ASIGNATURA / COURSE TITLE

Laboratorio Integrado de Fisiología Vegetal / Integrated Laboratory of Plant Physiology

1.1. Código / Course number

16319

1.2. Materia / Content Area

Laboratorio Integrado / Integrated Laboratory

1.3. Tipo / Course type

OBLIGATORIO / COMPULSORY

1.4. Nivel / Course level

Grado / Bachelor

1.5. Curso/ Year

Cuarto / Fourth

1.6. Semestre / Semester

Anual/Annual

1.7. Número de créditos / Credit allotment

6 ECTS

1.8. Requisitos previos / Prerequisites

Es muy recomendable haber superado la asignatura de Fisiología Vegetal de 3º / It is highly recommended to have basic knowledge of Plant Physiology

1.9. Requisitos mínimos de asistencia a las sesiones presenciales / Minimum attendance requirement

La asistencia es obligatoria/The attendance is mandatory

1.10. Datos del equipo docente / Faculty data

Hernández Rodríguez, Luis E. (COORDINADOR)

Correo electrónico: luise.hernandez@uam.es	Teléfono: 8191	Web del profesor: http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/luise/
Departamento: Biología	Centro: Ciencias	
Horario de tutorías generales:	Despacho: BS	

1.11. Objetivos del curso / Course objectives

La asignatura se divide en cuatro módulos prácticos: Producción Primaria en Sistemas Acuáticos, Respiración y Fotosíntesis, Estrés Oxidativo Inducido por Salinidad y Fijación de N_2 bajo Condiciones de Salinidad. En el discurrir de la asignatura se pretende que el alumno sea capaz de plantear y desarrollar un experimento, manipular correctamente los datos obtenidos, interpretarlos en base a datos previos publicados y desarrollar hipótesis para futuros trabajos. Se trata de aprender, en definitiva, el método científico. Al final del curso se organizará, asimismo, un Simposio Estudiantil en el que los alumnos tienen que elaborar una presentación de uno de los módulos en formato de panel, con lo que los alumnos tienen que aprender a resumir conceptos y exponerlos convincentemente al resto de compañeros y a los profesores.

The Course is divided in four experimental modules in the laboratory: Primary Production in Aquatic Systems, Photosynthesis and Respiration, Oxidative Stress Induced by Salinity and Nitrogen Fixation under Salinity Conditions. It is intended that the student will be able to design and carry out an experiment, to analyze correctly the obtained data, to interpret the results based on previous published data, and to be able to develop scenarios for future work. The basic aim of the course is to show the students to apply the scientific method. A Student Symposium will be also organized at the end of the course, in which the students have to prepare a poster communication of one of the modules. The students will learn how to resume concepts and expose them convincingly to the rest of students and teachers.

1.12. Contenidos del programa / Course contents

Contenidos del Programa
1. Módulo de Producción Primaria en Sistemas Acuáticos.
2. Módulo de Fotosíntesis y Respiración.
3. Módulo de Estrés Oxidativo Inducido por Salinidad.
4. Módulo de Fijación de N2 bajo Condiciones de Salinidad.
5. Simposio Estudiantil.
6. Actividad Complementaria: comprensión de artículos de investigación original.

Program Contents
1. Primary Production in Aquatic Systems Module.
2. Photosynthesis and Respiration Module.
3. Oxidative Stress Induced by Salinity Module.
4. Nitrogen Fixation under Salinity Conditions Module.
5. Student Symposium.
6. Complementary Activity: understanding of original published research articles.

1. Módulo de Producción Primaria en Sistemas Acuáticos:
El módulo de producción primaria en ambientes acuáticos pretende estudiar y comparar las características fotosintéticas de las comunidades de fitoplancton de dos embalses de la Comunidad de Madrid en diferente estado trófico. Realizaremos una curva fotosíntesis versus irradiancia midiendo la tasa fotosintética variando la cantidad de luz que incide en los organismos. En nuestro caso utilizaremos $NaH^{13}CO_3$ como sustrato de la fotosíntesis y haremos la incubación *in situ*. El análisis de las muestras se realizará por espectrometría de masas, con la colaboración del SIDI. Asimismo, se medirá la abundancia de organismos fitoplanctónicos estimando su biomasa midiendo la concentración de clorofila *a*, y el contenido en carbono de la comunidad mediante el análisis del POC (Carbono Orgánico Particulado). Para conocer las características ambientales de los sistemas acuáticos analizaremos algunas variables químicas del agua de los embalses, e identificaremos los organismos fitoplanctónicos. Se ajustarán las curvas y se compararán ambos ecosistemas.

