

Nota: los estudiantes se dividirán en cuatro grupos, y cada grupo realizará todas las actividades

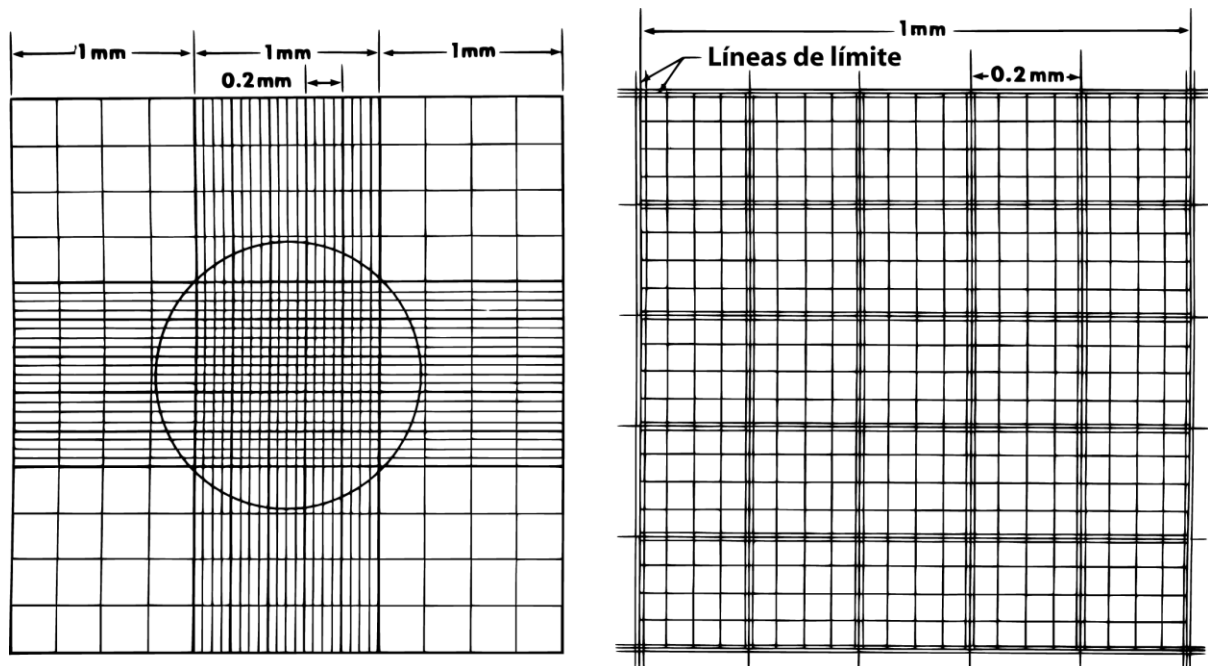
Parte A. Fraccionamiento subcelular de cloroplastos

Obtención de una fracción subcelular enriquecida en cloroplastos

- 1.- Colocar el mortero en hielo.
- 2.- Cortar las hojas descartando las ramas principales de tejido vascular (para esto es mejor tomar las hojas por el envés).
- 3.- Triturar en mortero con 10 mL de buffer Tris-HCl/NaCl.
- 4.- Filtrar en gasa.
- 5.- Centrifugar a 400 xg (50%) a 4 °C por 1 min.
- 6.- Centrifugar el sobrenadante a 1000 xg (90%) a 4 °C por 5 min.
- 7.- Resuspender el pellet con 10 mL de buffer.

