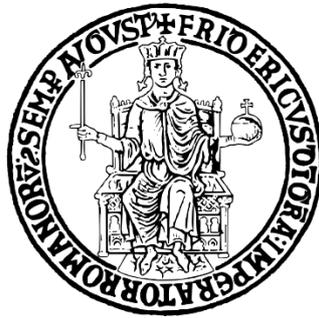


**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO  
II" CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA**

**Corso di Fisiologia Vegetale e  
Laboratorio  
(II Semestre – III anno)**



**LABORATORIO DI FISILOGIA VEGETALE**

**Prof. Landi 1° gruppo  
Prof.ssa Carfagna 2° gruppo  
Prof.ssa Salbitani 3° gruppo**

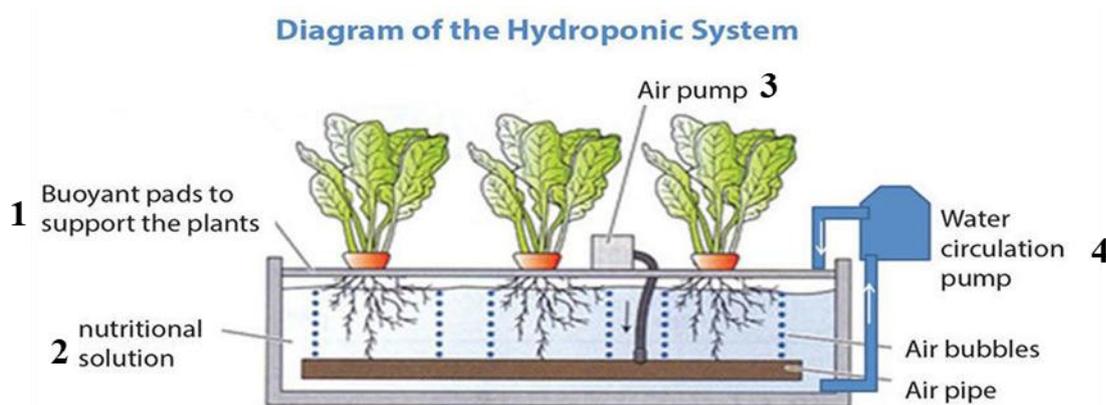
**Dipartimento di Biologia  
Complesso Universitario di Monte Sant'Angelo  
Lab Bio01 Edificio 07**

## Analisi del contenuto proteico, pigmentario e dell'attività fotosintetica in piantine di *Spinacia oleracea* coltivate in differenti condizioni sperimentali

Piantine di spinacio (*Spinacia oleracea*) vengono cresciute in colture idroponica per 10 giorni in tre differenti condizioni sperimentali:

1. Controllo (condizioni ottimali)
2. -N (assenza di azoto nel mezzo di coltura)
3. Buio (completa assenza di luce)

L'**idroponica** è una tecnica di coltivazione che permette la crescita delle piante senza l'uso del suolo, utilizzando una soluzione nutritiva acquosa contenente tutti gli elementi essenziali per lo sviluppo vegetale. Questo metodo è sempre più diffuso per la sua efficienza nell'uso delle risorse e la possibilità di coltivare in ambienti controllati.



Una coltura idroponica è composta da vari elementi fondamentali:

- 1. Sistema di supporto per le piante:** Si utilizzano substrati inerti come argilla espansa, lana di roccia, fibra di cocco o perlite, oppure le radici possono essere lasciate libere nell'acqua.
- 2. Soluzione nutritiva:** Il mezzo di coltura deve contenere tutti i nutrienti essenziali (macro e microelementi) per la crescita delle piante. Questa soluzione viene preparata e mantenuta costante in base alle esigenze specifiche delle colture.
- 3. Aerazione e ossigenazione:** Per garantire l'ossigenazione del mezzo di coltura e dell'apparato radicale, vengono utilizzate pompe d'aria e diffusori.
- 4. Sistema di ricircolo dell'acqua:** Nei sistemi idroponici a ricircolo, l'acqua viene continuamente filtrata e riutilizzata, riducendo gli sprechi. Questo sistema è più sostenibile ma richiede un controllo costante per evitare accumuli di sali o contaminazioni.

Nel corso dell'attività di laboratorio nelle piante coltivate nelle tre condizioni sperimentali vengono comparati il contenuto di proteine, pigmenti, e l'attività fotosintetica.

