja y una antocianina que contienen cianidina de la col roja o repollo colorado (o morado). También se puede usar “flor de Jamaica” en lugar de col roja.

OBJETIVOS:

- a) Estimar en contenido de antocianinas en tejidos vegetales

MATERIALES

1 perforador o sacabocados

11 tubos de ensayo (13x100mm) con tapón,

Gradilla

Pipeta graduada de 10 ml

Espectrofotómetro

Solución de metanol acidificado [6MHCl : H₂O : MeOH (7 : 23 : 70)]

METODOLOGÍA

1. Extracción de antocianinas:

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

2. Determinación de antocianinas con el espectrofotómetro:

Al día siguiente prender el espectrofotómetro al menos 15 minutos antes de las mediciones para que se estabilice. Selecciona el modo absorbancia con la tecla ATC. Selecciona con las teclas ▼ ▲ la longitud de onda **530 nm**. Pon 3 ml de la solución de pigmentos en uno de los tubos del espectrofotómetro. Cuida que no tenga material en suspensión. Si lo tiene, se tiene que filtrar o centrifugar para separar. En otro tubo pon 3 ml de la solución (blanco). Limpiar con alcohol cualquier huella dejada en los tubos del espectrofotómetro y poner el tubo con el blanco en el espectrofotómetro cuidando que queden alineadas las marcas del tubo. Cerrar la cámara. Presionar la tecla 0 ABS/100% T. Aunque una pequeña cantidad de luz es absorbida por el solvente y el tubo eso se nulifica con el ajuste a cero. Quitar el tubo con el blanco. Meter ahora el tubo con la muestra, alinear bien. Cerrar la cámara. Registra la absorbancia. Si es mayor de 1.0 diluir con metanol acidificado (con cantidades conocidas para poder conocer la concentración al final) hasta que la absorbancia sea debajo de 1.0 a 530nm. Esto asegurara que las absorbancias medidas estén en la parte de mayor exactitud del aparato. Cambiar a **653 nm**. Primero ajusta a cero con el blanco y después registra la absorbancia de la muestra. Con estos datos (absorbancias a **530 nm y 653 nm**) ya puedes determinar la cantidad de antocianinas en esa muestra (hoja). Calcula la concentración de antocianinas (en equivalentes de 3-glucosido de cianidina) con la siguiente ecuación:

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

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

PRACTICA # 8

TITULO:

PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DE COLEÓPTILOS CON AUXINAS

INTRODUCCIÓN

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

OBJETIVOS

- Que los alumnos examinen el efecto de las auxinas en la tasa de crecimiento temprano de las plántulas.
- Evaluar el efecto de la variación de auxinas en plántulas de maíz

MATERIAL

Semillas de maíz (más de 50),
8 cajas de petri de vidrio o plástico (solicitarlo al profesor),

1 navaja,
4 vasos de precipitados de 30 ó 50 ml,
1 pipeta de 10 ml (o en su lugar jeringas de 10 ml),
1 embudo,
1 piseta con agua destilada,
1 vernier,
1 regla,
1 pinza de disección,
Potenciómetro (pH-metro) y soluciones amortiguadoras,
Solución de IAA 2.5 mg/L + 2 % de sacarosa,
Solución de cloro al 10%

METODOLOGÍA

1. Germinación de maíz:

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

2. Experimento de promoción de crecimiento de coleóptilos:

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

través del embudo, a cada uno de los vasos de precipitados. Medir el pH. Medir la longitud de cada uno de los coleóptilos con una regla o un vernier.