2. Módulo de Fotosíntesis y Respiración:
En este módulo se medirá la actividad fotosintética (total y de cada uno de los fotosistemas por separado) y actividad respiratoria, así como el contenido en pigmentos fotosintéticos (clorofila *a* y ficobiliproteínas) de tres cepas de la cianobacteria filamentosa *Anabaena* sp. PCC7120; la cepa silvestre que se usará como control y dos cepas mutantes afectadas en fotosíntesis denominadas PHB11 y LC1. En una primera sesión, se medirá la actividad

fotosintética de los cultivos de *Anabaena* sp. utilizando distintas calidades de luz que excitan distintos pigmentos fotosintéticos (luz blanca, luz roja y luz de 620nm) y la actividad respiratoria de los mismos cultivos. Además se determinará el peso seco de los cultivos, se realizará la extracción de los pigmentos clorofila *a* y de la ficobiliproteína ficocianina y por último se registrarán los espectros *in vivo* de los cultivos de las cianobacterias. En una segunda sesión se medirá la actividad de cada uno de los fotosistemas de los cultivos de *Anabaena* sp. PCC7120 mediante el uso de aceptores y donadores de electrones artificiales y se medirá el contenido de clorofila *a* y ficocianina de los extractos realizados en la primera sesión.

3. Módulo de Estrés Oxidativo Inducido por Salinidad:
Las plantas bajo condiciones ambientales adversas sufren una alteración en su homeostasis redox: se produce el desajuste entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS; pro-oxidantes) y su destrucción por el sistema antioxidante celular. Como ejemplo sencillo, se tratarán plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) con 200 mM NaCl para producir estrés por salinidad, lo que desencadena una respuesta fisiológica a varios niveles. Entre los diversos síntomas que se producen, destaca la acumulación de ROS y la inducción de un ajuste osmótico. Se determinarán parámetros como detección de peroxidación de lípidos (índice de estrés oxidativo) y contenido de prolina (ajuste osmótico), la concentración de clorofila y la actividad fotoquímica midiendo la fluorescencia de clorofila con un fluorímetro de pulso modulado Hansatech FMS2 (fotosíntesis). Se estudiará la expresión del gen NHX2 de respuesta a salinidad en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* (*pNHX2::GUS*), que codifica un antiportador vacoular Na^+/H^+ necesario para la homeostasis iónica celular. Se detectará la expresión determinando la actividad del gen delator β-glucuronidasa (GUS). Finalmente, se completará el estudio analizando la actividad de ascorbato peroxidasa (APX), enzima que permite la detoxificación H_2O_2 ejerciendo su papel dentro del ciclo antioxidante ascobato-glutatión, y que detectaremos detectaremos tras electroforesis no-desnaturalizante en geles de poliacrilamida.

4. Módulo de Fijación Simbiótica de N_2 y Estrés Salino:
La fijación biológica del nitrógeno atmosférico, consistente en la reducción de N_2 a NH_4^+ por la enzima nitrogenasa, es, después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la Biosfera. Este proceso crucial tiene al oxígeno como mayor inhibidor y sólo puede ser llevado a cabo por unos pocos grupos de seres vivos, todos ellos procariotas, que pueden generar un ambiente microaerobio donde realizar la fijación biológica de nitrógeno en forma libre o estableciendo relaciones simbióticas con otros organismos. Dentro de esta última opción, el sistema rizobiáceas-leguminosas es el que ha sido estudiado ampliamente y en mayor profundidad. A diferencia de otros fijadores de N_2, las rizobiáceas sólo pueden realizar este proceso tras una serie de interacciones con leguminosas, que originan el

desarrollo de un órgano mixto, normalmente en la raíz, el nódulo simbiótico, en el que se proporciona un entorno de oxígeno controlado, así como los nutrientes necesarios para que la bacteria pueda efectuar el proceso de fijación. El objeto de este módulo es la utilización de diversas técnicas bioquímicas y de biología molecular para estudiar el proceso de fijación de N_2 en la simbiosis *Rhizobium*-guisante (*Pisum sativum* L.). Asimismo, puesto que las leguminosas, como el guisante, son plantas sensibles a la salinidad, especialmente cuando dependen de la simbiosis para la obtención del nitrógeno, el empleo de dichas técnicas permitirá analizar los efectos del estrés salino sobre la fijación de N_2. El desarrollo de esta práctica consiste en el estudio de la enzima nitrogenasa encargada de fijar nitrógeno dentro del nódulo formado en la simbiosis *Rhizobium*-guisante. Se llevará a cabo a nivel de la transcripción, síntesis de proteínas y actividad enzimática, en dos situaciones fisiológicas: cultivo control y estrés salino.

