

FISIOLOGIA VEGETAL EXPERIMENTS DE LABORATORI

Amparo Sanz Grau
 Dep. de Biologia Vegetal
 UVEG



Experiments de Fisiologia Vegetal

1. Absorció i transport d'elements minerals. Estudi d'antagonismes iònics i de restriccions al transport pel xilema	3
2. Transport pel floema. Construcció d'un model físic demostratiu de la hipòtesi de Münch	9
3. Reaccions lluminoses de la fotosíntesi. Estudi dels pigments fotosintètics, el transport electrònic i la creació del gradient de protons	13
4. Mesura quantitativa de la respiració. Utilització del respiròmetre volumètric	21
5. Hormones vegetals I: citocinines. Efecte sobre el retard de la senescència foliar i importància de factors ambientals.	27
6. Hormones vegetals II: àcid abscísic. Inhibició del creixement d'embrions aïllats	31
7. Germinació. Factors ambientals que afecten la viabilitat de llavors	33
8. Resultats experimentals. Preparació dels experiments i tractament de les dades	37
Referències i pàgines web d'interès	45

ABSORCIÓ I TRANSPORT D'ELEMENTS MINERALS

INTRODUCCIÓ

Les plantes requereixen una sèrie d'elements minerals, en quantitats diverses, per poder créixer i desenvolupar-se normalment. Són els **elements essencials**, que formen part de components cel·lulars estructurals o són necessaris per a la regulació electrosmòtica o per al funcionament dels sistemes bioquímics de la planta. Addicionalment, les plantes també poden absorbir altres elements presents al sòl, tot i no ser essencials.

L'absorció d'un element mineral depèn de la seua presència i disponibilitat en el sòl i de l'existència de sistemes de transport que permeten la incorporació a les cèl·lules del parènquima cortical de les arrels. En aquest procés de transport a través de membrana es pot produir competència entre ions pels transportadors, cosa que dóna lloc a fenòmens d'**antagonisme iònic**.

Posteriorment a l'entrada al simplast, es dóna un transport radial fins a l'estela, prèviament a la incorporació al xilema. Al xilema, els nutrients minerals són arrossegats pel corrent transpiratori, majoritàriament fins a les fulles. Al llarg del moviment de la saba es produeixen interaccions dels soluts amb les parets dels vasos i les cèl·lules parenquimàtiques que els envolten. Així, es dóna **adsorció** de cations a les parets, a causa de les càrregues elèctriques que tenen, principalment negatives, i captació dels elements per les cèl·lules parenquimàtiques (**resorció**). Aquests dos processos poden donar lloc a la restricció del moviment pel xilema d'alguns elements minerals i, per tant, poden tenir conseqüències importants per a la nutrició de la planta.

En aquesta pràctica estudiarem el possible antagonisme iònic entre dos ions de característiques semblants (K^+ i Na^+), així com si existeix una restricció diferent al transport pel xilema de dos ions monovalents, un catió (Na^+) i un anió (Cl^-).

Els cations els analitzarem per **fotometria de flama**, que es basa en el fet que, quan es crema una mostra, l'energia de la flama excita els àtoms i determinats electrons passen a l'estat excitat durant un temps curt. Però ràpidament retornen a l'estat fonamental i alliberen energia que, en part, s'emet en forma de llum de longitud d'ona determinada i pot ser observada com un canvi de color de la flama. El color depèn dels àtoms que han estat excitats i, per tant, és específic de cada

element (espectre de ratlles). Mitjançant l'ús de filtres específics es poden detectar i quantificar els elements presents en la mostra, ja que, a concentracions baixes, la intensitat de la llum emesa està relacionada amb la concentració.

El Cl^- serà analitzat per **valoració** amb AgNO_3 i cromat de potassi (K_2CrO_4) com a indicador (mètode de Mohr). Es tracta d'una valoració de precipitació, en la qual, a mesura que s'afegeix AgNO_3 a una alíquota de la mostra, es forma un precipitat blanc, coagulós, de AgCl , i quan s'arriba al punt d'equivalència, una gota del reactiu dóna lloc a la formació de cromat de plata (AgCrO_4), roig, insoluble (però menys que el clorur), que indica molt exactament el punt final de la valoració.

MATERIALS

Llavors de gira-sol (<i>Helianthus annuus</i>)	Estufa
Safates i vermiculita	Solució Hoagland 1/2
Triturador	NaCl 5 M i 5 mM
Matrassos aforats de 10 mL	AgNO_3 0,01 N
Buretes i suports	K_2CrO_4 al 5 %
Erlenmeyers de 50 mL	Solucions patró de Cl^- , K^+ i Na^+
Pipetes de 2 i 10 mL	Centrífuga
Bany termostatat	Fotòmetre de flama
Pots de plàstic d'1 L, amb taps de 4 perforacions	

ESQUEMA DE LA PRÀCTICA

A) Preparació del material i tractaments.

1. Es posen llavors de gira-sol en safates amb paper de filtre humit i es col·loquen a l'estufa durant 2-3 dies, a 25 °C.
2. Se seleccionen plàntules germinades de mida semblant i se sembren en vermiculita. Es rega amb solució Hoagland i es deixa créixer uns 7 dies.
3. Es canvien les plantes a 8 pots de cultiu hidropònic. Es posen 4 plantes per pot d'1 L, amb solució Hoagland que continga les concentracions següents de NaCl : 0 (5 pots), 50, 100 i 175 mM (1 pot de cada). Es manté durant 2 setmanes afegint-hi, si cal, aigua destil·lada cada 3-4 dies. (Cal aguantar les plantes erectes introduint cotó hidrofòbic al voltant de la base de les tiges, a nivell dels forats del tap.)
4. Amb la base de les tiges submergides en la solució, es tallen les arrels de les plantes de 4 pots sense NaCl dos dies abans de fer les anàlisis i s'afegeixen a 3 d'elles NaCl de forma que queden les concentracions finals de 50, 100 i 175 mM.

B) Realització de les anàlisis.

5. Se separen les fulles totalment desenvolupades que estiguen en posició més apical i més basal de les plantes de cada tractament.
6. Es trosseguen les fulles i se'n prenen alíquotes d'1 g de pes fresc per les anàlisis.
7. Es trituren amb 5 mL d'aigua destil·lada. Es renta el triturador amb 3 mL més

- d'aigua i s'uneixen els dos volums en un tub de centrífuga.
8. Es bull al bany maria durant 15 min, amb els tubs tapats amb boles de vidre.
 9. Es centrifuga 5 min a 1.500 g
Nota: $X g = 1,12 \times 10^{-5} \times r \times \text{rpm}$; on: r = radi de la centrífuga, en cm. A la centrífuga del laboratori: 4.200 rpm (vel. màx.) \cong 1.200 g.
 10. Es decanta el sobrenadant i s'afora a 10 mL amb aigua destil·lada.
 11. S'utilitzen alíquotes per analitzar el contingut de Cl^- , K^+ i Na^+ de cada extracte.

11.1. Anàlisi de Cl^- :

- a. Es pipetegen 2 mL d'extracte a un erlenmeyer de 50 mL i s'hi afegixen 8 mL d'aigua destil·lada i 3 gotes de cromat de potassi al 5 %.
- b. Es valora amb nitrat de plata 0,01 N
- c. A partir de l'estoc de NaCl 5 mM, es preparen solucions patrons amb quantitats conegudes de Cl^- (0, 0,35, 0,7 i 1,05 mg) i es fa la valoració igual que per a les mostres.

11.2. Anàlisi de K^+ i de Na^+ :

- a) Es dilueixen les mostres convenientment amb aigua destil·lada (aproximadament, 1:10 per a K^+ i entre 1:10 a 1:25 per a Na^+).
- b) Es posa en marxa el fotòmetre de flama i es deixa funcionant 20-30 min.
- c) Amb el filtre de K^+ es mesuren els patrons després d'ajustar el fotòmetre amb les concentracions extremes de la corba.
- d) Es mesuren les mostres.
- e) Es canvia al filtre de Na^+ i es repeteix el procediment fet per al K^+ (punts c i d).

RESULTATS I QÜESTIONS

1) Anoteu els resultats obtinguts en les taules següents:

Corba patró de Cl^-		Mostres												
mg Cl^-	mL AgNO_3	$[\text{NaCl}]_{\text{ext}}$ (mM)	mL AgNO_3				mg Cl^- en la alíquota				mg $\text{Cl}^- \text{g}^{-1}$ PF			
			A+	B+	A-	B-	A+	B+	A-	B-	A+	B+	A-	B-
0		0												
0,35		50												
0,70		100												
1,05		175												

A+: fulla apical; B+: fulla basal; A-: fulla apical, plantes sense arrel; B-: fulla basal, plantes sense arrel.

Corba patró K ⁺		Mostres						
ppm	Lectura	[NaCl] _{ext}	Lectura fotòmetre		ppm K ⁺		mg K ⁺ g ⁻¹ PF	
0			A+	B+	A+	B+	A+	B+
2		0						
4		50						
6		100						
8		175						
10			A-	B-	A-	B-	A-	B-
20		0						
30		50						
40		100						
50		175						

Corba patró Na ⁺		Mostres						
ppm	Lectura	[NaCl] _{ext}	Lectura fotòmetre		ppm Na ⁺		mg Na ⁺ g ⁻¹ PF	
0			A+	B+	A+	B+	A+	B+
2		0						
4		50						
6		100						
8		175						
10			A-	B-	A-	B-	A-	B-
20		0						
30		50						
40		100						
50		175						

NOTA: La relació entre ppm i lectura del fotòmetre no és lineal a partir de 8 ppm, per la qual cosa ha de fer-se'n un ajust quadràtic i aplicar-se l'equació de segon grau per fer les interpolacions a partir d'aquesta concentració. També es poden fer interpolacions lineals entre els dos patrons més propers al valor de cada mostra:

$$x = x_0 + \frac{x_1 - x_0}{y_1 - y_0}(y - y_0)$$

- 2) Feu una anàlisi estadística dels resultats, prenent com a repeticions les dades obtingudes pels altres companys i companyes del grup de pràctiques.
- 3) Calculeu la proporció K/Na per a cada mostra. Es dona antagonisme iònic entre aquest dos ions?
- 4) Compareu les quantitats acumulades en fulles apicals i basals. Què ens indiquen les diferències que hi apareixen?
- 5) Compareu l'acumulació de Na⁺ i de Cl⁻ (mg g⁻¹ PF dia⁻¹) en plantes amb arrels i sense. Indiqueu quina estructura de l'arrel és responsable de la diferència observada.
- 6) Quin element presenta més restriccions en la seua circulació pel xilema? En quines mostres es pot observar aquesta restricció?
- 7) Representeu els resultats gràficament.