LITERATURA

- Aracri, B., Pashkoulov, D., & Mele, A. (2002). Genetic engineering of flower colour and its application on flower cultivation. *Italus Hortus*, 9.
- Baranska, M., Baranski, R., Schulz, H., & Nothnagel, T. (2006). Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta*, 224(5), 1028-1037.
- Barceló, G. Nicolás, B. Sabater y R. Sánchez Tamés. 2005. Fisiología vegetal. 11ª Ed. Pirámide, Madrid.
- Burleigh, M., Roberts, E., & Wagner, D. R. (2008). Acidic Solutions adjusting water's pH improves plant growth. *Cactus and Succulent Journal*, 80: 245-250.
- Da costa, M. and Huang, B. 2009. Physiological adaptations of perennial grasses to drought stress. In: De la Barrera, E. and W. K. Smith, (Eds). Perspectives in Biophysical Plant Ecolphysiology: a tribute to Park S. Nobel. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México.
- De la Barrera, E. and J. L. Andrade. Diversidad fisiológica de las plantas mexicanas: el caso de un metabolismo fotosintético especial. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 81: 157-159.
- De la Barrera, E. and P. S. Nobel. Physiological ecology of seed germination for the columnar cactus *Stenocereus queretaroensis*. *Journal of Arid Environments*, 53: 297- 306.
- De la Barrera, E. and W. K. Smith. 2009. Perspectives in Biophysical plant Ecophysiology: a tribute to Park S. Nobel. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México.
- Drennan, P. M. 2009. Temperature influences on plant species of arid and semi-arid regions with emphasis on CAM succulents. In: De la Barrera, E. and W. K. Smith, (Eds). Perspectives in Biophysical Plant Ecolphysiology: a tribute to Park S. Nobel. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2012). Purification and Antiradical properties of the structural unit of betalains. *Journal of Natural Products*, 75(6), 1030-1036.
- Gouws, L. M., Osmond, C. B., Schurr, U., & Walter, A. (2005). Distinctive field growth cycles in leaves and cladodes of CAM plants: differences from C3 plants and putative interactions with substrate availability, turgor and cytoplasmic pH. *Functional plant biology*, 32: 421-428.

- Grieneisen, V. A., Xu, J., Marée, A. F., Hogeweg, P., & Scheres, B. (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature*, 449(7165), 1008-1013.
- Guerra, M., & Ortega, G. (2006). Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químico-físicos. Parte I. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 2: 35-44.
- Guillen, S., T. Terrazas, E. De la Barrera, and A. Casas. (2011). Germination differentiation patterns of wild and domesticated columnar cacti in a gradient of artificial selection intensity. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58:409- 423.
- H. Öpik and S. Rolfe (2005) *The Physiology of flowering plants*. Cambridge University Press. London, UK.
- Haissig, B. E., and R. E. Dickson. (2006). Starch measurement in plant tissue using enzymatic hydrolysis. *Physiologia plantarum*, 47: 151-157.
- Hernández-González, O., & Villarreal, O. B. (2007). Crassulacean acid metabolism photosynthesis in columnar cactus seedlings during ontogeny: the effect of light on nocturnal acidity accumulation and chlorophyll fluorescence. *American Journal of Botany*, 94(8), 1344-1351.
- Hopkins, W. G. and N.P.A. Hüner (2004) *Introduction to plant physiology*. John Wiley, New York.
- J. Azcón-Bieto y M. Talón. (2000) *Fundamentos de fisiología vegetal*. Interamericana-McGraw-Hill.
- Jerz, G., Skotzki, T., Fiege, K., Winterhalter, P., & Wybraniec, S. (2008). Separation of betalains from berries of *Phytolacca americana* by ion-pair high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1190: 63-73.
- Martínez, F. G. (1994) *Elementos de fisiología vegetal*. Mundi-Prensa, Madrid
- Mazza, G., Cacace, J. E., & Kay, C. D. (2004). Methods of analysis for anthocyanins in plants and biological fluids. *Journal of AOAC international*, 87: 129-145.
- Mohr, H. and Schopfer, (1995) *Plant Physiology*. Springer, Berlín. 1995
- Moreno-Pérez, E. D. C., Martínez-Damián, M. T., Reyes-López, D., Pérez-Mercado, C. A., Peña-Lomelí, A., & Espinosa-Robles, P. (2006). Intensidad de color y contenido de antocianinas en chile guajillo *Capsicum annum* L. *Revista chapingo. Serie horticultura*, 12: 135-140.
- Nobel P. S. (1999) *Physicochemical and environmental plant biology*. Academic Press. Nueva York.
- Nobel, P. S. and De la Barrera, E. 2003. Stem water relations and net CO₂ uptake for a hemiepiphytic cactus during short-term drought. *Environmental and experimental botany*, 48: 129-137
- Raven, P. H. and R.F. Evert y S.E. Eichhorn. (1991) *Biología de plantas*. Volúmenes I y II. Ed. Reverté, Barcelona.

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