

Proyecto de Innovación y Mejora Docente

MEMORIA FINAL

ID2021/126

Desarrollo de una nueva práctica de laboratorio
para el estudio de la importancia de la celulosa
en la estructura y función de la pared celular vegetal

Coordinadora del proyecto:

Lucía Albornos Llorente

Miembros del equipo de trabajo:

Berta Dopico Rivela

José Ignacio Martín Sánchez

Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal

Introducción

El objetivo general de este Proyecto de Innovación y Mejora Docente era implementar una práctica de laboratorio novedosa para mejorar la enseñanza-aprendizaje de la pared celular vegetal en los grados de Biotecnología y Biología. Por un lado, que permitiera estudiar las funciones de esta estructura en la célula vegetal y comprender la importancia de su dinamismo e integridad; y por otro, que incluyera el uso de técnicas de laboratorio actualizadas. Con el fin de abordar este objetivo general, nos propusimos una serie de objetivos específicos:

1. Diseñar un procedimiento experimental que permita analizar las consecuencias de las alteraciones estructurales de la pared celular en el desempeño de sus funciones y demostrar que no es una estructura que permanezca invariable a lo largo del desarrollo
2. Elaborar el material de apoyo a la realización de las sesiones prácticas que recibirá el alumnado.
3. Llevar a cabo una experiencia piloto en la que se imparta la práctica diseñada a los alumnos de la asignatura de Transporte y Metabolismo Vegetal del 2º curso del Grado en Biotecnología, evaluarla e identificar posibles puntos de mejora.
4. Proponer una práctica de laboratorio novedosa y optimizada a partir de la experiencia piloto para el estudio de la pared celular vegetal en los grados de Biotecnología y Biología.

Estos cuatro objetivos se han abordado en el presente curso académico y los resultados obtenidos se detallan a continuación.

Resultados

Objetivo 1

Nuestro primer objetivo era diseñar un procedimiento experimental apropiado para realizar en el laboratorio de prácticas y que permitiera analizar las consecuencias de las alteraciones estructurales de la pared en el desempeño de sus funciones. Como material vegetal se seleccionaron plantas de *Arabidopsis thaliana*, de tipo silvestre (WT) y mutantes en el gen que codifica la celulosa sintasa 3 (*CESA3*) y que son resistentes al herbicida isoxaben (mutantes *ixr1-1*). Este herbicida afecta a la correcta deposición de las microfibrillas de celulosa en la pared de las plantas WT y hace que las células en crecimiento activo desarrollen una estructura debilitada que dificulta su función y puede acabar en muerte celular.

Con el fin de seleccionar las condiciones de crecimiento óptimas para observar el efecto del isoxaben en un procedimiento experimental adaptado a los recursos y tiempos habituales en las prácticas de laboratorio de las asignaturas de Grado, se hicieron algunas pruebas. Se evaluaron diferentes periodos de crecimiento, condiciones de luz, concentraciones de herbicida, tiempos de tratamiento y órganos elongantes, como se resume en la siguiente tabla.

Días de crecimiento	Fotoperiodo	Concentración de isoxaben	Tiempo de tratamiento	Órgano elongante
5 d	luz/oscuridad	400 mM	24 h	Cotiledón
7 d	oscuridad	600 mM	48 h	Hipocotilo
				Raíz

Se ensayaron combinaciones de los diferentes parámetros que se indican en la tabla anterior, aplicando el herbicida directamente sobre las plántulas en una solución acuosa a la concentración de interés. Se hizo un análisis para ver cuáles eran las condiciones más adecuadas para que el alumnado pudiera observar claramente las consecuencias de la desorganización de las microfibrillas de celulosa en la pared. En las primeras pruebas descartamos los cotiledones e hipocotilos, crecidos tanto en luz como en oscuridad (mayor tasa de crecimiento), porque en estos órganos el efecto del herbicida era apenas visible a las 48 h de tratamiento. Nos centramos entonces en optimizar el procedimiento experimental en las raíces, y determinamos que la concentración más alta de herbicida (600 nM) era más adecuada para observar cambios pronunciados en la pared. El efecto del isoxaben en las células de la raíz de las plantas WT era bastante marcado, mientras que las plantas mutantes *ixr1-1* presentaban un fenotipo normal en presencia del herbicida (Figura 1).