TRANSPORT PEL FLOEMA. HIPÒTESI DE MÜNCH

INTRODUCCIÓ

Per explicar el moviment longitudinal dels fotoassimilats a llarga distància a través del floema, s'han proposat diverses hipòtesis: flux en massa, mecanismes electroosmòtics, corrents citoplasmàtics, etc. De totes elles, la que té major suport experimental com a mecanisme responsable del moviment de la saba floemàtica és el model de flux per corrent en massa, per gradient de pressió, o **hipòtesi de Münch**. Segons aquesta hipòtesi, el moviment es dona a conseqüència de la diferència de pressió hidrostàtica que es crea entre els extrems del tub cribrós i que origina un moviment en massa del seu contingut, des de l'extrem de major pressió al de menor.

Aquest model considera els òrgans font i de consum com a dos osmòmetres connectats a través del floema. A l'extrem de l'òrgan font (per exemple, una fulla adulta, fotosintetitzadora) estan produint-se fotoassimilats i carregant-se al floema. El procés de càrrega augmenta la concentració de soluts a l'interior dels tubs cribrosos i disminueix el potencial de solut i, per tant, també el potencial hídric. Això provoca una entrada d'aigua, que comporta un increment del potencial de pressió. A l'altre extrem, a l'òrgan de consum, es descarreguen els assimilats i augmenta el potencial de solut i, en conseqüència, el potencial hídric. L'aigua ix, a favor del gradient de potencial hídric generat per la descàrrega, i el potencial de pressió disminueix. La diferència de pressió hidrostàtica entre els dos extrems del tub és, per tant, la que provoca el moviment de l'aigua, que arrossega els soluts que porta dissolts.

D'acord amb el model, el moviment generat per l'entrada d'aigua als tubs a l'extrem de l'òrgan font i l'eixida al de l'òrgan de consum es mantindrà mentre es mantinga la diferència de concentració que ocasiona l'entrada i l'eixida de l'aigua, és a dir, a la planta, mentre es mantinga la càrrega de soluts en l'òrgan font i la descàrrega en l'òrgan de consum.

En aquesta pràctica es pretén construir un model físic senzill que permeti comprovar el moviment de soluts per corrent en massa produït per un gradient de pressió creat per l'entrada d'aigua a causa de diferències de concentració. A més a més es calcularà la **transferència específica de massa**, que és indicativa de la capacitat del sistema de transport i es defineix com la quantitat de matèria seca transportada per unitat de temps i de superfície transversal.

MATERIALS

Suport metàl·lic i pinça
Pinça de Mohr
Tub de cautxú
Connexió en T
Xeringa de 5 mL
Tub de diàlisi o paper de cel·lofana
Gomes elàstiques

Recipients de 500 mL
Erlenmeyer de 50 mL
Vas de precipitats de 50 mL
Gradeta amb 2 tubs d'assaig
Pipetes de 0,2 i 1 mL
Pipetes Pasteur
Puntes de pipeta automàtica de 5 mL

Reactius: Sacarosa 0,5 i 1,5 M
Resorcinol (resorcina 0,1 % en etanol 96°)

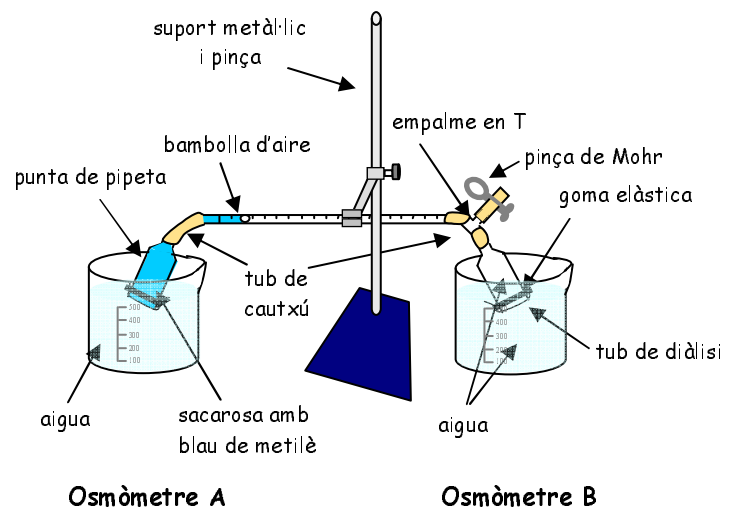
Blau de metilè
HCl 30 %

ESQUEMA DE LA PRÀCTICA

A) Construcció del model de Münch.

1. Prepareu dos osmòmetres, A i B, amb dues puntes de pipeta automàtica de 5 mL. Ompliu l'osmòmetre A amb sacarosa (0, 0,5 o 1,5 M) tenyida amb blau de metilè, i al B fiquen aigua destil·lada. Els osmòmetres quedaran tancats per tub de diàlisi o paper de cel·lofana permeable, fixat fermament amb gomes elàstiques.

2. Connecteu tots dos osmòmetres mitjançant una pipeta de 0,2 mL amb dos trossos de tub de cautxú als extrems. Un d'ells portarà una connexió en T per si cal extraure aire del sistema amb una xeringa, i el tancareu amb la pinça de Mohr (vegeu figura). A l'interior de la pipeta deixeu una bombolla d'aire, a la zona graduada, per poder mesurar la velocitat del flux.



3. Amb la pipeta fixada al suport, introduïu els osmòmetres als recipients amb aigua destil·lada.

4. Anoteu la posició de la bombolla cada 2 min mentre es trobe a la zona graduada.

5. Deixeu el sistema en funcionament durant 1 h, encara que la bombolla ja no es trobe a la zona graduada.

6. Separeu l'osmòmetre B, pipetegeu 1 mL del seu contingut i aforeu-ho amb aigua destil·lada: a 50 mL si la solució de sacarosa de l'osmòmetre A era 1,5 M

o a 25 mL si era 0,5 M. No diluïu el control (0 M).

7. Analitzeu la concentració de sacarosa, tal com s'indica en l'apartat B.

B) Anàlisi de sacarosa (mètode de Roe).

1. Pipetegeu 0,1 mL de cada solució a un tub d'assaig i afegiu-hi 0,5 mL d'aigua destil·lada.
2. Afegiu 0,6 mL de resorcinol i 1,8 mL de HCl. Homogeneïtzau-ho bé i tapeu-ho amb boles de vidre.
3. Manteniu-ho al bany maria a 80 °C, 8 min.
4. Refredeu-ho en bany de gel i mesureu-ne l'absorbància a 490 nm abans de 30 min.
5. Interpoleu els valors obtinguts en una corba patró de sacarosa feta amb 0, 50, 150 i 250 nmol de sacarosa, realitzada igualment i simultània a les mostres.

RESULTATS I QÜESTIONS

1) Anoteu els valors obtinguts en les taules següents:

[Sacarosa] (M)	Flux (posició de la bombolla)								
	0'	2'	4'	6'	8'	10'	12'	14'	16'...
0									
0,5									
1,5									

Corba patró de sacarosa		Mostres			
nmol	A_{490}	[sacarosa] (M)	A_{490}	dilució	nmol
0		0			
50		0,5			
150		1,5			
250					

- 2) Calculeu la velocitat de flux per a cada concentració de sacarosa i doneu els resultats en $\mu\text{L min}^{-1}$.
- 3) Calculeu els valors de transferència específica de massa per a cada concentració de sacarosa, tenint en compte que el volum de la punta de pipeta és de 8 mL i l'àrea del lumen és $0,8 \text{ mm}^2$, així com la dilució feta abans de l'anàlisi. Doneu els resultats en $\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ (Pm sacarosa = 342).

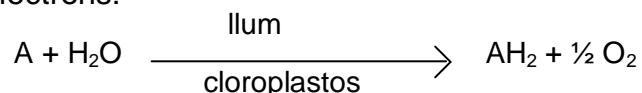
- 4) Fins a quin moment és esperable que es mantinga el sistema en funcionament?
La velocitat de flux serà constant tot el temps? Seria igual en una planta?
- 5) Com es podria determinar la transferència específica de massa a un òrgan en creixement sense necessitat de fer anàlisis químiques? Quins processos fisiològics haurien de considerar-se per obtenir resultats totalment correctes?

REACCIONS LLUMINOSSES DE LA FOTOSÍNTESI

INTRODUCCIÓ

Els cloroplastos aïllats constitueixen el material més adient per a l'estudi de les reaccions fotoquímiques de la fotosíntesi. Amb aquest material, el procés de transport electrònic i altres reaccions que en depenen no són afectats per altres processos fisiològics cel·lulars (respiració...) i, d'altra banda, és possible facilitar l'accés als tilacoides de diverses substàncies que permeten l'estudi de les funcions de l'aparell fotosintètic.

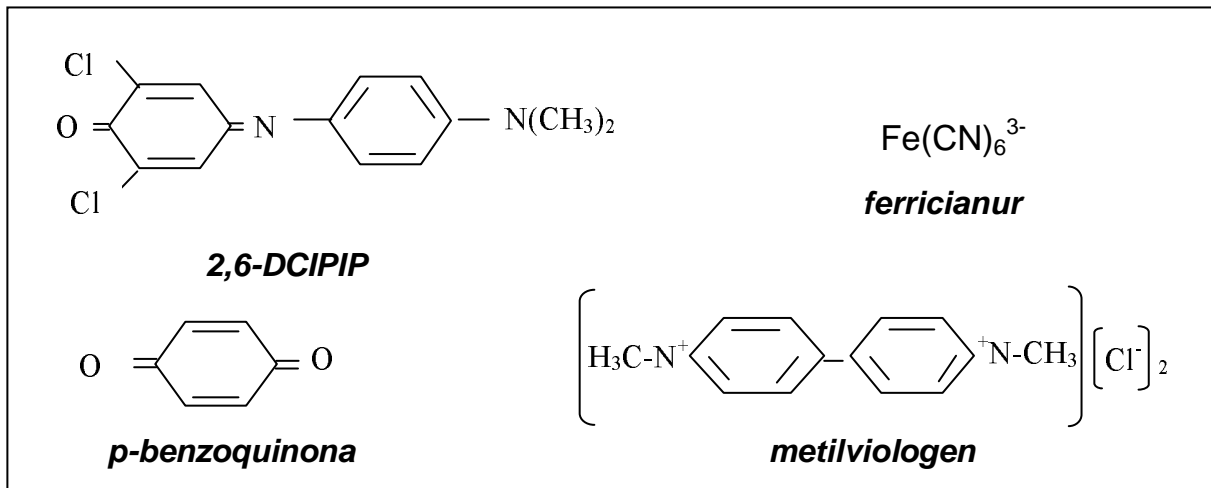
L'aïllament dels cloroplastos es pot dur a terme d'una manera molt senzilla, per trencament de la paret cel·lular, filtració i centrifugació. Si durant el procés d'aïllament es trenca el doble embolcall extern, es perden les substàncies de l'estroma –com ara els enzims involucrats en la fixació del CO₂. També es redueixen d'una forma molt important les concentracions de NADP⁺ i ADP disponibles i es perd una gran part de la ferredoxina, que tan sols està unida dèbilment a la cara externa de la membrana tilacoïdal. Es pot comprovar que aquests cloroplastos trencats són fotoquímicament actius si s'afegeixen ferredoxina, NADP⁺ i alguns cofactors. Però també es pot emprar un mètode més senzill en la pràctica, que consisteix a afegir un acceptor d'electrons:



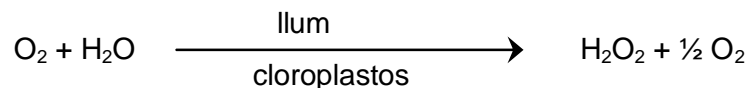
Aquesta reacció s'anomena **reacció de Hill** i representa la capacitat d'alliberament de O₂ per cloroplastos aïllats en presència de llum i d'un acceptor artificial d'electrons (reactiu de Hill).