5. Simposio Estudiantil de Fisiología Vegetal:
Como parte de la evaluación de la asignatura, se organizará un Minicongreso para que los alumnos presenten parte de los resultados obtenidos. Los alumnos, organizados en parejas, presentarán sus trabajos en paneles. A cada grupo de alumnos se les adjudicará un tema para su desarrollo. Idealmente, deberán de discutir los resultados más relevantes obtenidos que guarden relación con el tema a exponer, manejando para ello bibliografía facilitada por los profesores responsables de cada grupo temático.

6. Actividad complementaria: comprensión de artículos de investigación original:
Se entregará a los alumnos un artículo original de investigación relacionado con los experimentos y técnicas se emplean en los diversos módulos. El reparto se hará por sorteo, de igual forma que se hace la adjudica los temas a desarrollar en los paneles del Minicongreso. El alumno, individualmente, tendrá que elaborar un resumen de un máximo de una página impresa, en el que se reflejarán los hallazgos más interesantes, así como una crítica personal sobre el contenido del artículo, que refleje el nivel de compresión del contenido técnico y teórico del mismo.

1. Module of Primary Production in Aquatic Ecosystems:

This module is aimed to study and compare the photosynthetic characteristics of two phytoplanktonic communities from two water reservoirs of different trophic state at Comunidad de Madrid. The students will build a typical Photosynthesis vesus Irrandiance curve measuring the photosynthetic rate at different irradiances, following the incorporation *in situ* of the stable isotope ^{13}C (given as $NaH^{13}CO_3$). The enrichment of ^{13}C will be measured by mass spectrometry at the analytical facilities of UAM's SIDI. The abundance of

phytoplankton biomass, by means of chlorophyll *a* quantification, and particulated organic C will be also measured. After a description of the taxonomical composition of the two communities sampled, the students will analyse several environmental characteristics in the field, by measuring *in situ* the nutrient load (nitrate, ammonium and phosphate), pH, conductivity, dissolved oxygen, temperature and alkalinity of the water. Finally, the students will complete their analyses in the laboratory through a statistical study of the results, which should be adjusted to different mathematical models.

2. Module of Photosynthesis and Respiration:

This module will focus on techniques to measure photosynthetic activities (global photosynthesis as well as each photosystem activity), respiration and photosynthetic pigment contents (chlorophyll a and phycobiliproteins). The model organisms for these studies will be the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 wild type and two derivative mutant strains, denoted as PHB11 and LC1, that are affected in photosynthesis. The module is organized in two sessions: in the first one, students will study the effect of spectral light quality on photosynthesis, they will measure respiration and will begin pigment extraction of the three strains; in the second session, students will measure the activity of both photosystems by separate using different electron donors and acceptors, will finish pigment extraction and measure their contents.

3. Oxidative Stress Induced by Salinity Module:

Plants under stress conditions change their redox homeostasis: there is an unbalance between the production of Reactive Oxygen Species (ROS; pro-oxidants) and their scavenging by the cellular antioxidative system. As a workable example, tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants kept in a semi-hydroponic system will be treated with 200 mM NaCl to cause a salinity stress, which triggers physiological responses at several levels. In such conditions, the accumulation of ROS and the induction of an osmotic adjustment are the most relevant symptoms already described in the literature. Several physiological parameters will be determined: lipid peroxidation (oxidative stress index), concentration of proline (osmotic adjustment), chlorophyll content and photochemical activity, measured by the chlorophyll fluorescence using a pulse modulated fluorimeter (Hansatech FMS2). The expression of the NHX2 gene under salinity will be studied in *Arabidopsis thaliana pNHX2::GUS* transgenic plants, which encodes a vacuolar Na^+/H^+ antiporter needed for ion homeostasis. The expression will be detected by the histochemical reaction of the gen reporter β-glucuronidase (GUS). Finally, the study will be complemented with the determination of the ascorbate peroxidase (APX) activity, enzyme that scavenges H_2O_2 and plays an important role in the ascorbate-glutathione antioxidant cycle. The enzymatic activity will be

measured *in gel* after a non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme cytAPX detoxifies H_2O_2 within the antioxidant ascobate-glutathione cycle.