Figura 1. Ápice de la raíz de plántulas de *A. thaliana* de 7d de genotipo *ixr* (izq) y WT (dcha) tratadas con isoxaben durante 48 h

En este experimento resultaba irrelevante si las plantas crecían en oscuridad total o en un fotoperiodo luz/oscuridad. Sin embargo, decidimos utilizar estas últimas condiciones porque las plántulas son más fáciles de manipular con los cotiledones bien expandidos y el hipocotilo más corto y grueso. Aunque a las 24 h de tratamiento se pueden apreciar cambios en las paredes de las células de la zona apical de la raíz, el fenotipo es mucho más pronunciado a las 48 h, por lo que se optó por este último tiempo. Finalmente, los resultados eran muy similares cuando el herbicida se aplicaba en plántulas de 5 d o 7 d, pero resultaba más fácil trabajar con las de menor edad para la posterior observación en el microscopio. En resumen, se decidió utilizar plántulas de *A. thaliana*, WT y mutantes, crecidas durante 5 d en un fotoperiodo de luz/oscuridad de día largo (16/8h), tratadas con isoxaben 600 nM durante 48 h.

Para la observación de los resultados se analizan los individuos al microscopio, colocando las plántulas completas sobre un portaobjetos y depositando un cubreobjetos sobre ellas.

El análisis de los cambios en la pared celular resulta mucho más fácil cuando se utiliza alguna tinción. Se probaron diferentes tinciones para mejorar la visualización de los resultados: verde brillante, azul de toluidina, rojo neutro y rojo rutenio. La tinción que teñía las paredes con mejor definición era el rojo rutenio, aunque es un colorante con un precio muy elevado. Otro colorante que daba buenos resultados es el rojo neutro, aunque la tinción es algo más laboriosa por la necesidad de incubar previamente en tampón fosfato. Como contrapartida, se trata de un colorante vital que permite diferenciar células viables de células muertas. Se decidió utilizar ambos colorantes para el análisis de resultados.

Por último, buscábamos poder demostrar que la integridad de la red de celulosa es imprescindible para que una célula pueda crecer y para que lo haga manteniendo su forma, habitualmente con una mayor longitud en el eje vertical. La pared tiene que ser una estructura lo suficientemente fuerte como para contrarrestar la presión de turgencia que ejerce el protoplasto sobre ella cuando, como paso previo y necesario para el crecimiento, se produce la entrada de agua al interior celular. Una célula con la estructura de su pared comprometida muestra un crecimiento isotrópico y, en casos extremos, llega a lisarse por una entrada masiva de agua al citoplasma. Es decir, si podemos contrarrestar la entrada de agua a la célula, estamos impidiendo que se generen grandes presiones de turgencia en el protoplasto, las células crecerán en menor medida, pero también se lisarán menos cuando su pared esté debilitada. Así

buscábamos demostrar que la adición al medio de un agente osmóticamente activo, que dificulta la toma de agua por parte de las células, hacía que los efectos del herbicida isoxaben fueran menos severos. Se probó a añadir al medio de cultivo sorbitol 400 mM y se verificó que era una concentración adecuada para demostrar que, al reducir la toma de agua, la tasa de crecimiento es menor y las células tratadas con el herbicida presentan una menor alteración. En la Figura 2 se observa que, en presencia de isoxaben, el ápice radicular de las plantas crecidas en sorbitol está menos engrosado y que las células están menos afectadas en su morfología que en el control sin sorbitol.



Figura 2. Ápice de la raíz de plántulas de *A. thaliana* de 7d de genotipo WT tratadas durante 48 h con isoxaben (izq) o con isoxaben y sorbitol (dcha). La raíces se han teñido con rojo neutro.

Además de mostrar que las alteraciones en la deposición de celulosa comprometen la integridad y la función de la pared celular, nos habíamos propuesto evidenciar que la pared no es una estructura que permanezca invariable y que su dinamismo es necesario para la supervivencia de la planta. Por ello, buscábamos incluir en la práctica una demostración de que, ante un problema en la síntesis de celulosa, la célula es capaz de modificar la composición de su pared para tratar de contrarrestar los defectos y que la estructura continúe siendo lo más funcional posible. Se puso a punto un procedimiento sencillo de tinción de lignina, un polímero que no se deposita habitualmente en las paredes en crecimiento, para poner de manifiesto que las plantas tratadas con isoxaben la depositan en sus paredes como mecanismo de compensación. La tinción se lleva a cabo con floroglucinol-HCl, se puede hacer directamente en un portaobjetos y los resultados, que son muy claros, se observan al cabo de solo 2 o 3 minutos.