El doble embolcall del cloroplast constitueix una barrera d'impermeabilitat per a la major part dels reactius de Hill, per la qual cosa cal assegurar-se que es trenquen, perquè hi haja un accés lliure als tilacoides de les substàncies afegides. Això s'aconsegueix donant un xoc osmòtic durant el procés de purificació.

Els reactius de Hill més comuns són el 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP), el ferricianur, la p-benzoquinona o el metilviologen. Els tres primers poden acceptar electrons del fotosistema II (PSII, a nivell de la plastoquinona: potencial redox +0.113 V) i, en menor mesura, del fotosistema I (PSI, a nivell de l'acceptor primari, substància X), mentre que l'últim tan sols pot ser reduït pel PSI, a causa del seu potencial redox molt negatiu (-0.44 V). El DCPIP (potencial redox +0.230 V), en reduir-se, canvia de color: de blau en estat oxidat a incolor en estat reduït, cosa que permet seguir visualment el procés de reducció.

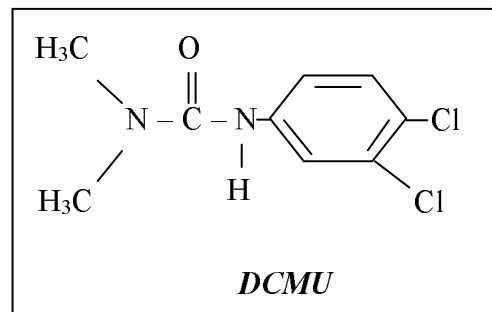


Quan els cloroplastos aïllats són il·luminats en absència d'un acceptor electrònic, els electrons del PSI són acceptats per l'oxigen (**reacció de Mehler**) i es produeix un consum net de O₂ amb formació de peròxid d'hidrogen:



L'oxigen, però, no és un bon acceptor electrònic i la reacció sembla donar-se en condicions naturals tan sols quan la taxa fotosintètica (per ex.: a elevades intensitats lluminoses) és limitada per la provisió de CO₂.

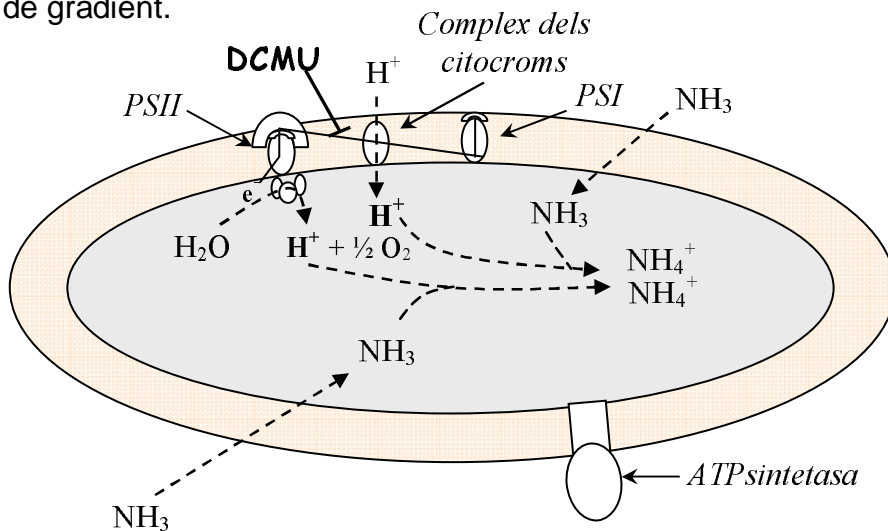
Algunes substàncies, com ara la diclorofenildimetilurea (DCMU) i altres derivats de la urea, actuen com a inhibidors de la fotosíntesi (són, per tant, herbicides) perquè bloquegen selectivament algun pas de la cadena de transport electrònic.



El DCMU impedeix la transferència entre la quinona Q_B i la plastoquinona (PQ). L'activitat del PSII és inhibida per aquest herbicida, però la del PSI no es veu afectada si se subministra un donador d'electrons adequat per a aquest fotosistema.

Com a conseqüència del transport electrònic es produeix un alliberament de protons a l'espai intratilaçoïdal (lumen) i es donen canvis de pH: el lumen s'acidifica, mentre que la solució externa (en cloroplastos intactes, l'estroma) es basifica. El gradient de pH que es crea genera la força motriu necessària per la síntesi d'ATP: la dissipació del gradient a través de l'enzim ATP_{sintetasa} s'acobla a la formació de l'enllaç èster ric en energia de l'ADP amb P_i.

El gradient de H^+ es pot dissipar també sense acoblament amb la síntesi d'ATP per alguns compostos que actuen com a desacobladors. Algunes substàncies permeabilitzen les membranes als H^+ , mentre que els compostos d'amoni en solució formen ions amoni (NH_4^+) i també amoníac (NH_3), que pot travessar la membrana. Al lumen es produeix un equilibri entre NH_3 i NH_4^+ amb consum de H^+ , la qual cosa pot provocar la dissipació total del gradient existent. Com a conseqüència, el transport electrònic es veu estimulat, per raó que el bombament de H^+ ja no es produeix en contra de gradient.



En aquesta pràctica estudiarem diversos aspectes de la fase lluminosa de la fotosíntesi. Concretament, observarem l'absorció de l'energia lluminosa de les diferents longituds d'ona (espectre d'absorció) i el seu aprofitament per al transport electrònic fotosintètic en les membranes tilacoïdals (reacció de Hill), o bé la seua dissipació quan no és aprofitada (emissió de fluorescència).

Així, al llarg de la pràctica extraurem vesícules tilacoïdals funcionals i quantificarem el contingut en clorofil·les de l'extracte. Amb la solució acetònica en què dissoldrem les clorofil·les observarem l'espectre d'absorció. Quan l'energia absorbida per les clorofil·les no és transferida a cap acceptor, els electrons excitats per la llum retornen a l'estat fonamental i emeten energia de major longitud d'ona que la necessària per excitar els electrons, però encara dins l'espectre visible (fluorescència). Amb l'extracte acetònic obtingut observarem també l'emissió típica de fluorescència que es dona en absència d'acceptors.

El transport electrònic en les vesícules tilacoïdals i l'efecte que un inhibidor del flux d'electrons (l'herbicida DCMU) i d'un desacoblador (NH_4Cl) tenen sobre el procés, ho mesurarem mitjançant el seguiment de la reacció de Hill amb DCPIP com a acceptor d'electrons i per les variacions de pH que es donen en formar-se el gradient de protons.

MATERIALS

Fulls d'espínacs o bledes fresques	Solucions estoc per a preparar el tampó:
Vasos de precipitats, de 100 mL (2)	KH_2PO_4 1 M
Triturador	KOH 1×10^{-1} M
Tela de mussolina	Medi d'extracció:
Embut de vidre	tampó fosfat 10^{-1} M + NaCl 35 mM +
Centrífuga de taula	MgCl_2 5 mM + sacarosa 0,3 M, pH 7,4
Tubs de centrífuga (4)	Medi de resuspensió i anàlisi:
Agitador de tubs	tampó fosfat 5×10^{-2} M + NaCl 35 mM +
Tubs d'assaig (6)	MgCl_2 5 mM + sacarosa 0,3 M, pH 6,8
Pipetes automàtiques (0,2, 1 i 5 mL)	Acetona 80 %
Bombeta de 100 W	DCPIP 10^{-3} M
Font de llum blava	DCMU 10^{-3} M
Espectrofotòmetre	NH_4Cl $5 \cdot 10^{-2}$ M
Cronòmetre	HCl 33 % (p/v)
Agitador magnètic	Metanol saturat de KOH
Enregistrador de paper	Vial folrat amb paper negre opac

ESQUEMA DE LA PRÀCTICA

A) EXTRACCIÓ DE VESÍCULES TILACOÏDALS

Nota: Tot el procés ha de fer-se tan ràpidament com siga possible, amb material i solucions fredes, mantingudes en gel, i sense llum solar directa.

1. Es trituren 5 g PF de fulles verdes amb 8 mL de medi d'extracció.
2. Es filtren a través de doble tela de mussolina.
3. Es centrifuga 10 min a 1.000-1.500 g.
4. Es rebutja el sobrenadant i es resuspèn el precipitat de cada tub amb 2 mL de medi de resuspensió. Es manté l'extracte en gel.

B) DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT EN CLOROFIL·LA DE L'EXTRACTE

5. Es pipetegen 0,1 mL d'extracte a un tub d'assaig que continga 9,9 mL d'acetona al 80 %.
6. Es filtra la solució acetònica a un altre tub a través de paper de filtre.
7. Es mesura l'absorbància de la solució acetònica neta, a 652 nm.
8. Es calcula el contingut en clorofil·la de l'extracte en solució d'anàlisi, per la fórmula: $\text{mg clorofil·la / mL extracte} = A_{652} \times 2,9$
9. Es reserva en la foscor la resta de la solució acetònica per a l'apartat C.

C. OBSERVACIÓ DE LES PROPIETATS D'ABSORCIÓ I DISSIPACIÓ DE L'ENERGIA PER LES CLOROFIL·LES

10. Amb una alíquota de l'extracte acetònic del punt 9 es construeix un espectre d'absorció entre 400 i 700 nm.
11. Es reparteix la resta de l'extracte en tres tubs d'assaig. S'afegeix metanol saturat amb KOH a un d'ells i HCl a un altre. S'homogeneïtzen bé els tubs.