4. Module of Biological Nitrogen Fixation.

The biological fixation of atmospheric nitrogen consists in the reduction of N_2 to ammonia by the nitrogenase enzyme. This process is, after photosynthesis, the most important metabolic pathway for the maintenance of life in the Biosphere. Oxygen is a potent inhibitor of this crucial process that can only be performed by a few groups of prokaryotes, which can generate a microaerobic atmosphere, by free living or symbiotic nitrogen fixation. Within this latter option, the rhizobia-legume system has been extensively studied in greater depth. Unlike other nitrogen fixers, rhizobia can fix nitrogen only after interaction with legumes, in which a new organ called the symbiotic nodule is formed, usually in the root. The nodule provides a oxygen controlled environment, as well as nutrients for the bacteria to develop to bacteroids and fix nitrogen. The purpose of this module is the use of various biochemical and molecular biology techniques to study the process of Nitrogen fixation in the symbiosis Rhizobium-pea (*Pisum sativum* L.). On the other hand, since legumes, such as peas, plants are sensitive to salinity, especially when they depend on the symbiosis for obtaining nitrogen, the use of these techniques will analyze the effects of salt stress on the N_2 fixation process. In this module, we will study the nitrogenase enzyme responsible for fixing nitrogen, at the transcriptional, translation an enzymatic activity level under two physiological conditions: control and salinity stress.

5. Plant Physiology Symposium:

A congress will be organized and students will present some of the results obtained in the experiments carried out in each of the modules. The students, organized in groups of two-three students, will present their work in panels. Ideally, they should present and discuss the most relevant results obtained in the modules.

6. Complementary activity: Comprehension and discussion of original scientific articles. In each module the students will have to read one original research papers related with the experiments and techniques developed in each module. Each student will write a summary of a maximum of one printed page, and discuss it including a personal criticism with the experience gained during the course.

1.13. Referencias de consulta / Course bibliography

Toda la información está recogida en la página web de la asignatura, que estará alojada en la herramienta MOODLE-UAM. Los guiones de los módulos en los que está dividido, referencias bibliográficas, calendario de prácticas, clases de presentación, puesta en común de resultados, convocatorias de exámenes, y finalmente, la organización del Minicongreso de Fisiología Vegetal.

Lectura básica:

- Taiz L y Zeiguer E (2010) Plant Physiology (5ª Ed.) Sinauer ISBN 978-0-87893-511-6 (www.plantphys.net)
- Buchanan B, Gruissem W, Jones R (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. John Wiley and Sons Ltd. ISBN 0943088-39-9

All information is collected on the website of the subject, located in the at the webtool MOODLE-UAM: protocols of the different modules, bibliographic references, laboratory teaching schedule, discussion forums, calls for exams, and finally, the organization of the Congress in Plant Physiology.

2. Métodos docentes / Teaching methodology

1. La asignatura se divide en cuatro módulos, en los que tienen que realizar los alumnos pequeños experimentos. Los alumnos tendrán la posibilidad de utilizar diversas técnicas analíticas, algunas de ellas de última generación y que están siendo utilizadas en los laboratorios de investigación de los profesores implicados. Así, se detectarán cambios en diversos parámetros fisiológicos.

2. Antes de la realización de los módulos prácticos, se ofrece a los alumnos información detallada de lo que van a realizar. Asimismo, al término de cada módulo se organizan sesiones de discusión de resultados, en las que se enfatiza la importancia de cotejar los datos obtenidos con la bibliografía disponible y con los resultados obtenidos en anteriores cursos.

3. Al finalizar los módulos prácticos se examinará a los alumnos de los conocimientos adquiridos: han de comprender el fundamento de las técnicas analíticas empleadas, así como mostrar su capacidad de discutir los resultados obtenidos.

4. Una actividad esencial que se realiza es la presentación de comunicaciones científicas en formato de panel en un congreso organizado con los alumnos y

profesores. Por sorteo, los alumnos se agrupan en tríos que han de presentar una comunicación con los resultados obtenidos en un módulo concreto. Previamente a la celebración del congreso, se les exige elaborar un resumen, para confeccionar un libro de resúmenes del congreso. La calidad de los paneles es evaluada tanto por los profesores como por los alumnos, en un sistema de co-evaluación. Para facilitar el procesado de datos, se emplean formularios ópticos que son leídos por el Gabinete de Estudios de la UAM.