Objetivos 2 y 3

Una vez establecido el procedimiento experimental que nos permitiría demostrar la importancia de la red de celulosa en la estructura y función de la pared celular; debíamos elaborar el material de apoyo que recibiría el alumnado para las sesiones prácticas (objetivo 2) y llevar a cabo una experiencia piloto en la que se impartiera la práctica diseñada (objetivo 3).

Se preparó un protocolo de la práctica titulada “La celulosa en la estructura y función de la pared celular” para incluir en el cuaderno de prácticas que se entrega habitualmente al alumnado que va a acudir al laboratorio (Anexo I). Este protocolo consta de varios apartados: introducción, materiales, metodología y análisis de resultados. La introducción teórica facilita la comprensión de los conceptos que se trabajan con el procedimiento experimental y, junto con las explicaciones del profesor o profesora, sirve de apoyo al estudio. En el apartado de materiales se enumeran todos los recursos necesarios para realizar la práctica y que hay que reunir antes de comenzar. La metodología explica muy detalladamente el procedimiento experimental que se va a seguir e incluye instrucciones concretas de manejo que no se encontrarían en un protocolo normal de laboratorio, por ejemplo, “no olvides marcar los portaobjetos con el nombre de la línea” o “reserva algunas plántulas para la siguiente tinción”. Finalmente, en el apartado de análisis de resultados se proponen cuestiones que ayudan a razonar sobre la práctica, a incidir sobre los resultados más relevantes y a extraer las conclusiones a partir del resultado de los experimentos.

La experiencia piloto se llevó a cabo con los alumnos de la asignatura de Transporte y Metabolismo Vegetal del 2º curso del Grado en Biotecnología. Se incluyó esta práctica entre otras 10 que ya habían sido realizadas con anterioridad en asignaturas de Grado de nuestra área de conocimiento. Se llevó a cabo en tres grupos consecutivos de 12-14 estudiantes cada uno. Al finalizar las sesiones de laboratorio, se realizó un examen para valorar la consecución de los objetivos de aprendizaje y una encuesta para indagar sobre el grado de satisfacción del alumnado con esta práctica en comparación con el resto.

En el examen se incluyó una cuestión con 3 apartados, tal y como se recoge en la Figura 3:

1. Hemos colocado plántulas de 7 d de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre (WT) y mutantes resistentes a isoxaben (*ixr*) en un medio con isoxaben durante 48 h. Responde las siguientes cuestiones:
- Qué es el isoxaben y qué efecto tiene en la pared celular de las plántulas WT (0,75 pto)
 - Dibuja la zona apical de la raíz de las plántulas utilizadas en el experimento (0,5 pto)

	WT	<i>ixr</i>
Control (sin isoxaben)		
Tratamiento (con isoxaben)		

- Qué se observaría después de teñir con floroglucinol las plántulas WT e *ixr* crecidas en el medio con isoxaben ¿por qué? (0,75 pto)

Figura 3. Cuestión de examen propuesta para evaluar los resultados de aprendizaje de la práctica “La celulosa en la estructura y función de la pared celular”

Todos los alumnos contestaron a esta cuestión y la mayoría lo hicieron con acierto, la media de las calificaciones obtenidas fue de 1,8 puntos sobre 2. Solo un alumno dejó en blanco el apartado b) y, salvo esta excepción, todos lograron al menos la mitad de la calificación en todos los apartados a), b) y c). Se hizo un análisis de las respuestas para encontrar fallos recurrentes o malas concepciones. Entre los más frecuentes, la confusión entre crecimiento isotrópico y anisotrópico. Numerosos estudiantes asocian la característica crecimiento anisotrópico con una malformación en comparación con crecimiento isotrópico, que entienden es la forma normal. Sin embargo, el crecimiento isotrópico es aquel que es igual en todas las direcciones y da lugar a células con forma cúbica; mientras que el anisotrópico es aquel que es más pronunciado en una dirección, normalmente en las células vegetales en el eje vertical y que da lugar a células alargadas. En este caso las células de la raíz con crecimiento normal son anisotrópicas y las células con crecimiento anómalo por el efecto del herbicida son isotrópicas. Se incluyó una cuestión en el cuaderno de prácticas para incidir en la diferencia entre isotrópico y anisotrópico en futuros grupos (Anexo I). También encontramos numerosos estudiantes que son capaces de dibujar la región apical de la raíz deformada en su conjunto, pero no el aspecto de las células individuales afectadas por el herbicida tal y como las observaron en el microscopio durante la práctica.