12. S'il·luminen amb llum blava en cambra fosca i s'observa la fluorescència típica de les clorofil·les i els possibles canvis ocasionats pels reactius afegits.

D. ESTUDI DEL TRANSPORT D'ELECTRONS I PROTONS. Efecte de l'herbicida fotosintètic DCMU i del desacobrador NH_4Cl .

D.1. MESURA DE LA REACCIÓ DE HILL

13. D'acord amb el resultat obtingut en el punt 8, calculeu quin volum d'extracte conté 50 μg de clorofil·la (volum = x mL).
14. Prepareu 4 tubs d'assaig que continguin:

Volums (mL)	Blanc	Desacobrador	Control	Herbicida	Foscor
Medi d'anàlisi	$3 - x$	$2,65 - x$	$2,8 - x$	$2,65 - x$	$2,8 - x$
Extracte *	x	x	x	x	x
NH_4Cl	---	0,15	---	---	---
DCMU	---	---	---	0,15	---
* agiteu molt bé l'extracte abans de pipetejar a cada tub					

15. Ajusteu amb el 0 de l'espectrofotòmetre a 600 nm amb el blanc.
16. Afegiu 0,2 mL de DCPIP al control, mescleu-ho bé, col·loqueu-ho enfront del llum (distància aproximada de 20 cm) i poseu en marxa el cronòmetre. Quan observeu un descoloriment aparent però no total (compareu-ho amb el blanc), atureu el cronòmetre i determineu A_{600} .
17. Repetiu el punt 16 per als tubs amb herbicida i amb desacobrador i deixeu-los enfront del llum el mateix temps que ha estat el control.

D.2. MESURA DE LA FORMACIÓ DEL GRADIENT DE PROTONS

18. D'acord amb el resultat obtingut en el punt 8, calculeu quin volum d'extracte conté 250 μg de clorofil·la (volum = y mL).
19. Prepareu un vial folrat amb paper negre opac, amb $9,5 - y$ mL de medi d'anàlisi i col·loqueu sobre l'agitador magnètic.
20. Afegiu-hi y mL d'extracte. Connecteu el pH-metre i l'enregistrador de paper.
21. Quan es mantinga un pH estable, lleveu el paper negre que envolta el vial i observeu els canvis de pH. (Si no disposeu d'un enregistrador, anoteu el valor de pH cada 10 segons durant els canvis llum/foscor i cada 30 segons durant l'estabilització. Després elaboreu un gràfic amb les dades obtingudes.)
22. Tapeu el vial novament i observeu els canvis de pH.
23. En la foscor, afegiu-hi 0,5 mL de DCPIP. Quan el pH es mantinga estable, repetiu el cicle llum/foscor.

24. Afegiu-hi 0,5 mL de NH_4Cl . Quan el pH es mantinga estable, repetiu el cicle llum/foscor.
25. En un altre vial repetiu els punts 19 a 23.
26. Afegiu-hi 0,5 mL de DCMU. Quan el pH es mantinga estable, repetiu el cicle llum/foscor.

RESULTATS I QÜESTIONS

- Localitzeu en quin pas del procés d'extracció es realitza el trencament osmòtic de l'embolcall extern dels cloroplastos.
- Sabent que el coeficient d'extinció de les clorofil·les *a* i *b* dissoltes en acetona al 80 % i a 652 nm és de $34,5 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, indiqueu com s'ha tret el coeficient de proporcionalitat emprat en el càlcul dels mg de clorofil·la per mL d'extracte (punt 8).
- Compareu l'espectre d'absorció de les clorofil·les que heu obtingut (apartat C) amb els que figuren als llibres. En quina regió de longituds d'ona trobeu diferències entre tots dos? A què penseu que pot ser degut?
- Si, en comptes d'il·luminar l'extracte acetònic de clorofil·les amb llum blava (apartat C), l'haguérem il·luminat amb llum roja, de quin color seria la fluorescència? I si l'haguérem il·luminat amb llum verda?
- Anoteu els resultats de l'apartat D.1. en la taula. Feu un gràfic en què es represente el percentatge de promoció o d'inhibició de la reacció que produeixen les substàncies emprades (DCMU, NH_4Cl), en comparació amb el control.

	Control	Desacoblador	Herbicida	Foscor
A_{600}				

- Anoteu les variacions de pH obtingudes en l'apartat D.2 en les transicions de foscor a llum ($F \rightarrow L$) i de llum a foscor ($L \rightarrow F$) per a cada tractament i respon: Per què les variacions són diferents en presència de DCPIP? Quin és l'efecte del DCMU? I del NH_4Cl ?

ΔpH	- DCPIP		+ DCPIP	
	$F \rightarrow L$	$L \rightarrow F$	$F \rightarrow L$	$L \rightarrow F$
Control				
+ NH_4				
+DCMU				

- Compareu els resultats de l'apartat D.1. amb els del D.2. i responeu: Quina diferència trobeu entre el tipus d'efecte (estimulació/inhibició) del DCMU i el del

NH_4Cl sobre els dos processos estudiats? Sobre quin d'ells actua el DCMU? I el NH_4Cl ?

- 8) Per què penseu que la concentració del tampó del medi d'anàlisi és tan baixa? Per a quin apartat de la pràctica és important això?
- 9) Feu un esquema senzill del transport electrònic fotosintètic, inclosa la posició que hi ocuparien el DCMU, el DCPIP i el metilviologen.
- 10) Sabent que el potencial redox del P700 és de +0,430 V i que el DCPIP es redueix per reacció química amb àcid ascòrbic, dissenyeu un experiment utilitzant les substàncies emprades o descrites en aquesta pràctica que permeta determinar el transport electrònic dependent únicament del PSI.

MESURA QUANTITATIVA DE LA RESPIRACIÓ

INTRODUCCIÓ

La respiració consisteix en una sèrie de reaccions d'oxidació-reducció al llarg de la qual s'oxida un substrat fins a formar CO_2 i es redueix O_2 a H_2O . En el procés es produeix un alliberament d'energia. Aquesta energia es perd en part en forma de calor, però una altra part és emmagatzemada en forma d'ATP, que pot ser utilitzat com a font d'energia en una gran quantitat de reaccions cel·lulars.

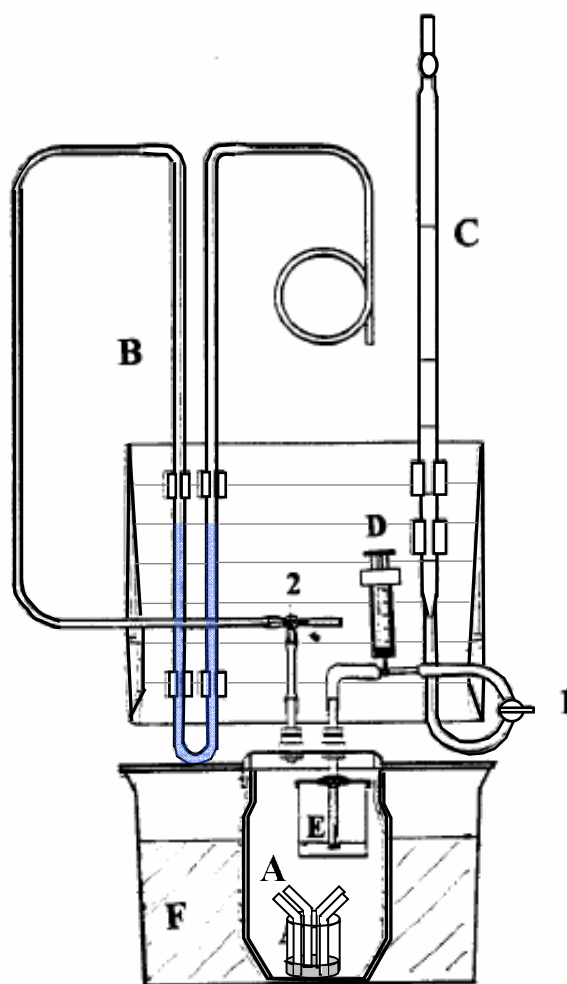
Durant la respiració es dona un intens intercanvi de gasos (consum de O_2 i alliberament de CO_2) que es pot quantificar per mètodes diversos, tant químics (absorció del CO_2 i valoració, canvis de pH, etc) com físics (volumetria o manometria, absorció en l'infraroig, etc).

En aquesta pràctica utilitzarem un mètode físic (respiròmetre volumètric: vegeu figura) per mesurar la taxa de respiració d'un material vegetal (llavors en germinació, arrels o fulles). Aquest aparell es basa en el fet que, si el procés té lloc en un recipient tancat hermèticament [A] i connectat a un manòmetre [B], qualsevol variació del nombre de molècules gasoses dins el recipient implicarà –a temperatura constant– una variació de pressió (ΔP) i, per tant, del nivell del líquid manomètric. Podem quantificar la variació de volum que s'ha produït en l'atmosfera del recipient fent retornar el manòmetre a la posició inicial.

El canvi de volum que es mesura d'aquesta manera representa el balanç entre el O_2 consumit i el CO_2 produït; és a dir, es tracta d'un volum diferencial:

$$\Delta V_d = V_{\text{O}_2} (\text{consumit}) - V_{\text{CO}_2} (\text{alliberat}) \quad (1)$$

Aquest ΔV_d varia en funció del substrat que s'oxide. Així, mentre que en l'oxidació dels carbohidrats les quantitats de O_2 i de CO_2 són equivalents, en



Respiròmetre volumètric

l'oxidació dels lípids es consumeix més O₂ i en la dels àcids orgànics es produeix més CO₂. Per això, les variacions de nivell del líquid manomètric es poden donar en qualsevol sentit i, per tornar a equilibrar el manòmetre, caldrà introduir aigua de la pipeta [C] en el recipient, a través de la clau [1] o succionar-la amb la xeringa [D] des del recipient intern [E]. Esquemàticament:

Intercanvi de gasos	Vd	Branca esquerra del manòmetre	Aigua amb
VO ₂ > VCO ₂	positiu	cap amunt	pipeta
VO ₂ < VCO ₂	negatiu	cap avall	xeringa

Per poder calcular la taxa respiratòria del material vegetal que està estudiant-se, caldrà repetir l'experiment en presència d'un absorbent de CO₂, com ara KOH concentrat, per mesurar el consum de O₂ exclusivament. D'aquesta manera es podrà calcular el CO₂ alliberat per unitat de pes i de temps.

