# Práctica 3:
# REACCIÓN DE HILL

## 1. Propósito

Ilustrar la reacción de Hill mediante el empleo de un aceptor de electrones artificial, el 2,6-diclorofenol indofenol y analizar el efecto de los herbicidas de tipo atrazina sobre dicha reacción.

## 2. Material necesario

***Material vegetal:*** 10 g de hojas de espinaca fresca.

***Material de laborarorio:*** 200 ml de tampón fosfato 50 mM pH 6.5.

0.1 ml de disolución saturada de atrazina.

100 ml de 2,6-diclorofenol indofenol (DCIP) 0.11 mM (5.8 mg en 200 ml de $H_2O$).

2 baños de hielo (vasos con hielo picado).

Gasas hidrofílicas. Tijeras. Mortero y mano fríos. 5 tubos graduados de 10 ml. Pipetas Pasteur. Lámpara de 100 watios. Baño. Centrífuga refrigerada. Espectrofotómetro.

## 3. PROCEDIMIENTO.

### A. Aislamiento de cloroplastos.

1. Antes de empezar el aislamiento de los cloroplastos preparar en vasos grandes dos baños de hielo picado. Usar estos baños para enfriar todos los reactivos, material de vidrio y las suspensión de cloroplastos final.
2. Pesar 10 g de hojas de espinaca frías, lavadas y secadas con papel de filtro. Cortar las hojas en trozos pequeños con tijeras, descartando las venas grandes y homogeneizar durante 2 minutos en un mortero frío con 10 ml de tampón fosfato 50 mM pH 6.5.
3. Forrar un embudo con una gasa y filtrar el homogenizado. Recoger el filtrado en un tubo de centrífuga frío y descartar el residuo.

4. Centrifugar el filtrado durante 5 minutos a 250 *x g*. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado de cloroplastos con 10 ml de tampón frío y centrifugar en las mismas condiciones. Descartar de nuevo el sobrenadante y lavar otra vez el precipitado con 10 ml de tampón para centrifugar posteriormente la suspensión, descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 5 de tampón fosfato 50 mM. Mientras se agita la suspensión debe procurarse que el recipiente esté inmerso en el baño de hielo.

## B. Reacción de Hill.

Bajo luz de laboratorio débil, pipetead cada uno de los componentes de la tabla, añadir en último lugar la suspensión de cloroplastos a cada tubo y mezclar por inversión.

| | **Nº del tubo** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** |
| **Tampón fosfato** | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml |
| **2,6-DCPI** | -- | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml |
| **$H_2O$** | 5 ml | - | - | - | - |
| **Atrazina** | - | - | - | - | 0.1 ml |
| **Cloroplastos** | 0.5 ml | 0.5 ml | 0.5 ml | 0.5 ml hervidos | 0.5 ml |
| **Iluminación** | SI | SI | NO | SI | |

Colocad todos los tubos otra vez en el baño (25ºC), encender la luz, situada a 20 cm, e iluminarlos durante 5 minutos.

Transcurridos los 5 minutos filtrar el contenido de cada tubo y medir la absorbancia a 620 nm de cada uno de los tubos, frente a un blanco con agua. Anotar en la tabla las absorbancias. A continuación, restar a las lecturas de densidad óptica obtenidas en cada tubo, el valor de absorbancia del tubo 1.

| **Tubo** | **A620nnm** | **A620 – A620 tubo 1** |
|---|---|---|
| **1** | | |
| **2** | | |
| **3** | | |
| **4** | | |
| **5** | | |

Después de la lectura, añadir al tubo número 3 unos pocos miligramos de ascorbato y observar el cambio de color de la mezcla de reacción y al cabo de 10 minutos medir la absorbancia a 620 nm.

## 5. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Si tenemos en cuenta que el $\varepsilon_{600}$ = 16100 $M^{-1}$ $cm^{-1}$ para el 2,6-DCIP oxidado, calcular:

a) **la velocidad de fotorreducción del 2,6-DCPI** por los tilacoides iluminados, y expresarla en moles $s^{-1}$ $g^{-1}$ PF

b) **la velocidad de fotoreducción del 2,6-DCPI** por los tilacoides iluminados en presencia de atrazina, y expresarla en moles $s^{-1}$ $g^{-1}$ PF

c) **velocidad de transporte electrónico** en los tilacoides bajo estas condiciones teniendo en cuenta que la estequiometría de la reacción de fotorreducción del 2,6-DCPI es

$$\mathbf{2,6\text{-}DCPI_{ox} + 2\ e^- \rightarrow 2,6\text{-}DCPI_{red}}$$

Expresarlo en mol $e^-$ $s^{-1}$ $g^{-1}$ PF

d) **velocidad de generación de oxígeno,** teniendo en cuenta que los electrones provienen del agua

e) **Compara la velocidad de fotorreducción del 2,6-DCPI** por los tilacoides iluminados y los que están en presencia de la atrazina. Explica el efecto de la atrazina.

## 6. BIBLIOGRAFÍA


Azcón-Bieto J, Talón M. (2000). Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill Interamericana. Madrid

Machills L, Torrey JG (1956). Plants in Action. W. H. Freeman and Company. San Francisco

Reiss C (1990). Experiments in Plant Physiology. Prentice-Hall, Inc.

Sánchez m, Aparicio P, Peña JI (1980). Prácticas de Fisiología Vegetal. Ediciones de la Universidad de Navarra S. A. Pamplona

Witham FH., Blaydes DF, Devlin RM (1971). Experiments in Plant Physiology. Van Nostrand Reinhold Co. New York