En la encuesta (Anexo II) se les preguntó por las prácticas de laboratorio en general, pidiéndoles que enumeraran las dos prácticas que más les habían gustado y

las dos que menos. Solo dos alumnos indicaron que esta práctica se encontraba entre las dos que menos les habían gustado, mientras que 14 la incluyeron entre las que más les habían gustado (5 de ellos en primer lugar). Además, en esta encuesta (Anexo II) se pidió a los alumnos que puntuaran algunos aspectos de la práctica y en conjunto obtuvimos valoraciones muy positivas. Podemos destacar que el 92% recomiendan que se implante esta práctica en los cursos sucesivos; que todos están de acuerdo (23%) o muy de acuerdo (77%) con que la práctica les ha ayudado a comprender la importancia de la organización de la red de celulosa en el papel de la pared celular y únicamente un 5% estima que la clase magistral es suficiente para entender estos conceptos. Por otra parte, solo una minoría del alumnado (5%) manifiesta no haber comprendido bien la práctica.

Objetivo 4

El último objetivo de este proyecto era proponer una práctica de laboratorio novedosa y optimizada para el estudio de la pared celular vegetal en los grados de Biotecnología y Biología. La experiencia piloto en tres grupos consecutivos, llevada a cabo por profesores diferentes del equipo, nos ha permitido mejorar algunos puntos para favorecer la correcta realización de la práctica y el aprendizaje.

Al margen de pequeños ajustes en el procedimiento experimental (Anexo I), el cambio más importante con respecto a nuestra propuesta inicial ha sido tratar de simplificar las comparaciones entre los diferentes tipos de plantulas WT e *ixr* control y tratadas con isoxaben. El análisis de los resultados en esta práctica se puede dividir en 3 partes:

- 1) Observar el fenotipo del ápice radicular de las plantas WT e *ixr* sin tratar con el herbicida y tratadas con el herbicida
- 2) Observar el fenotipo del ápice radicular de las plantas WT e *ixr* sin tratar con el herbicida y tratadas con el herbicida en un medio sin y con sorbitol
- 3) Observar la acumulación de lignina en el ápice radicular de las plantas WT e *ixr* sin tratar con el herbicida y tratadas con el herbicida

Realizar todas estas observaciones, teniendo en cuenta que en todos los puntos cada plántula se tiñe con un colorante (rojo rutenio, rojo neutro o floroglucinol, respectivamente), resultó ser muy repetitivo y los estudiantes acababan perdiendo el interés. Decidimos entonces que era necesario simplificar este análisis para favorecer

el aprovechamiento de la práctica por parte del alumnado, ya que es al final cuando se recapitulan los resultados y se extraen las conclusiones y es importante que sigan manteniendo la atención y que puedan tener una visión clara y concisa de los resultados obtenidos. Resolvimos que el análisis consistiría en establecer la ausencia de fenotipo en el ápice radicular de los mutantes *ixr* tratados con isoxaben en el punto 1) y en el resto de los análisis prescindir del mutante y centrarnos en el fenotipo de las plantas WT cuando se producen alteraciones en la deposición de celulosa en su pared. Así en el punto 2) se van a comparar únicamente plantas WT tratadas con isoxaben en un medio sin sorbitol y en un medio con sorbitol y en el punto 3) se comparará la acumulación de lignina en plantas WT tratadas con isoxaben y sin tratar y el mutante tratado con herbicida. El protocolo definitivo con todas las modificaciones se incluye en el Anexo I.

Justificación económica

Para poder llevar a cabo este Proyecto de Innovación consistente en poner a punto una práctica de laboratorio novedosa acerca de la estructura y función de la pared celular vegetal, se había previsto adquirir el siguiente material:

CONCEPTO	IMPORTE
Semillas del mutante <i>ixr1-1</i> de <i>A. thaliana</i> (NASC ID: N6201)	25 €
Herbicida isoxaben (SIGMA 36138-100MG)	55 €
Colorante rojo neutro (C.I. 50040, Fischer Chemical 5g)	80 €
Floroglucinol (B25502.18 Alfa Aesar™ 50 g)	60 €
Sorbitol (Fisher Bioreagents BP439-500)	30 €
Productos para cultivo in vitro (placas, esparadrapo de sellado ...)	50 €
SUMA TOTAL	300 €

Se nos concedieron 240 €, que se destinaron a la compra del herbicida isoxaben, el colorante rojo neutro y el floroglucinol (por un importe total de 238, 37€ -ver Anexo III-). Las semillas del mutante y los productos restantes se financiaron gracias a la partida presupuestaria de prácticas del área de conocimiento de Fisiología Vegetal. Por una parte, se consideró interesante la propuesta de poner a punto una nueva práctica sobre la pared celular que se pudiera realizar en diferentes asignaturas del área; y por otra, la experiencia piloto se iba a llevar a cabo en la asignatura del área Transporte y Metabolismo Vegetal del Grado en Biotecnología dentro del propio curso académico.