De l'expressió (1) podem extraure:

$$\mathbf{VCO_2 \text{ alliberat} = VO_2 - \Delta Vd}$$

El primer terme de l'equació (VO₂), el coneixem a través de l'experiment amb KOH i el segon terme (ΔVd) a través de l'experiment sense KOH. En aquest cas, però, cal tenir en compte el signe ja que, com hem vist, els resultats d'aquesta part poden ser positius, zero o negatius.

Els diferents valors de VCO₂ alliberat que es poden calcular de les mesures que es prenen al llarg de la pràctica, permetran calcular per regressió el valor esperat en 60 min (VCO₂ alliberat per hora) i d'acord amb el nombre de llavors o el pes fresc del material vegetal utilitzat, podem estandarditzar els resultats a VCO₂ alliberat h⁻¹ llavor⁻¹ o g⁻¹ PF i transformar-los en mg CO₂ h⁻¹ llavor⁻¹ o g⁻¹ PF.

En funció de l'estat de reducció del substrat respiratori que utilitzen les cèl·lules, la proporció entre la quantitat de CO₂ alliberat i la de O₂ consumit pot ser variable. Això dóna *quocients respiratoris* (QR) diferents per als diferents substrats. En el cas dels carbohidrats, en els quals la proporció C/O és 1/1, el QR = 1, ja que es consumeix la mateixa quantitat d'oxigen per a oxidar-los a CO₂. Els substrats més reduïts, com ara els lípids, requereixen més oxigen per a la seua oxidació fins a CO₂, i donen QR < 1. Per contra, els substrats més oxidats, com els àcids orgànics, donen QR > 1. Aquest últim valor es presenta també si el teixit en estudi utilitza una part del NADH obtingut en la respiració per reduir nitrats. Així, arrels subministrades amb NH₄⁺ com a font de nitrogen presenten QR = 1, mentre que les subministrades amb NO₃⁻ mostren QR > 1.

MATERIALS

Llavors de cigró (*Cicer arietinum*)
Estufa de germinació
Balança
Respiròmetre volumètric
KOH en solució saturada
Líquid de Brodie (5% NaCl, 1% colat de sodi, 0,03% blau d'Evans; $\rho = 1,033 \text{ g cm}^{-3}$)
Pipeta graduada de 25 mL
Xeringa de 5 mL
Vasos de precipitats
Tires de paper de filtre

ESQUEMA DE LA PRÀCTICA

- A) S'ameren en aigua 25 llavors de cigró durant 6 h i es deixen germinar sobre paper de filtre humit, en l'estufa a 25 °C, uns 4-5 dies (arrels de 2-3 cm de longitud).
- B) Mesura de la respiració.
1. S'ompli el tub del manòmetre amb líquid de Brodie aproximadament fins a la meitat. Es col·loca el tub a la placa de plàstic del respiròmetre, fent coincidir el menisc amb alguna de les marques de la placa.
 2. Amb la clau [1] tancada s'ompli la pipeta amb aigua. S'obri la clau i s'ompli el tub flexible fins a deixar-ne caure un parell de mL dins el recipient [B]. Es torna a tancar la clau i s'afegeix aigua a la pipeta, si cal, per enrasar-la a 0.
 3. Es determina el pes fresc de les llavors i s'introdueixen al recipient [A]. S'hi introdueix també un vas de precipitats amb 10 mL d'aigua destil·lada i tires de paper de filtre que actuen de metxa. S'engreixa bé l'anell de goma i es tanca el recipient hermèticament.
 4. Es connecta el tub esquerre del manòmetre a la clau de tres vies [2]. Es gira la clau perquè, alternativament, les pressions al manòmetre i al recipient s'equilibren amb la del medi ambient.
 5. Es prepara un bany d'aigua al recipient extern [F] i es manté la temperatura constant durant tot l'experiment.
 6. Es col·loca la clau [2] de manera que el recipient quede obert a l'exterior i es deixa en aquesta posició durant ~ 10 min, perquè s'equilibre tèrmicament amb la temperatura del bany.
 7. Es torna a alternar la posició de la clau [2] entre el manòmetre i el recipient i es deixa de forma que aïlle el sistema del medi ambient (OFF cap al tub curt, obert a l'aire). Es posa el cronòmetre en marxa immediatament.

8. Als 5 min s'equilibra el nivell de les dues branques del manòmetre, se succiona aigua amb la xeringa o es deixa caure de la pipeta, segons calga. Se n'anota el volum.
9. Es prenen mesures cada 5 min, fins als 45 min.
10. Es torna a repetir els punts 4 a 9, després de substituir en el recipient [A] l'aigua del vas de precipitats per 10 mL de KOH saturat i metxes de paper noves. Cal tenir molta cura a fi que, en cap moment, la solució de KOH no es pose en contacte amb el material vegetal.

RESULTATS I QÜESTIONS

- 1) Anoteu, per a cada temps de mesura, les variacions de volum des del moment inicial.

ΔVol (mL)	5'	10'	15'	20'	25'	30'	35'	40'	45'
+ H ₂ O									
+ KOH									

- 2) Representeu gràficament els resultat obtinguts de ΔVd i de VO_2 i calculeu els mL de CO₂ que s'alliberen per llavor i per hora.
- 3) Transformeu els resultats en mg de CO₂ alliberats per cada gram de pes i per hora, tenint en compte que el Pm del CO₂ és 44 i assumint que es treballa a pressió atmosfèrica (1 atm) i a 20 °C.
- 4) Calculeu el valor del quocient respiratori (QR = CO₂ alliberat / O₂ consumit)
- 5) Si repetírem l'experiment amb llavors sense testa, caldria esperar valors de respiració semblants, majors o menors que amb testa? Per què?
- 6) Per què podem mesurar directament VO_2 quan està present el KOH? Formuleu la reacció del CO₂ amb el KOH.
- 7) Què caldrà fer si volem mesurar la respiració de fulles amb aquest respiròmetre?
- 8) Esperaríeu que hi haguera variació del líquid manomètric sense material vegetal en el recipient [A]? Amb KOH o sense? Per què?
- 9) En cas que la resposta a la qüestió anterior siga positiva, en quin sentit es desplaçaria la branca esquerra del manòmetre? Quin volum d'aigua s'empraria per equilibrar el manòmetre? Aquest volum, el mesuraríem amb la xeringa o amb la pipeta? (Nota: el volum del recipient [A] és 1 L.)
- 10) Quant de temps, com a màxim (hores i minuts), es podria mantenir la respiració al ritme calculat i sota les mateixes condicions de l'experiment? (Nota: assumir un

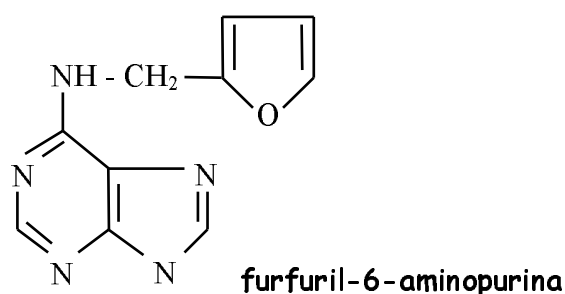
volum del recipient = 1 L.)

- 11) Feu un esquema senzill de la respiració, on indiqueu els passos en què es consumeix O_2 i en què s'allibera CO_2 .
- 12) Feu un esquema senzill d'un disseny experimental que permeti quantificar l'alliberament de CO_2 , amb la utilització d'un pH-metre com a aparell de mesura (vegeu qüestió 5).

HORMONES VEGETALS: CITOCININES

INTRODUCCIÓ

Les citocinines constitueixen un grup de reguladors del creixement en què entre els seus efectes més característics hi ha el d'estimulació de la divisió cel·lular, el qual va permetre el seu descobriment i d'on reben nom. En la actualitat, la utilització pràctica més freqüent de les citocinines, en interacció amb les auxines, és en el cultiu de teixits vegetals, i es basa en la seua acció promotora de la divisió i l'activitat organogènica que presenten, afavorint la formació de brots a partir de teixit indiferenciat (*cal·lus*).



Totes les citocinines tenen en comú un anell d'adenina en la seua estructura química i un substituent lateral en posició 6, la naturalesa del qual no sembla ser crítica per a l'acció biològica. El principal lloc de síntesi de citocinines són les arrels.

Entre altres efectes fisiològics, com ara afavorir l'eixida de la dormició d'algunes llavors o la supressió de la dominància apical –en interacció amb les auxines–, les citocinines tenen la capacitat de retardar la senescència de les fulles. Aquest efecte està relacionat amb la seua capacitat de promoure la síntesi d'àcids nucleics i proteïnes, així com amb la regulació dels transport de metabòlits cap a les zones tractades amb la fitohormona i és un fenomen que es pot emprar com a mètode de valoració d'aquestes substàncies reguladores.

Quan una fulla madura –però encara activa metabòlicament– se separa de la planta, se n'inicia ràpidament el procés de senescència. El primer símptoma visible de la senescència en fulles és el engrogiment a causa de la degradació de les clorofil·les, la qual cosa permet que altres pigments (principalment xantofil·les i carotenoides) es mostren visibles. Aquest fenomen es produeix amb major rapidesa en la foscor que en presència de llum. La quinetina o FAP (furfuril-6-aminopurina) és un regulador de síntesi, amb acció citocinina, que quan s'aplica en solució aquosa és capaç de retardar la senescència de fulles separades de la planta. El primer efecte d'aquesta substància és a nivell de la clorofil·la, afavorint el manteniment de la seua estructura i retardant-ne, per tant, la degradació.

L'objectiu de la pràctica és observar i quantificar l'efecte fisiològic de la quinetina sobre aquest procés, així com la influència de la llum.

MATERIALS

1a sessió:	Plantes d'avena (<i>Avena sativa</i>)	2a sessió:	Morter
	Càpsules de Petri		Acetona 80 %
	Matràs aforat de 25 mL		Tela de mussolina
	Pipeta d'1 mL		Embut de vidre
	Estufa		Paper de filtre
	Pinces		Matràs aforat de 10 mL
	Regle		Espectrofotòmetre
	Balança		
	Solució estoc de FAP, 10 mg L ⁻¹		

ESQUEMA DE LA PRÀCTICA

- A. Es posen llavors d'avena en imbibició durant 12 h.
- B. Se sembren en pots amb vermiculita humida i es cultiven en cambra de cultiu, a la llum i a 30 °C fins que les fulles arriben a una longitud de 10-12 cm (aproximadament, 7 dies).