5. Nuestra experiencia pone de manifiesto que un pequeño porcentaje de alumnos adquiere la suficiente destreza para leer bibliografía en inglés, comprenderla y utilizarla para apoyar los resultados obtenidos en la parte práctica de la asignatura. Proponemos que los alumnos lean un artículo científico publicado en una revista internacional, que esté relacionado con los experimentos de cada módulo. Los alumnos tendrán que elaborar resúmenes, que serán evaluados en función de la capacidad de extraer los conceptos más importantes, relacionándolos con la experiencia obtenida durante el transcurso de la asignatura.

1. The Course is divided into four modules, in which the students have to perform experiments. Students will be using several state-of-the-art analytical techniques to characterise changes in various physiological parameters, applied at different experimental designs.

2. Before each module, the lecturers will give a seminar to explain in detail the experiments that the student will do. Also, at the end of each module, discussion sessions of results will be organized to emphasize the importance of comparing the obtained results with data available in the literature.

3. Once the experimental modules were completed, the students will have to pass an exam. They have to understand the basis of the analytical techniques employed, as well as show their ability to discuss the obtained results.

4. One of the most important activities is the presentation of posters in the Plant Physiology Congress. The students, in groups of two-three, will prepare a communication with the results obtained in a particular module. Prior to the congress, they are required to provide an abstract that will be included in the Book of Abstracts of the Congress. The quality of the posters is evaluated both by teachers and by students, using a system of co-evaluation.

5. Our experience shows that a small percentage of students have the skill of reading papers in English. Therefore, the students have to read scientific papers published in international journals, which are related to the experiments of each module. Students will have to prepare summaries, which will be evaluated according to their capacity to highlight the key concepts,

and to discuss the results in the background of the experience obtained during the course.

3. Tiempo de trabajo del estudiante / Student workload

Actividades Presenciales
Clases teóricas introductorias: 4 h
Clases de puesta en común: 6 h
Procesado de datos Producción Primaria en Sistemas Acuáticos: 6 h
Examen: 2 h
Clases prácticas: 50 h
Sesión del Simposio Estudiantil de Fisiología Vegetal: 6 h
Práctica/salida de campo y muestreo: 6 h
Tutorías: 4 h

Actividades Dirigidas
Trabajos individuales de lectura de artículos científicos: 12 h
Estudio y preparación de exámenes: 42 h
Elaboración de resumen y panel para el Simposio Estudiantil de Fisiología Vegetal: 12 h

Face to Face activities:
Introductory lectures for the laboratory modules: 4 h
Discussion sessions of the results: 6 h
Data processing of computing sessions of the Primary Production in Aquatic Ecosystems: 6 h
Exam: 2 h
Experimental laboratory classes: 50 h
Student Congress: 6 h
Field experiments: 4 h

Tutored activities:
Reading and discussion of papers: 12 h
Exams preparation: 42 h
Abstract and panel preparations for the Congress: 12 h

4. Métodos de evaluación y porcentaje en la calificación final / Evaluation procedures and weight of components in the final grade

Porcentaje en la calificación final

- Exámenes o evaluaciones de cada módulo: 70%
- Trabajos dirigidos bibliográficos y discusión resultados: 15%
- Co-evaluación del minicongreso: 15%
- La convocatoria extraordinaria tendrá que presentar el alumno un nuevo resumen de artículo científico, distinto del presentado en la convocatoria ordinaria (15%), examen de los módulos (70%) y nota obtenida del minicongreso (15%).
- El estudiante que haya participado en menos del 30% de las actividades evaluables será calificado como no evaluado

Percentage of each evaluation method in the final marks:

- Exams: 70%
- Elaboration of an abstract from an original research paper and discussion sessions: 15%
- Student symposium: 15%
- In the extraordinary evaluation the student must elaborate a new abstract different from the one handed in the ordinary evaluation (15%), and pass a retake examination of all modules (70%), plus the marks obtained in the student minisymposium (15%).

5. Cronograma* / Course calendar

Los horarios oficiales se pueden consultar en la página web del Grado de Biología
http://www.uam.es/ss/Satellite/Ciencias/es/1242655508884/contenidoFinal/Biologia.htm