Conclusiones

Gracias a este Proyecto de Innovación y Mejora Docente se ha diseñado una práctica novedosa para mejorar el aprendizaje de la estructura y función de la pared celular vegetal. Esta práctica hace hincapié en la importancia de la celulosa en la estructura de la pared, pero sobre todo en la necesidad de una pared funcional y dinámica para asegurar el correcto desarrollo de las células vegetales. Asimismo, se demuestra la capacidad de adaptación de esta estructura ante cambios en el entorno. Se ha desarrollado un protocolo adaptado para su realización en el laboratorio de prácticas con grupos de unos 12-16 alumnos. Destaca el uso de *A. thaliana* como material vegetal, planta modelo por excelencia en Fisiología vegetal, y el uso de mutantes para determinar y estudiar la función de los genes y las proteínas que codifican. La práctica diseñada se ha llevado a cabo con éxito en 3 grupos de la asignatura Transporte y Metabolismo Vegetal del Grado en Biotecnología. Con esta experiencia piloto se ha optimizado el protocolo para poder implantarla en otras asignaturas y Grados en el futuro. La valoración ha sido positiva, tanto por parte del estudiantado, como por parte del profesorado, por lo que se va a mantener en el programa de la asignatura de Transporte y Metabolismo Vegetal en sucesivos cursos académicos.

Anexo I

Guión de la práctica desarrollada en el proyecto de innovación y mejora docente, se indican los cambios realizados en el protocolo después de la experiencia piloto.

PRÁCTICA 1:

La celulosa en la estructura y función de la pared celular

Introducción

La pared celular es una estructura semirrígida que proporciona forma y soporte estructural a las plantas. Esta estructura dinámica limita y orienta el crecimiento de las células vegetales, influyendo en la especialización celular y en la morfología y desarrollo de la planta. Todas las paredes celulares están formadas por un armazón de fibras de celulosa embebidas en una matriz, constituida en su mayoría por polisacáridos hemicelulósicos y pécticos, junto con otros componentes como diversas proteínas y lignina. Dependiendo de la especie vegetal, la concentración y tipo de componentes de la pared varía.

La celulosa se sintetiza en complejos multienzimáticos llamados rosetas o CSC (*Cellulose Synthase Complex*), las subunidades catalíticas de las rosetas están codificadas por genes CESA (*CELLULOSE SYNTHASE A*) que en el caso concreto de *Arabidopsis thaliana*, son 10. Mediante el análisis de mutantes para la biosíntesis de celulosa se ha demostrado que durante la formación de la pared primaria en *Arabidopsis* se requieren los productos de tres genes CESA: AtCESA1, AtCESA3 y AtCESA6/2/5/9. Así, los defectos en CESA1 y 3 dan fenotipos alterados con pérdida del crecimiento anisotrópico, lignificación ectópica y crecimiento disminuido.

La utilización de inhibidores de la biosíntesis de celulosa ha sido muy útil a la hora de estudiar la formación, organización, estructura y plasticidad de la pared celular y en concreto ha ayudado a entender diferentes procesos de la biosíntesis de celulosa.

En esta práctica vamos a trabajar con el mutante *ixr1-1* de *Arabidopsis*, que es resistente al herbicida isoxaben, un inhibidor de la biosíntesis de celulosa. El modo de acción de este herbicida no está caracterizado por completo, pero se piensa que interactúa con un sitio de unión entre las proteínas CESA3 y CESA6, de tal forma que desestabiliza el complejo CSC impidiendo su correcto funcionamiento. Cuando se tratan con isoxaben, las plantas de tipo silvestre (Wild Type, WT) presentan un número reducido de rosetas en la membrana y una composición alterada de su pared, con una red de celulosa insuficiente que tratan de compensar con otros componentes de la pared como la calosa o la lignina. En cambio, el mutante *ixr1-1* codifica una proteína CESA3 con una sustitución G998D, localizada en un dominio transmembrana, que la hace resistente al isoxaben y que puede sintetizar celulosa con normalidad incluso en presencia de este herbicida.