1a sessió:

1. Es preparen 4 càpsules de Petri i afegir 20 mL de solució de quinetina 1 mg L⁻¹ a dos d'elles i 20 mL d'aigua destil·lada a les altres dues. Es retolen adequadament.
2. Es tallen 20 segments de fulla, de 6 cm de longitud i es pesen en grups de 5 segments.
3. Es col·loquen cada grup de segments en una càpsula de Petri.
4. Es manté durant 7 dies una capsula amb aigua i una altra amb quinetina en la foscor. Les altres dues es mantenen en condicions ambientals de llum (sobre el banc del laboratori).

2a sessió:

5. Es tritura cada grup de fulles en morter, amb acetona 80 %.
6. Es filtra a través de tela de mussolina.
7. S'aforen a 10 mL amb acetona 80 %.
8. S'homogeneïtza bé i es filtra una alíquota a través de paper de filtre.
9. Es determina l'absorbància d'aquesta alíquota amb l'espectrofotòmetre a 652 nm.

RESULTATS I QÜESTIONS

1) Anoteu les dades obtingudes en la taula següent:

Tub	Condicions Iluminoses	FAP (mg L ⁻¹)	Pes fresc (g)	Clorofil·la	
				A _{652nm}	mg g ⁻¹ PF
1	Llum	0			
2		1			
3	Foscor	0			
4		1			

2) Calculeu el contingut en clorofil·la (última columna de la taula), tenint en compte que el coeficient d'extinció específic (ϵ_{λ}) per a les clorofil·les dissoltes en acetona al 80 % i a 652 nm és de 34,5 mL mg⁻¹ cm⁻¹.

3) Prenent com a repeticions les dades obtingudes pels altres companys i companyes del grup de pràctiques, calculeu les mitjanes i les desviacions típiques. Representeu gràficament els resultats en forma d'histogrames.

4) Aquest experiment es va provar amb segments de fulles de dues espècies diferents, utilitzant una concentració d'1 mg L⁻¹ de citocinina. Les dades obtingudes van ser:

		Pes fresc	Matràs aforat d'acetona	A _{652nm}
Espècie A:	control	0,25 g	10 mL	0,235
	+ hormona	0,36 g	25 mL	0,140
Espècie B:	control	0,49 g	10 mL	0,243
	+ hormona	0,47 g	25 mL	0,200

Quines conclusions podeu traure d'aquests resultats?

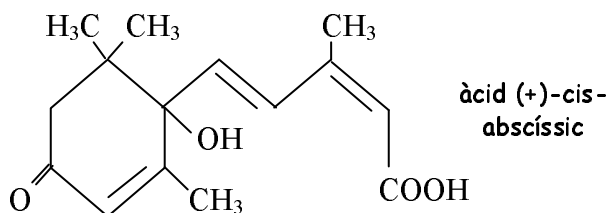
5) Quina és la molaritat de la solució de quinetina aplicada a les fulles?
(Pm = 215,22)

HORMONES VEGETALS: ÀCID ABSCÍSSIC (ABA)

INTRODUCCIÓ

L'àcid abscíssic (ABA) és un regulador del creixement vegetal que, a diferència d'altres fitohormones, aconpleix un paper principalment inhibidor en nombrosos processos del desenvolupament. Així, sovint mostra efectes fisiològics antagònics als d'altres hormones, com ara els de les gibberel·lines (GA) en la germinació de llavors, la mobilització de reserves, etc., o el de les auxines sobre l'elongació de coleòptils.

L'ABA és un sesquiterpè que se sintetitza a partir de carotenoides (tetraterpens) en pràcticament totes les cèl·lules que contenen plastos.



El descobriment de l'ABA, al voltant del 1963-65, va anar associat a la investigació dels processos de la dormició de gemmes i llavors, per la qual cosa es va anomenar *dormina*, i del d'abscissió d'òrgans, del qual va rebre també nom: *abscissina II*. Tot i que el nom actual de l'hormona prové d'aquest últim procés, l'abscissió no sembla ser un procés controlat per ABA sinó per etilè, en interacció amb auxines.

Actualment es considera que un dels papers principals de l'ABA és el control de les respostes a situacions d'estrès. De fet, la concentració endògena d'ABA pot variar molt en poc de temps a conseqüència de factors ambientals desfavorables (sequera, salinitat, etc). Però també participa en la regulació d'altres aspectes de l'economia hídrica de les plantes: control del tancament estomàtic, de la dessecació programada de les llavors en les últimes etapes de l'embriogènesi, etc.

Les respostes induïdes per ABA es produeixen tant a llarg termini, mitjançades per inducció de l'expressió gènica, com a curt termini, en què l'acció es basa generalment en la modificació dels fluxos iònics (per exemple, els moviments estomàtics).

En contrast amb altres fitohormones, que tenen nombroses aplicacions agroalimentàries, de moment no es fa ús comercial de l'ABA, tot i que s'han fet intents d'utilització com a antitranspirant.

La major part del bioassajos per a l'ABA es basen en la seua capacitat inhibidora de nombrosos processos fisiològics. L'objectiu d'aquesta pràctica és l'estudi de l'acció inhibidora de l'ABA sobre el creixement d'embrions aïllats.

MATERIALS

Llavors de blat (<i>Triticum aestivum</i>)	Pipetes d'1 i 10 mL
Escalpel	Calibrador o paper mil·limetrat
Càpsules de Petri amb paper de filtre	Estufa
Àcid abscísic (20 mg L ⁻¹)	

ESQUEMA DE LA PRÀCTICA

1. Es posen a amerar 100-150 llavors de blat en la foscor durant 48 h, a 25 °C.
2. Se separen els embrions de la resta de la llavor. Durant l'operació, es mantenen en càpsula de Petri amb paper humit per evitar que es dessequen.
3. Es preparen 6 càpsules de Petri, posant-hi 1 capa de paper de filtre i 20 mL de solució d'ABA a les concentracions següents: 0, 0,1, 0,5, 1, 5 i 20 mg L⁻¹. Es retolen les càpsules adequadament.
4. Se seleccionen 60 embrions de mida i aspecte uniformes i se'n posen 10 a cada càpsula.
5. Es col·loquen les càpsules en estufa a 30 °C durant 7 dies.
6. Es mesura la longitud dels embrions amb el calibrador i se'n trau la mitjana i la desviació típica per a cada concentració.

RESULTATS I QÜESTIONS

- 1) Anoteu els resultats obtinguts en la taula següent:

[ABA] (mg L ⁻¹)	Valor mitjà	Desviació típica
0		
0,1		
0,5		
1		
5		
20		

- 2) Feu una anàlisi estadística dels resultats, prenent com a repeticions les dades obtingudes pels altres companys i companyes del grup de pràctiques.
- 8) Representeu gràficament els resultats en escala semilogarítmica (*creixement* enfront de *log [ABA]*).
- 9) Per què se separen els embrions de la resta de la llavor? S'obtidrien els mateixos resultats si no es duguera a terme aquesta operació?
- 10) Calculeu la molaritat de la solució estoc d'ABA (20 mg L⁻¹), sabent que el pes molecular és 264,3.

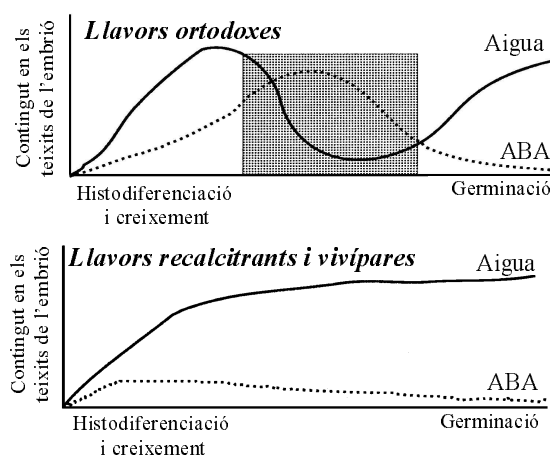
GERMINACIÓ: FACTORS AMBIENTALS QUE AFECTEN LA VIABILITAT DE LES LLAVORS

INTRODUCCIÓ

Als espermatòfits, la reproducció sexual de la planta es dona mitjançant la formació de llavors. Les llavors madures són formades per un embrió i teixit de reserva (endosperma), envoltats per la coberta seminal (testa) i són els òrgans de la planta amb un contingut hídric més baix, fet que condiciona una activitat metabòlica molt reduïda. El baix contingut hídric de les llavors d'un gran nombre d'espècies és degut al fet que en les últimes etapes de l'embriogènesi es dona una dessecació programada, reversible, controlada per ABA, que fa que, en la major part de les espècies, les llavors madures es troben en estat de quiescència, amb a penes una mínima activitat respiratòria. Així, la característica més notable de les llavors quiescents és la deshidratació (llavors *ortodoxes*). Òbviament, aquest fet assegura la supervivència de les llavors i, per tant, de l'espècie, en condicions ambientals adverses. En contrast, les llavors d'altres espècies perden la viabilitat si el grau de deshidratació sobrepassa un determinat valor llindar (llavors *recalcitrants*) i fins i tot poden començar la germinació abans de separar-se de la planta mare (llavors *vivíparas*).

En condicions favorables, les llavors quiescents absorbeixen aigua (imbibició) i s'inicia una sèrie de processos bioquímics, morfològics i fisiològics que condueixen al desenvolupament d'una nova planta a partir de l'embrió. Aquesta sèrie de processos constitueixen la germinació. En sentit estricte, la germinació acaba quan la nova planta és totalment autònoma (no depèn de les reserves subministrades per la llavor). Normalment s'assumeix que la llavor ha germinat quan es produeix l'emergència de l'arrel a través de la testa.

L'objectiu d'aquesta pràctica és estudiar la importància de l'estat d'hidratació sobre la capacitat de resistència a condicions ambientals extremes i, per tant, sobre la viabilitat i la capacitat germinativa de llavors d'una espècie *ortodoxa*, l'alfals. Les llavors, amerades o seques, seran sotmeses a diversos tractaments físics i químics;



posteriorment es procedirà a la sembra i després d'una setmana, a l'avaluació dels resultats de germinació obtinguts en funció dels tractaments.

