



TÍTULO: ¿Cómo responden las plantas a las deficiencias nutricionales de hierro o de fósforo?

PROFESOR RESPONSABLE: Francisco Javier Romera Ruiz y Carlos Lucena León

MACROÁREA DE CONOCIMIENTO: Ciencias exactas y naturales

RESUMEN: (200 palabras)

Hierro (Fe) y fósforo (P) son dos nutrientes esenciales para el crecimiento de los vegetales. Ambos elementos son abundantes en los suelos pero con poca disponibilidad para las plantas, por lo que su deficiencia genera problemas de gran importancia en los cultivos, afectando al crecimiento y producción de los mismos. Frente a situaciones de deficiencia, las plantas dicotiledóneas, como el tomate, desarrollan una serie de cambios fisiológicos y morfológicos en sus raíces encaminados a incrementar la adquisición de estos nutrientes. Existen semejanzas en los mecanismos de respuesta que las plantas activan frente a ambas deficiencias, entre los que destacan: formación de pequeñas raicillas laterales para aumentar la superficie de contacto, la acidificación del medio, el aumento del número de transportadores específicos de cada elemento, y el incremento de la reducción de Fe (bajo deficiencia de Fe) y de la actividad de las fosfatasa ácidas (bajo deficiencia de P).

El proyecto permitirá a los alumnos conocer de primera mano los mecanismos de respuesta que las plantas activan en situaciones de deficiencia de Fe o de P. Utilizando métodos colorimétricos muy llamativos y de fácil ejecución, conseguirán dilucidar si la planta ha puesto en marcha determinados mecanismos de respuesta o no. Con ayuda de lupas binoculares y sencillos métodos de tinción de tejidos vegetales, alcanzarán a observar cambios morfológicos en las raíces de las plantas. Además, desarrollarán técnicas de biología molecular como la extracción de ARN, la síntesis de ADN complementario y la amplificación de genes mediante RT-PCR.



PROFESORES PARTICIPANTES:

NOMBRE: Francisco Javier Romera Ruiz

CARGO: Catedrático de Producción Vegetal

DEPARTAMENTO: Agronomía

FACULTAD: Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes

CONTACTO (correo y teléfono): ag1roruf@uco.es 957 218572

NOMBRE: Carlos Lucena León

CARGO: Profesor Sustituto Interino

DEPARTAMENTO: Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal

FACULTAD: Ciencias

CONTACTO: b42lulec@uco.es 957218488



OBJETIVOS: (General y específicos)

El objetivo general del proyecto que planteamos es:

Acercar al alumnado al estudio de la nutrición mineral de las plantas. Darles a conocer la importancia que adquiere que la planta pueda disponer de todos los nutrientes que necesita para su correcto desarrollo y los efectos tan negativos sobre su crecimiento que produce la falta de alguno de ellos. Un camino que les llevará a conocer de primera mano el diseño de los experimentos científicos, los materiales, la metodología empleada y las determinaciones que realizamos en nuestro laboratorio, desde el primer paso (con la siembra de las semillas) hasta el último (con la obtención de resultados científicos mediante el empleo de diferentes técnicas) pasando por el cultivo y mantenimiento de las plantas en cultivo hidropónico (con agua y sales minerales, sin necesidad de suelo) y la aplicación de los tratamientos que nos permitan recrear situaciones para poder obtener resultados.

Los objetivos específicos son:

1. Conocer diferentes técnicas de siembra de semillas para conseguir plantas con las que poder realizar los experimentos científicos.
2. Familiarizar al alumnado con la técnica de cultivo hidropónico. Una alternativa al cultivo tradicional en suelo que implica que las plantas crezcan en solución nutritiva (diferentes sales minerales disueltas en agua)
3. Elaborar una solución nutritiva con todos los nutrientes que necesita la planta o crear condiciones de deficiencia de alguno de ellos.
4. Aplicar tratamientos de deficiencia de nutrientes esenciales como son el hierro o el fósforo.
5. Identificar los síntomas externos que presentan las plantas para demostrar que están acusando la falta de algún nutriente esencial para su desarrollo, como por ejemplo la falta de hierro o de fósforo.
6. Determinar, mediante métodos colorimétricos sencillos y llamativos, los diferentes mecanismos de respuesta que activan las plantas frente a situaciones de deficiencia de nutrientes esenciales para su correcto desarrollo. Como por ejemplo, las actividades enzimáticas que contemplan: la capacidad de las plantas de reducir el hierro que existe en la solución nutritiva antes de ser absorbido por la raíz o determinar la capacidad de activar enzimas fosfatasa ácidas encargadas de aprovechar todo el fósforo que esté próximo a la raíz de la planta.
7. Familiarizar al alumnado con las técnicas moleculares llevadas a cabo en nuestro laboratorio con el fin de analizar a nivel molecular la expresión de genes implicados en la activación de los mecanismos de respuesta a las deficiencias de hierro o de fósforo. El alumnado realizará la extracción de ARN con ayuda de Nitrógeno Líquido. Realizará también la retrotranscripción del ARN obtenido mediante el uso del enzima retrotranscriptasa o transcriptasa inversa para obtener el ADNcomplementario y por último, el alumnado realizará la amplificación de determinados genes del ADNcomplementario obtenido mediante RT-PCR (Reacción en Cadena de la