Vamos a observar y analizar los efectos que tiene la alteración de la matriz de celulosa en el desarrollo vegetal, en concreto en la elongación celular.

Materiales

- Plántulas de *Arabidopsis thaliana* WT y mutante *ixr1-1* de 5d ~~7d~~
- Placas Petri redondas con medio de cultivo 0,5x MS (control); 0,5x MS suplementado con isoxaben 600 nm; y 0,5x MS suplementado con isoxaben 600 nm y sorbitol 400 mM
- Pinzas, portaobjetos y cubreobjetos
- Colorantes rojo neutro, rojo rutenio y floroglucinol. NaCl al 5%
- Microscopio óptico

Metodología

- Esterilizar, estratificar y sembrar unas ~~20~~ 30 semillas WT y ~~20~~ 15 semillas *ixr1-1* en placas Petri cuadradas con medio 0.5x MS con Sacarosa. Crecer en posición vertical en una cámara de germinación a 22 °C con un fotoperiodo de 16h de luz y 8h de oscuridad.
- Transcurridos ~~7~~ 5 días desde su siembra tomar ~~6 plántulas de cada tipo (WT e *ixr1-1*)~~ 10 plántulas WT y 5 plántulas *ixr1-1* y transferirlas a placas Petri con medio 0.5x MS con los distintos tratamientos indicados a continuación.

1	Control (sin tratamiento)
2	Isoxaben 600 nM
3	Isoxaben 600 nM + Sorbitol 400 mM

Con unas pinzas coger las plántulas por el hipocótilo, debajo de la roseta, y tirar despacio en dirección a la raíz para despegarla del medio de cultivo. Al transferirlas a la nueva placa, tener cuidado de que la raíz quede bien estirada sobre el agar y disponer todas las plantas con la raíz alineada en la misma dirección. Sellar las placas con esparadrapo quirúrgico y dejar 48 h más en la cámara de germinación orientadas verticalmente.

- Analizar los efectos de los diferentes tratamientos en las plantas WT e *ixr1-1* observando las plantas al microscopio con diferentes tinciones:
 - o **Teñir las plántulas con colorante rojo rutenio*** (reservar plántulas para las siguientes tinciones). **Comparar dos plántulas WT control y dos más tratadas con herbicida con dos plántulas *ixr1-1* control y dos tratadas con herbicida.** Preparar 1 tubo eppendorf con 1 ml de colorante e introducir dos plántulas con cuidado de sumergirlas completamente. Dejar actuar 1 minuto, sacarlas con cuidado y lavarlas con abundante agua destilada en una placa Petri. Montar en un portaobjetos con unas gotas de agua destilada y colocar un cubreobjetos procurando no dejar burbujas. Repetir el proceso con las plántulas restantes. **No olvidar marcar adecuadamente los portaobjetos indicando si se trata de plantas WT o mutante y el tratamiento del que proceden.** Observar al microscopio la región apical de la raíz buscando diferencias entre el WT y el mutante en las distintas condiciones.

*El rojo rutenio es un colorante con especial afinidad por las pectinas.

- o **Teñir las plántulas con colorante rojo neutro***. **Comparar las plántulas WT crecidas en isoxaben con las plántulas WT crecidas en isoxaben con sorbitol.** Preparar 2 tubos eppendorf (uno por tratamiento) con 1ml de solución de NaCl al 5%, introducir 2 plántulas e incubar 2 minutos. Añadir 3 o 4 gotas de colorante con una pipeta pasteur, mezclar por inversión e incubar 2 minutos más. Retirar el colorante y lavar las plántulas pasandolas a un nuevo eppendorf con 1 ml de solución NaCl 5%. Montar con esta misma solución en un portaobjetos para su análisis al microscopio. Observar la región apical de la raíz buscando diferencias entre las distintas condiciones. Analizar si hay cambios en la forma de las células y en el número de células muertas.

*El rojo neutro es un colorante vital, solo entra en las células vivas, y tiñe especialmente componentes ácidos como el interior de las vacuolas.

- **Teñir las plántulas con floroglucinol***. Comparar las plantas WT control con las plantas WT y mutante *ixr1-1* crecidas en herbicida. Preparar 3 portaobjetos (dos por tratamiento, uno para el WT y otro para el mutante) con 3 plántulas cada uno (bien estiradas) y añadir sobre ellas unos 200 ul de solución de floroglucinol al 2%, incubar 2 minutos. Montar con un cubreobjetos para su análisis al microscopio. Observar la región apical de la raíz buscando diferencias entre el WT y el mutante en las distintas condiciones.