Determinación de la concentración de cloroplastos en una suspensión

- 1.- Colocar en un tubo de ensayo 4,75 mL de buffer y agregar 0,25 mL de la fracción enriquecida en cloroplastos. Mezclar bien para asegurarse que los cloroplastos están en suspensión.
- 2.- Tomar un hemocitómetro o cámara de Neubauer limpio y seco y colocar el cubreobjetos. Tomar una pequeña porción de la suspensión del tubo con una pipeta Pasteur de punta fina y cargar el hemocitómetro dejando que la gota de la punta de la pipeta se deslice entre porta y cubre por capilaridad, cuidando que no se sobrecargue y fluya hacia el espacio entre el cubre y los surcos a los lados de la cámara. Si esto ocurriera, limpiar y secar la cámara y finalmente limpiar con un pañuelo de papel con alcohol y volver a comenzar. El volumen de conteo es de 0,1µL.
- 3.- Utilizando el objetivo de 40X, contar el número de cloroplastos en el cuadrado central de la cámara de conteo (el que está separado por un borde triple y que está dividido en 20 grupos de 16 cuadraditos (ver figura).



Esquema de la grilla del hemocitómetro o cámara de conteo.

4.- Calcular la concentración de cloroplastos en la suspensión diluida (se contaron cloroplastos en 10^{-4} mL, así que multiplicando el número por 10^4 se obtiene el número de cloroplastos/mL).

[cloroplastos]_d =

5.- Calcular la concentración de cloroplastos en la suspensión concentrada (fracción).

[cloroplastos]_c =

Parte B: Reacción de Hill

1.- Rotular 6 tubos y preparar según el cuadro:

Tubo	Buffer pH 7,2 Tris 0,02M NaCl 0,35M	DCPIP* 4×10^{-4} M	DCMU** 2×10^{-4} M	Agua
1	3,5 mL	0,5 mL	-	0,5 mL
2	3,5 mL	0,5 mL	-	0,5 mL
3	3,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	-
B (x3)	3,5 mL	-	-	1 mL

2.- Ajustar la longitud de onda del espectrofotómetro a 600 nm

3.- Agregar 0,5 mL de la suspensión de cloroplastos al tubo B, tapar y agitar. Ajustar el espectrofotómetro a 0. Si no fuera posible porque el tubo B queda muy coloreado, agregue 0,3 mL al segundo tubo B. Si aún así no fuera posible, utilizar 0,2 – 0,15 mL en el tercer tubo B. Envolver el tubo 1 en papel aluminio, agregar la misma cantidad de cloroplastos que al blanco, agitar y medir inmediatamente la absorbancia. Este tubo oficiará de control no iluminado.

4.- La reacción se desencadena al agregar los cloroplastos y con la exposición a la luz. Agregar la fracción al tubo 2, mezclar rápidamente y medir inmediatamente. Hacer lo mismo con el tubo 3. Seguir la reacción midiendo Absorbancia a intervalos de 1 min. Mantener, entre medidas, los tubos bien iluminados y en agitación manualmente. Completar el cuadro siguiente.

min tubo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1			-	-	-	-	-	-	-	-	
2											
3											

* DCPIP: Aceptor artificial de electrones

** DCMU: Inhibidor, bloquea el transporte de electrones y la fotofosforilación.

El herbicida DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) inhibe la fotosíntesis al bloquear el sitio de unión de la plastoquinona al fotosistema II.

5.- Represente los valores obtenidos en una gráfica de absorbancia (Abs) en función del tiempo.

Abs



Tiempo (minutos)

6.- Discusión

i) ¿Es necesaria la luz para que ocurra la reacción de Hill? Justifique su respuesta.

ii) ¿Cuáles dos tubos elegiría para fundamentar su respuesta? Justifique brevemente su elección.

iii) ¿Cuál es el efecto del herbicida (DCMU) y cómo lo correlaciona con la curva obtenida experimentalmente?

iii. Si la medición de la absorbancia a tiempo cero se demora unos 30 segundos desde que se colocan los cloroplastos en los tubos 1 y 2 hasta que se realiza la lectura en el espectrofotómetro: ¿esperaría obtener una diferencia notoria entre las absorbancias de estos tubos con respecto al tubo 3? Justifique brevemente.

iv. Observando las micrografías electrónicas:

Mida la longitud de un cloroplasto.....

Mida el espesor de un granum.....

Parte D: Análisis y discusión de resultados experimentales publicados en artículos científicos.

El material será proporcionado por el docente en la clase práctica.