MATERIALS

Llavors d'alfals (<i>Medicago sativa</i>)	Bany termostatat
Gradeta amb tubs d'assaig	Congelador
Càpsules de Petri amb paper de filtre	Estufa
Pinces	Etanol 80 %

ESQUEMA DE LA PRÀCTICA

1. Se separen les llavors en dos grups de 100 i se n'introdueix un en aigua destil·lada durant 12 hores. Es manté l'altre grup en sec.
2. Es distribueixen les llavors de cada grup en 4 lots de 50 llavors i se sotmet cada lot a aquests tractaments (separadament les llavors seques i les amerades):
 - A) Tractament de fred: es col·loca un lot de 50 llavors seques i un altre d'amerades en dos tubs d'assaig eixuts. Es tapen els tubs i es mantenen en congelador a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 1 h.
 - B) Tractament de calor: es fa el mateix que en l'apartat A, però s'introdueixen els tubs en un bany maria a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 1 h.
 - C) Tractament amb etanol: es fa el mateix que en l'apartat A, però s'afegeixen als tubs 2-3 mL d'etanol al 80 %. Es mantenen les llavors submergides en l'alcohol durant 1 h.
3. Es preparen 8 càpsules de Petri, posant-hi 1 capa de paper de filtre i 5 mL d'aigua destil·lada i es retolen adequadament.
4. Es col·loquen les llavors de cada tractament a la seua càpsula. Les restants llavors, seques i amerades, que no han sofert cap tractament (controls) s'han de col·locar en les altres dues que queden.
5. S'emboliquen les càpsules amb paper d'alumini i s'incuben a l'estufa, a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, durant 7 dies.
6. S'anota el nombre de llavors germinades a cada càpsula.

RESULTATS I QÜESTIONS

- 1) Calculeu el percentatge de germinació per a cadascun dels tractaments i anoteu els resultats obtinguts en la taula següent:

Tractament	% germ. llavors seques	% germ. llavors amerades
Control		
Fred		
Calor		

Congelació		
------------	--	--

- 2) Feu una anàlisi estadística dels resultats, prenent com a repeticions les dades obtingudes pels altres companys i companyes del grup de pràctiques.
- 2) Representeu els resultats gràficament.
- 3) Quin efecte ambiental simula el tractament amb etanol?
- 4) Quines llavors mantindran més temps la viabilitat, les *recalcitrants* o les *ortodoxes*?

RESULTATS EXPERIMENTALS

Presentació de les dades i resolució de problemes i qüestions

1. Anàlisi i presentació dels resultats experimentals
2. Preparació de solucions
3. Centrifugació. Equivalència entre velocitat angular (rpm) i força centrífuga (g)
4. Espectrofotometria. Llei de Lambert-Beer
5. Manometria. Equació dels gasos

1. ANÀLISI I PRESENTACIÓ DELS RESULTATS

Una vegada obtinguts els resultats experimentals al laboratori, el primer pas consisteix a uniformitzar les unitats utilitzades per a totes les mesures i dur a terme una normalització de les dades originals perquè siguin comparables (dades per unitat de temps, o per unitat de superfície, o per unitat de volum...). A continuació, caldrà donar-los el tractament estadístic adequat i fer les taules o representacions gràfiques més convenients per ajudar-nos a la interpretació dels resultats i mostrar les conclusions que podem traure de l'experiment.

1.1. Unitats de mesura

Unitats bàsiques del sistema internacional (SI)

Quantitat	Unitat	Abreviatura
Longitud	metre	m
Massa	kilogram	kg
Temps	segon	s
Temperatura	grau Kelvin	°K
Corrent elèctric	ampere	A
Quantitat de substància	mol	mol
Radioactivitat	becquerel	Bq

Prefixos per als múltiples i submúltiples de les unitats

Quantitat	Prefix	Abreviatura
10^{12}	tera	T
10^9	giga	G
10^6	mega	M
10^3	kilo	k
1	--	--
10^{-1}	deci	d
10^{-2}	centi	c
10^{-3}	mil·li	m
10^{-6}	micro	μ
10^{-9}	nano	n
10^{-12}	pico	p
10^{-15}	femto	f
10^{-18}	atto	a

Per a unitats de longitud s'utilitza també, especialment en microscòpia, un altre submúltiple, l'àngstrom (Å), equivalent a 10^{-10} metres.

Cal recordar que els múltiples i submúltiples de les unitats de superfície i de volum varien en factors de 100 i de 1.000, respectivament, quan s'expressen amb les unitats bàsiques. Així, $1 \text{ m}^2 = 100 \text{ dm}^2$ i $1 \text{ cm}^3 = 1.000 \text{ mm}^3$ (però $1 \text{ L} = 10 \text{ dL} = 100 \text{ cL} = 1.000 \text{ mL}$).

Per quantificar la presència de components traça en una mescla, sovint s'utilitza **ppm** com a unitat (parts per milió: nre. de parts en un total de 10^6 parts). En alguns casos també s'utilitza parts per bilió, **ppb** (en realitat, parts per mil milions: nre. de parts en un total de 10^9 parts).

$$\text{Per tant: } \begin{aligned} \text{ppm} &= (\text{massa de solut} / \text{massa de solució}) \times 10^6 \text{ i} \\ \text{ppb} &= (\text{massa de solut} / \text{massa de solució}) \times 10^9 \end{aligned}$$

Generalment es fa referència a volum quan es tracta de gasos i a pes si són sòlids o sòlids en líquids. Com que s'utilitzen principalment solucions aquoses diluïdes, és freqüent fer equivalències pes-volum, assumint una $\rho = 1$. Per exemple: $1 \text{ g} = 1 \text{ mL}$; $1 \text{ mg} = 1 \mu\text{L}$. Així, ppm seria equivalent a mg L^{-1} , ja que 1 L d'aigua pesa 1 kg i $1 \text{ kg} = 10^6 \text{ mg}$.

★ Qüestió 1.1:

Es volen fer mesures de l'activitat fotosintètica de fulles de dacsa, per a la qual cosa es necessita almenys una superfície foliar d' 1 dm^2 . Si la fulla té una amplària de 5 cm , de quina longitud hem de tallar un segment per a tenir aquesta superfície mínima?

★ Qüestió 1.2:

Quants mg de sulfits hi ha en una mostra de 10 mL d'un aigua de reg que conté una concentració de 20 ppm de SO_3^{-2} ?

1.2. Normalització dels resultats

Perquè siguin comparables els valors obtinguts per a les diferents mostres i els controls, així com en les diferents repeticions realitzades, els hem d'expressar en referència a unitats estàndards.

1.3. Estadística bàsica

La manera més senzilla de presentar i d'estudiar les dades obtingudes és calcular el valor mitjà (\bar{x}) de les repeticions i la desviació típica. Si es tracta d'una mitjana de mitjanes, podem calcular l'error estàndard (EE), que depèn de la dispersió al voltant de la mitjana (desviació típica, s) i del nombre de repeticions:

$$\bar{x} = \sum \frac{x_i}{n} \qquad s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \qquad EE = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

La desviació típica d'un conjunt de mesures és més útil si es relaciona amb el valor de la mitjana. Així, es pot calcular el percentatge relatiu de la desviació típica, o coeficient de variabilitat (CV), molt

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

indicatiu de la dispersió de les mesures.

En la major part dels casos, el més convenient serà fer una anàlisi de la variància i la comparació posterior de les mitjanes pel mètode post-hoc més adequat. Per a aquestes tasques convé utilitzar paquets estadístics d'ordinador.

★ Qüestió 1.2:

En un estudi sobre l'efecte d'un fertilitzant sobre el creixement de plantes de tomaca, s'obtingueren els resultats següents de pesos de les plantes (g/planta):

Control:	3,2	4,3	3,7	4,1	3,8	2,9	4,4	5,3	3,9	4,2
Amb fertilitzant:	2,8	3,9	4,8	4,7	5,7	4,6	3,2	4,8	5,4	3,9

Calcula els valors mitjans, els errors estàndards i els coeficients de variabilitat. Hi ha una diferència significativa entre el grup control i el tractat?

1.4. Taules i gràfics

Una bona presentació en forma de taula o gràfic ajuda a l'hora d'interpretar els resultats experimentals. L'ús de fulls de càlcul resulta molt convenient, ja que facilita la realització d'operacions repetitives o l'aplicació de funcions, així com l'elaboració de diferents tipus de gràfics i els ajusts i la representació de corbes per regressió que convinga fer.

Si la presentació es fa en forma de gràfic en eixos de coordenades, cal representar la variable independent en l'eix d'abscisses (X) i la dependent en el d'ordenades (Y). En el gràfic haurem d'incloure la dispersió de la mesura (errors estàndards, mínima diferència significativa, o diferents lletres sobre els diferents punts si s'ha fet una comparació entre mitjanes). Altres formes de representació gràfica dels resultats (histogrames...) poden ser també convenients.

★ Qüestió 1.3:

Representa els resultats de la qüestió 1.2 en forma d'histograma.

2. PREPARACIÓ DE SOLUCIONS

2.1. Mesures de concentració

Les mesures de concentració que s'utilitzen més sovint en un laboratori són les basades en volum (molaritat, normalitat, percentatge) i les basades en pes (molalitat, percentatge).

Molaritat (M) M = nombre de mols de solut per litre de solució.

El nombre de mols es calcula dividint el pes de substància, en g, pel seu pes molecular.

$$M = \frac{g/P_m}{L}$$

A vegades és important conèixer la molaritat no d'un solut determinat sinó del conjunt de partícules que hi ha en la solució, ja que algunes propietats de les solucions, com ara els punts d'ebullició i de congelació, o la pressió osmòtica, depenen del nombre de partícules dissoltes, no de la seua naturalesa o grandària (*propietats col·ligatives*). En aquests casos s'utilitza l'osmolaritat. Una solució 1 M d'una sal dissociable serà n Osmolar, on n representa el nombre d'ions produïts per molècula. L'osmolaritat de la solució serà la suma de la dels components de la solució.

Normalitat (N) $N =$ nombre d'equivalents de solut per litre de solució

El nombre d'equivalents es calcula dividint el pes de substància pel pes equivalent, i el pes equivalent correspon al pes molecular dividit per la valència.

$$N = \frac{\frac{g}{L}}{\frac{Pm}{\text{valència}}}$$

O, el que és igual: $N = M \times \text{valència}$

Molalitat (m) $m =$ nombre de mols de solut per kg de solvent. $m = \frac{\frac{g}{Pm}}{\text{kg solvent}}$

Percentatges (% w/w, % w/v) Els percentatges poden basar-se tant en volum com en pes, per tant es donen com a pes en g per 100 mL de solució (% w/v) o com a pes en g per 100 g de solució (% w/w). En el cas de líquids, també s'utilitzen els % v/v.

La concentració de molts àcids comercials se sol donar en percentatges basats en pes, tot i que es tracta de líquids. Per calcular el volum que correspon a un determinat pes, cal conèixer la densitat del líquid ($\rho = m/v$).

En tots els casos caldrà fer les correccions necessàries en funció del grau de puresa (riquesa) del producte.