*El floroglucinol tiñe la lignina. Tener cuidado al manipularlo que lleva HCl.

Análisis de resultados

1. ¿Cómo explicas que el efecto del isoxaben se observe sobre todo en la zona apical de la raíz?
2. ¿Has observado células con crecimiento isotrópico en algún tratamiento?
3. ¿Observas los mismos cambios en las plantas tratadas con isoxaben y las tratadas con este herbicida cuando crecen en presencia de sorbitol? ¿Por qué crees que es?
4. ¿Hay diferencias en el número de células muertas? ¿Por qué puede ser?
5. ¿Coincide la deposición de lignina con las zonas afectadas por el herbicida? ¿en qué tejidos hay lignina?

Anexo II

Relación de preguntas incluidas en la encuesta sobre la práctica “La celulosa en la estructura y función de la pared celular” y respuestas obtenidas

¿Qué dos prácticas son las que menos te han gustado? (por orden)

- 1.
- 2.

¿Qué dos prácticas son las que más te han gustado? (por orden)

- 1.
- 2.

Con respecto a la práctica 1: “La celulosa en la estructura y función de la pared celular”

(señala con una X: 1 totalmente en desacuerdo, 4 totalmente de acuerdo)

	1	2	3	4
Me ha ayudado a comprender la importancia de la organización de la red de celulosa para el correcto funcionamiento de la pared				
Demuestra la importancia de la pared en el crecimiento celular				
Ayuda a entender la necesidad de la toma de agua para el crecimiento				
Sirve para comprobar que la pared no permanece estática en el desarrollo				
Me ha ayudado a comprender la relación de la celulosa con las pectinas				
Con la clase de teoría es suficiente para comprender estos conceptos				
Esta práctica tiene un nivel de dificultad adecuado a la asignatura				

(señala con una X)

	Sí	No
Entendí esta práctica en el laboratorio mientras la realizábamos, con las explicaciones del profesor/a.		
Entendí esta práctica después de realizarla, cuando la estudie para el examen.		
Entendí esta práctica porque me ayudó uno de mis compañeros/as		
Entendí esta práctica después de una tutoría con el profesor/a		
Creo que no he entendido del todo bien la práctica		
Recomiendo que se haga esta práctica al año que viene		

Si quieres puedes escribir un comentario o crítica constructiva sobre la práctica 1: “La celulosa en la estructura y función de la pared celular” o sobre cualquier otra.

RESULTADOS

Para evaluar los resultados de las dos primeras preguntas se ha dado una puntuación de -2 o -1 a las prácticas menos valoradas y de 2 o 1 a las más valoradas. Con esta puntuación se ha calculado una nota global para cada práctica

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	Global	La más valorada	La menos valorada	
Pared celular		1		1												2	1	-2			-1	1	1	2		2	2	1	1			1	1					2		16	5	1	
Microscopio		-2			2		-1	1	-1									2				-2				1			1		-1	1		2						1	4	3	2
Potómetro	2	-1	-2	-1	1				2	-1	-2	-1	2	1	2		2	1		2	1	2			1	2		-1	-1	2	1		2			-2			-2	-1	11	10	4
Reversibilidad	1						-2	-2		-2		-2			-2	-2		-2				-2								-2	-2							-2	-1		-22	0	11
Chardakov			-1			1															2								2		2	-2	-1			1	1			5	3	1	
Respiración	-1									1	2					-1	-1							-2											1					-1	1	1	
Geranio		2	2		-2		2		1									-2										1				2				2	-1	2		9	6	2	
Oxígeno																				-1	-2																-2			-6	0	2	
Hill	-2		1	-2	-1	-2	2	2	-2	2	1	2	-2		1	1		-1	1				2	2	-2	-2	-2	1	-2		-2	-2		2	-1	2		-2	-5	8	12		
Tetrazolium						-1		-1			-1	1	1	-2					2	1		1			-1	-1														-1	1	1	
Cromatografía				2		2								2			-1				-1																1			5	3	0	