Polimerasa) con ayuda del enzima ADN polimerasa y del termociclador. Los productos de RT-PCR serán analizados y visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa.



RECURSOS: (Aulas, laboratorios, equipamiento)

El equipo encargado de llevar a cabo el proyecto propuesto dispone de cámaras de crecimiento con condiciones ambientales controladas en las que llevar a cabo los experimentos y la aplicación de tratamientos, situadas en el sótano del edificio C4 del Campus de Rabanales. Disponemos de bateas y contenedores suficientes para programar experimentos de cultivo hidropónico a gran escala para atender las necesidades de grupos amplios y con gran número de muestras. También disponemos de un amplio y espacioso laboratorio en la planta baja del edificio C4, equipado con el instrumental y reactivos necesarios para realizar tanto la siembra de las semillas como las determinaciones que aparecen en el objetivo 6. La determinación de la capacidad de reducir el hierro antes de ser absorbido por la planta se realiza mediante método colorimétrico con agente quelante (ferrozina) apreciable a simple vista y cuantificado por espectrofotometría de luz visible, equipo del que disponemos en el laboratorio. La actividad de enzimas fosfatasas ácidas encargadas de asimilar fósforo del medio, también se determina por colorimetría a simple vista mediante el uso de sustrato orgánico del que disponemos en el laboratorio.

Las metodologías llevadas a cabo de cara al análisis molecular, extracción de ARN, síntesis de ADNcomplementario, amplificación de genes mediante RT-PCR y electroforesis en gel de agarosa se llevarán a cabo en el laboratorio de Biología Molecular, responsabilidad de la Unidad de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias, afín al Dpto. de Agronomía, con el que colaboramos estrechamente desde 2001. El laboratorio se sitúa en la tercera planta del edificio C4. Se trata de un laboratorio espacioso, equipado con el instrumental y equipamientos (campana extractora de gases donde realizar extracción de ARN, termociclador para síntesis de ADNcomplementario y amplificación de ADN mediante RT-PCR, cubetas de electroforesis y transiluminador para visualizar amplificaciones de ADN) necesario para llevar a cabo todos los análisis moleculares descritos en el objetivo 7.



DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD: (Máximo 5 hojas)

Cronograma detallado de la actividad

Primera sesión

Presentación del proyecto por parte de los Profesores responsables del proyecto.

Segunda sesión

Lugar:

Laboratorio de Biología y Fisiología Vegetal (Dpto. Agronomía) de la planta baja del edificio C4. Campus de Rabanales. Cámaras de crecimiento con condiciones ambientales controladas, sótano del edificio C4.

Objetivos:

1. Conocer diferentes técnicas de siembra de semillas para conseguir plantas con las que poder realizar los experimentos científicos.
2. Familiarizar al alumnado con la técnica de cultivo hidropónico. Una alternativa al cultivo tradicional en suelo que implica que las plantas crezcan en solución nutritiva (diferentes sales minerales disueltas en agua)
3. Elaborar una solución nutritiva con todos los nutrientes que necesita la planta o crear condiciones de deficiencia de alguno de ellos.
4. Aplicar tratamientos de deficiencia de nutrientes esenciales como son el hierro o el fósforo.
5. Identificar los síntomas externos que presentan las plantas para demostrar que están acusando la falta de algún nutriente esencial para su desarrollo, como por ejemplo la falta de hierro o de fósforo.