★ Qüestió 2.1:

Quants grams de NaOH es necessiten per preparar 500 mL d'una solució 0,04 M? Quina és la normalitat de la solució anterior? (Pm del NaOH = 40)

★ Qüestió 2.2:

Quants mL de H₂SO₄ es necessiten per preparar 1 L d'una solució 0,1 N? (Pm del H₂SO₄ = 98,08; $\rho = 1,84$ Kg / L; riquesa del 96%)

★ Qüestió 2.3:

Quina és l'osmolaritat d'una solució formada per 10 mM sacarosa i 0,02 M CaCl₂?

2.2. Dilucions

La manera més senzilla de preparar dilucions a partir d'una solució estoc és aplicar la fórmula: **Volum₁ × concentració₁ = Volum₂ × concentració₂**

Si es requereix preparar solucions molt diluïdes, com és el cas de les hormones vegetals per fer bioassajos, es fan **dilucions seriades**: a partir de la solució estoc es prepara una dilució per un factor determinat (1/2; 1/3; 1/5 o, a sovint, 1/10); a partir d'aquesta se'n fa una altra d'igual, i així successivament.

★ Qüestió 2.4:

Tenim una solució estoc 0,5 M a partir de la qual volem preparar 1 L de solució 0,3 M. Quin volum de la solució estoc hem de diluir fins a 1 L?

★ Qüestió 2.5:

A partir d'una solució 3 M es preparen 4 noves solucions, fent dilucions seriades afegint 1 mL de solució a 2 mL d'aigua. Indica quin és el factor de dilució i quina és la concentració de l'última solució.

3. CENTRIFUGACIÓ

Equivalència entre velocitat angular (rpm) i força centrífuga (g)

En la pràctica corresponent a l'estudi de les reaccions lluminoses de la fotosíntesi obtenim una suspensió de cloroplastos per trituració del material vegetal en un medi adient i centrifugació posterior de l'extracte a 1.500 g. La centrifugació ens permet sedimentar-los i concentrar-los, a més de separar-los d'altres partícules cel·lulars.

A les centrifugadores, però, la velocitat d'acceleració es mesura com a velocitat angular, ω (revolucions per minut, rpm). La força centrífuga és proporcional a la velocitat angular i se'n pot calcular l'equivalència si coneixem el radi mitjà de rotació (en cm), que depèn del diàmetre del rotor.

$$F = (1.12 \times 10^{-5}) \omega^2 r$$

★ Qüestió 3.1:

A quina velocitat, en rpm, hem de posar la centrifugadora per obtenir una força centrífuga de 1.200 g, si el rotor té un diàmetre de 14 cm?

★ Qüestió 3.2:

Si centrifuguem una mostra a 9.000 rpm en una centrífuga que té un rotor de 5 cm de radi, quants g estem aplicant sobre la mostra?

4. ESPECTROFOTOMETRIA

Llei de Lambert-Beer

Quan un raig de llum travessa una mostra, una part d'aquesta és absorbida per la mostra i una part passa a través seu. La proporció de llum transmesa s'anomena TRANSMITÀNCIA i es calcula amb la fórmula:

$$T = I / I_0 \quad \text{on: } I_0 \text{ la intensitat de llum incident i}$$

I la intensitat de llum que passa a través de la mostra.

Habitualment, els valors de transmitància es donen en percentatge (% T).

Però la mesura més freqüent en espectrofotometria és l'ABSORBÀNCIA, que es defineix com el valor invers del logaritme decimal de la transmissió:

$$A = \log 1/T \quad \text{i pot variar entre } 0 \text{ i } \infty$$

L'absorbància és més utilitzada que la transmissió, ja que és directament proporcional a la concentració de la substància que absorbeix la llum i a la longitud de pas de la llum a través de la mostra. La relació entre aquests factors és descrita per la llei de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \times C \times d \quad \text{on: } \epsilon, \text{ constant de proporcionalitat o coeficient d'extinció}$$

C , concentració i
 d , distància de pas de llum, en cm

La major part de les cubetes d'espectrofotòmetre tenen una longitud d'1 cm ($d = 1$). D'altra banda, la concentració vindrà donada en unes unitats o unes altres en funció del coeficient d'extinció que s'utilitzi.

Coeficients d'extinció

El coeficient d'extinció es pot expressar de diferents formes; les més freqüents són:

Coeficient d'extinció molar, ϵ_M : representa l'absorbància que tindria una determinada substància a una concentració 1 M.

Les seues unitats són $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; per tant, la concentració vindrà donada en mols per litre (M). També es pot expressar per mil·limol o micromol i, en aquest cas, la concentració calculada serà mil·limolar o micromolar, respectivament.

Coeficient d'extinció específic, ϵ_S : absorbància que tindria una substància dissolta a una concentració d'1 g per litre. És necessari quan es desconeix el pes molecular de la substància analitzada.

Les seues unitats són $L \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ i la concentració s'obté en g L^{-1} .

També s'utilitzen coeficients d'extinció basats en percentatges pes/volum; en aquest cas s'indica el % de la solució ($\epsilon_{1\%}$, $\epsilon_{0.1\%}$, etc).

Precaucions que cal guardar en les anàlisis espectrofotomètriques

A causa que l'absorbància es mesura en una escala logarítmica, quan la quantitat de llum absorbida és major del 50 % (~0,3 d'absorbància), els errors de mesura augmenten molt. Les mesures de concentració es fan, idealment, entre valors d'absorbància de 0,05 i 0,3 (entre 90 i 50 % de transmissió). Tot i que els espectrofotòmetres actuals són molt acurats, en tot cas no convé utilitzar valors d'absorbància majors de 0,9-1, ja que els errors són molt grans.

Si l'absorbància de la mostra és major de 0,9, caldrà diluir-la, i ho haurem de tenir en compte a l'hora de fer els càlculs de concentració de l'analit.

Els solvents utilitzats per suspendre les mostres també poden absorbir llum, per la qual cosa cal fer l'ajust del 0 de l'espectrofotòmetre amb el solvent emprat en cada cas, no amb aigua destil·lada.

Les mesures en la regió de la llum ultraviolada cal fer-les en cubetes de quars, ja que el vidre absorbeix l'UV.

★ Qüestió 4.1:

El coeficient d'extinció d'un complex midó-iode a l'1% a 450 nm és $\epsilon_{1\%} = 0,20$. Calcula la concentració de midó en una solució de complex amb iode que té una absorbància de 0,38.

★ Qüestió 4.2:

Una solució de proteïna (0,3 mL) es dilueix amb 0,9 mL d'aigua. A 0,5 mL d'aquesta dilució se li afegeixen 4,5 mL de reactiu del biuret perquè es forme color. L'absorbància de la mescla a 450 nm és 0,18. Una solució estàndard (0,5 mL, que conté 4 mg de proteïna/mL) amb 4,5 mL de reactiu del biuret dona una absorbància de 0,12. Calcula la concentració de proteïna en la solució problema original (abans de diluir).

5. MANOMETRIA. EQUACIÓ DELS GASOS

En la pràctica de mesura de la respiració fem un respiròmetre volumètric que ens permet determinar l'intercanvi de gasos per les variacions del nombre de molècules de gas dins un recipient tancat, on es troba el material sota estudi.

L'equació dels gasos relaciona el nombre de mols d'un gas amb el volum que ocupen en funció dels valors de pressió i temperatura.

$$P V = n R T \quad \text{on: } R = 8,3143 \text{ m}^3 \text{ Pa mol}^{-1} \text{ } ^\circ\text{K}^{-1} \quad (= 0,082 \text{ L atm mol}^{-1} \text{ } ^\circ\text{K}^{-1})$$

Per tant, $V = (n R T) / P$; i si substituïm el valor de la constant R i assumim $P = P$ atmosfèrica (1 atm) i una temperatura de 20 °C,

$$V = 1 \text{ mol} \times 0,082 \text{ L atm mol}^{-1} \text{ } ^\circ\text{K}^{-1} \times 293 \text{ } ^\circ\text{K} \times (1 \text{ atm})^{-1} = 24 \text{ L}$$

És a dir, a P atmosfèrica i a 20 °C un mol de gas ocupa 24 L o, el que és igual:

$$1 \text{ mol} / 24 \text{ L} = 0,0416 \text{ mol} / \text{L} = 41,6 \text{ mmol} / \text{L}$$

Com que el pes molecular del CO₂ és 44, 1 mol CO₂ = 44 g

Per tant, podem completar l'equivalència:

Si 41,6 mmol de CO₂ ocupen 1 L a 20 °C i P atm i 1 mmol CO₂ equival a 44 mg,

$$41,6 \text{ mmol} / \text{L} \times 44 \text{ mg} / \text{mmol} = 1830,4 \text{ mg de CO}_2 / \text{L}$$

★ Qüestió 5.1:

A quin volum correspon 1 mg de CO₂ en les condicions indicades (20 °C i P atm)? I en condicions estàndards de pressió i temperatura (STP: t^a = 0 °C i P = 1 atm)?

REFERÈNCIES

1. LLIBRES

- Lichtenthaler H., Pfister K. (1978). *Praktikum der Photosynthese*. Quelle & Meyer. Heidelberg.
- Robyt J. F., White B. J. (1987). *Biochemical techniques. Theory and practice*. Brooks/Cole Publ. Co. Monterey.
- Sanz A., Picazo I., del Amo J. B., Martínez C., Ros R. (1989) *Prácticas de Fisiología Vegetal*. Servei de Publicacions. Universitat de València.
- Segel I. H. (1982). *Cálculos de bioquímica*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F. (1972) *Manometric and biochemical techniques*. Burgess Publ. Co. Minneapolis.

2. ARTICLES

- Dean B. L., Miskiewicz E. (2003). "Rates of electron transport in the thylakoid membranes of isolated, illuminated chloroplasts are enhanced in the presence of ammonium chloride". *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 31: 410-417.
- Farnsworth E. (2000). "The ecology and physiology of viviparous and recalcitrant seeds". *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31: 107-138.
- Roe J. H. (1934) "A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine". *J Biol. Chem.* 107: 15-22.
- Ziegler H., Egle K. (1965) "Zur quantitativen Analyse der Chloroplastenpigmente". *Beitr. Biol. Pflanzen* 41: 11-63.

PÀGINES WEB D'INTERÈS

- <http://employees.csbsju.edu/ssaupe/biol327/lab-home.htm>
- <http://flash.lakeheadu.ca/~dlaw/3470manual.pdf>
- <http://plantsinmotion.bio.indiana.edu>
- <http://plantst.genomics.purdue.edu/plantst/html/movies.shtml>
- <http://sols.unlv.edu/Schulte/BIO442/BIO442Labs.html>
- <http://www.fastplants.org>
- <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e00/contents.htm>
- <http://www.ou.edu/cas/botany-micro/bot-linx/subject/sub-clas.shtml>