RESULTADOS

pregunta	
1	Me ha ayudado a comprender la importancia de la organización de la red de celulosa para el correcto funcionamiento de la pared
2	Demuestra la importancia de la pared en el crecimiento celular
3	Ayuda a entender la necesidad de la toma de agua para el crecimiento
4	Sirve para comprobar que la pared no permanece estática en el desarrollo
5	Me ha ayudado a comprender la relación de la celulosa con las pectinas
6	Con la clase de teoría es suficiente para comprender estos conceptos
7	Esta práctica tiene un nivel de dificultad adecuado a la asignatura

pregunta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	media	4	3	2	1	% totalmente de acuerdo						
1	3	3	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	3	4	3	3	4	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3,77	30	9	0	0	76,92%		
2	4	3	3	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3,85	34	4	1	0	87,18%
3	3	4	3	3	3	4	3	3	1	2	4	2	4	4	4	2	4	4	4	2	2	1	4	2	2	4	4	2	3	4	3	4	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	3	4	3,18	19	10	8	2	48,72%	
4	3	3	3	4	4	4	3	3	4	4	2	4	4	4	4	4	2	3	4	4	3	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	3	4	4	3	3,56	25	11	3	0	64,10%	
5	2	2	2	2	2	4	2	2	3	2	2	4	4	4	2	3	1	4	3	4	2	3	2	3	3	3	3	4	4	1	3	4	2	4	2	4	4	2	3	2	3	2	2,82	12	10	15	2	30,77%			
6	3	2	2	3	1	3	1	2	1	2	2	1	4	3	3	3	1	2	2	2	1	4	2	2	2	3	1	2	3	3	3	2	2	3	3	2	2	3	2	2	3	2	2,26	2	13	17	7	5,13%			
7	4	0	4	4	4	4	3	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	3	3	4	4	4	3	4	4	3	4	4	3	4	4	4	4	4	3	4	3	3	3,59	27	10	1	0	71,05%					

4: totalmente de acuerdo

1: totalmetne en desacuerdo

RESULTADOS

pregunta	
1	Entendí esta práctica en el laboratorio mientras la realizabamos, con las explicaciones del profesor/a.
2	Entendí esta práctica después de realizarla, cuando la estudie para el examen.
3	Entendí esta práctica porque me ayudó uno de mis compañeros/as
4	Entendí esta práctica después de una tutoría con el profesor/a
5	Creo que no he entendido del todo bien la práctica
6	Recomiendo que se haga esta práctica al año que viene

pregunta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	Si	No	NS/NC	Si	No	NS/NC	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	33	5	1	84,62%	12,82%	2,56%	
2	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	32	6	1	82,05%	15,38%	2,56%		
3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	10	28	1	25,64%	71,79%	2,56%	
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	37	1	2,56%	94,87%	2,56%	
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	35	2	5,13%	89,74%	5,13%		
6	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	36	3	0	92,31%	7,69%	0,00%

Anexo III

Factura de compra del Isoxaben, el Rojo Neutro y el Floroglucinol presupuestados en el proyecto.



FACTURA

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE BIOLOGIA
DPTO. BOTANICA Y FISILOGIA VEGETAL

Campus Univ. Miguel de Unamuno
37008 SALAMANCA
SALAMANCA

FECHA	FACTURA Nº	CLIENTE	N.I.F.	SU PEDIDO Nº
26/05/22	24229	430374036	Q-3718001-E	Lucía Albornos

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	UNIDADES	PRECIO	IMPORTE
36138-100M	ALBARÁN 53052 FECHA 26/05/22 Isoxaben, PESTANAL®, analytical standard	1,0	55,0000	55,00
50040	Rojo neutro, puro, grado indicador, C.I.	1,0	89,0000	89,00
B25502-18	Phloroglucinol, anhydrous, 98%	1,0	53,0000	53,00

OFICINA CONTABLE: U01400001 UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
ÓRGANO GESTOR: U01400001 UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
UNIDAD TRAMITADORA: GE0002045 CENTRO DE FORMACIÓN PERMANENTE
ORGANO PROPONENTE: 180276 .

TOTAL IMP.	%	IMPORTE	BASE	%	IVA	%	REC.	TOTAL FRA.
197,00			197,00	21,00	41,37			238,37

Forma de Pago:ESMMXXX ES39 0182 0733 1302 0157 2329

Banco:

J.L. Asensio, S.L.

Plaza de la Armonía, 1 - 47009 VALLADOLID - Telf. 983 26 11 54 - Fax. 983 25 91 56

N.I.F. B 47030739

Inscrito en el Registro Mercantil de Valladolid, Tomo 143 General, Libro 17 de la Sección 2ª de Sociedades, Folio 86, Hoja nº 352 Inscripción 1ª