Recursos y consumibles necesarios:

Semillas de diferentes especies con interés agronómico como pepino, guisante y tomate; semillas de la planta modelo con la que realizar determinaciones a nivel molecular, *Arabidopsis thaliana*. Diferentes sustratos en los que realizar las diferentes siembras: turba negra, perlita y papel de filtro humedecido. Bandejas para realizar las siembras. De todos estos recursos dispone el grupo de acogida.

Contenedores para cultivo hidropónico, sistema de aireación, bombas de aireación. Sales madre para preparar las diferentes soluciones nutritivas controles y las que determinan algún tipo de deficiencia de algún nutriente esencial. De todos estos recursos dispone el grupo de acogida.

Plantas ya crecidas, en diferentes estadios de tratamiento para que el alumnado pueda aplicar tratamientos de deficiencia sobre ellas y ver el desarrollo de las diferentes especies en cultivo hidropónico y consiga visualizar y diferenciar síntomas provocados por las deficiencias de hierro o de fósforo.



Actividades que desarrollar:

Sembrarán semillas de diferentes especies utilizando diferentes sustratos, en función de la viabilidad y adaptabilidad de cada semilla a un sustrato diferente. Tomate en perlita, pepino y guisante en papel humedecido, *Arabidopsis* en turba negra...

Forzado intencionado del proceso de elongación del tallo de la plántula recién germinada (crecimiento etiolado) en oscuridad con el fin de poder añadir el sistema de anclaje (espuma que abraza el tallo de la planta) para que su cultivo en hidropónico sea viable.

Instalación y montaje de un sistema de cultivo hidropónico con contenedores individualizados y con sistema de aireación propio para cada contenedor. Bomba de aire a presión y sistema de canalización del aire para abastecer a cada planta por igual. Preparación de la solución nutritiva en la que van a crecer las plántulas sobre las que vamos a aplicar los tratamientos de deficiencia. Cálculos de las diferentes concentraciones (molaridades) a las que debe ir cada sal empleada en la solución nutritiva.

Diferencias existentes entre la composición de una solución nutritiva control y otra que conlleve algún tipo de deficiencia.

Identificación visual de los síntomas que muestran las plantas cuando se les somete a un estrés nutricional relacionado con el hierro o el fósforo. Observación a la lupa binocular y con ayuda de una tinción con Azul de Toluidina, de raíces de plantas con la capacidad de responder a la deficiencia de hierro modificando su fisonomía radicular y generando pelillos radicales laterales en la zona subapical de la raíz.

Tercera sesión

Lugar:

Laboratorio de Biología y Fisiología Vegetal (Dpto. Agronomía) de la planta baja del edificio C4. Campus de Rabanales.

Objetivos:

6. Determinar, mediante métodos colorimétricos sencillos y llamativos, los diferentes mecanismos de respuesta que activan las plantas frente a situaciones de deficiencia de nutrientes esenciales para su correcto desarrollo. Como por ejemplo, las actividades enzimáticas que contemplan: la capacidad de las plantas de reducir el hierro que existe en la solución nutritiva antes de ser absorbido por la raíz o determinar la capacidad de activar enzimas fosfatasa ácidas encargadas de aprovechar todo el fósforo que esté próximo a la raíz de la planta.

Recursos y consumibles necesarios:



Ferrozina, agente quelante con la capacidad de complejar el hierro con valencia 2+, que adquiere una tonalidad violeta intensa cuando lo hace, ayudando a diferenciar plantas que tienen la capacidad de reducir hierro³⁺ (no disponible para la planta) a hierro²⁺ (disponible para ser absorbido por la planta). Bateas de soporte de contenedores de medida de la actividad

Actividades que desarrollar:

El alumnado desarrollará la determinación de dos actividades enzimáticas:

Actividad de la reductasa de hierro³⁺, mediante la determinación de la capacidad de reducirlo a hierro²⁺, para cuantificar con ayuda de la ferrozina.

La ferrozina es un agente quelante específico del hierro²⁺, que forma con éste un complejo de color rojo púrpura, cuya absorbancia es máxima a 562 nanómetros. La ferrozina se añade en exceso, para favorecer que todo el hierro²⁺, procedente de la reducción de hierro³⁺ por la reductasa férrica de la membrana, se una a este quelante. Cuanto mayor sea la CR de las raíces, mayor cantidad de hierro²⁺ se forma en el medio y mayor será la concentración de hierro²⁺-Ferrozina. La consecuencia visible es un cambio de color de la solución, que pasa de incolora a púrpura y que se cuantifica midiendo la absorbancia a 562 nm mediante espectrofotometría de luz visible (Romera *et al.* 1992). El alumnado participará de forma directa en la preparación de las soluciones de medida, en la determinación, cuantificación e interpretación de los resultados.

La fosfatasa ácida, que es un enzima especializado en la liberación mediante hidrólisis de grupos fosfato adheridos a otras moléculas, reacciona con el BCIP (5-bromo-4-cloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt), que es un sustrato orgánico fosfatado y, que bajo la acción de la fosfatasa ácida, pierde su grupo fosfato. Justo en ese momento, el bromo-cloro indolil, libre del grupo fosfato, sufre un cambio de color, pasando de transparente a un color azul intenso en el interior de las raíces (Zakhleniuk *et al.* 2001). El color que adquieran las raíces nos dará buena cuenta del grado de inducción de dicha actividad. El alumnado participará de forma directa en la preparación de las soluciones de medida, en la determinación, cuantificación e interpretación de los resultados.

Cuarta sesión

Lugar:

Laboratorio de Biología Molecular, Unidad de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias, afín al Dpto. de Agronomía. El laboratorio se sitúa en la tercera planta del edificio C4.

Objetivos:



7. Familiarizar al alumnado con las técnicas moleculares llevadas a cabo en nuestro laboratorio con el fin de analizar a nivel molecular la expresión de genes implicados en la activación de los mecanismos de respuesta a las deficiencias de hierro o de fósforo.

Recursos y consumibles necesarios:

Reactivo de extracción Tri-Reagent, cloroformo, isopropanol. Nitrógeno líquido, mortero, tubos eppendorf, micropipetas y puntas. Todos ellos son reactivos y consumibles necesarios para realizar la extracción de ARN.

Reactivos para el proceso de retrotranscripción del ARN a ADNcomplementario. Tubos de PCR. Enzima retrotranscriptasa. Termociclador.

Reactivos necesarios para la RT-PCR. Enzima ADNpolimerasa. Termociclador.

Electroforesis en gel de agarosa, tampón TBE, agarosa, cubetas de electroforesis y fuentes de alimentación. Transiluminador de luz ultravioleta.

Actividades a desarrollar

El alumnado realizará la extracción de ARN con ayuda de Nitrógeno Líquido. Homogenizará la muestra en mortero y procederá al aislado del ARN de las muestras mediante el uso de fenol, cloroformo, precipitado con isopropanol y cuantificación de la concentración de ARN extraído mediante espectrofotometría de luz visible. Realizará también la retrotranscripción del ARN obtenido mediante el uso del enzima retrotranscriptasa o transcriptasa inversa para obtener el ADNcomplementario y por último, el alumnado realizará la amplificación de determinados genes del ADNcomplementario obtenido mediante RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con ayuda del enzima ADN polimerasa y del termociclador. Los productos de RT-PCR serán analizados y visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Un gel que cargará el alumnado participante en el proyecto.

Quinta sesión

Los alumnos participarán primero en una sesión específica en las que se les enseñará a tratar, analizar y presentar los resultados obtenidos de acuerdo con el método científico. Posteriormente, en formato powerpoint, los alumnos presentarán al resto de participantes los resultados obtenidos en su trabajo, comentando sus impresiones sobre la experiencia desarrollada.



Día	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
P L A N	Inauguración campus Presentación Proyectos	Familiarización con la nutrición mineral en plantas. Síntomas y respuestas.	Determinación de actividades enzimáticas relacionadas con respuestas a deficiencias.	Análisis molecular de la expresión de genes de mecanismos de respuestas.	Trabajo en aula convencional y/o de informática
O B J E T O	Organización de los grupos de trabajo	Reconocer síntomas. Conocer cultivo hidropónico y mecanismos de respuesta a las deficiencias.	Adquirir habilidad en la determinación de actividades enzimáticas relacionadas con las deficiencias.	Manejar técnicas moleculares para conocer la expresión de genes de las deficiencias.	Aprender a tratar, analizar y presentar los resultados



REFERENCIAS

Romera FJ, Alcantara E, de la Guardia MD (1992). Effects of bicarbonate, phosphate and high pH on the reducing capacity of Fe-deficient sunflower and cucumber plants. *J. Plant Nutr.* 15: 1519–1530.

Zakhleniuk OV, Raines CA, Lloyd JC (2001). Pho3: a phosphorus-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta.* 212: 529-534.