## Protocollo sperimentale

### Estrazione ed elettroforesi di proteine vegetali

#### Base teorica

L'elettroforesi SDS-PAGE è una tecnica utilizzata per separare le proteine in base al loro peso molecolare e la corsa elettroforetica viene condotta su un gel di poliacrilammide in presenza di un detergente anionico, il sodio dodecilsolfato (SDS). L'SDS rompe i legami non covalenti delle proteine denaturandole e conferendo loro una carica netta negativa. Il tampone con cui si preparano i campioni per l'elettroforesi contiene anche il  $\beta$ -Mercaptoetanololo, un agente riducente che contribuisce alla separazione delle proteine rompendo i ponti disolfuro inter- ed intra-catena. L'SDS determina la dissociazione delle proteine multimeriche nelle loro subunità che a loro volta perdono la conformazione secondaria così che le catene polipeptidiche sono forzate in conformazioni estese con carica simile. Il trattamento elimina le differenze di forma e carica; quindi, la massa è il principale determinante della velocità di migrazione.

I gel vengono polimerizzati in supporti verticali che permettono di ottenere gel di dimensioni 8.5cm x 6.5cm con spessore di 1 mm. Il gel di poliacrilammide è discontinuo, ovvero formato da due gel stratificati l'uno sull'altro. La parte superiore (stacking gel) ha una concentrazione di poliacrilammide del 4% (p/v) e un pH di 6.8. La bassa concentrazione del polimero ha la funzione di concentrare in una banda molto sottile il campione, uniformando così il punto di partenza della corsa elettroforetica per tutte le proteine. La parte inferiore, definita "running gel" (gel di corsa o di separazione) ha un pH di 8.8 e presenta poliacrilammide al 10% (p/v). Il running gel rende possibile la separazione dei campioni in funzione del loro peso molecolare.

**Running gel:** per la realizzazione del running gel è utilizzata una soluzione di poliacrilammide al 10%. Per la polimerizzazione di 5 mL di running gel sono aggiunti 5 $\mu$ L di TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiammina, catalizzatore della reazione di polimerizzazione) e 50  $\mu$ L di ammonio persolfato 10 mg/mL (APS, iniziatore della reazione di polimerizzazione) (Tabella 1).

Running Gel 10%	
H <sub>2</sub> O Deionizzata	4.01 mL
Tris HCl 1.5 M, pH 8.8	2.50 mL
Acrilammide 30%	3.34 mL

SDS 10%	100 $\mu$ L
APS 10%	50 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L

**Tabella 1: Composizione del running gel 10% nella preparazione del gel di poliacrilammide.**

Stacking gel: la soluzione costituente lo stacking gel ha una concentrazione inferiore di poliacrilammide (4%) rispetto al running gel ed è proprio l'utilizzo di basse percentuali di acrilammide a consentire la formazione di maglie più larghe che consentono la collocazione dei campioni proteici su una stessa linea di partenza e la creazione dello spazio in cui caricarli. Per la polimerizzazione dello stacking gel (2.5 mL) sono aggiunti 5  $\mu$ L di TEMED e 18.5  $\mu$ L di APS 10 mg/mL (Tabella 2).

Stacking Gel 4%	
H <sub>2</sub> O Deionizzata	2.258 mL
Tris HCl 0.5 M, pH 6.8	945 $\mu$ L
Acilammide 30%	501 $\mu$ L
SDS 10%	37.5 $\mu$ L
APS 10%	18.5 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L

**Tabella 2: Composizione dello stacking gel 4% nella preparazione del gel di poliacrilammide.**

I campioni da analizzare vengono denaturati per 10 minuti a 100 °C in 20 $\mu$ L di soluzione denaturante 5X contenente BBF (Blu di Bromofenolo, 1.6 mg per 16 mL di soluzione) +  $\beta$ -mercaptoetanol 0.8 mL per 16 mL di soluzione. L'elettroforesi denaturante viene eseguita a 180 V/ 40 mA/ 10 W (BIO-RAD MiniProtean Tetra System), utilizzando un opportuno tampone di corsa (Tabella 3):

Tampone di corsa 5X	
TRIS	30.28 g
Glicina	144.10 g
SDS	10 g
Acqua distillata	2 L

Tabella 3: Composizione del tampone di corsa 5X.

Applicando un campo elettrico a corrente continua, avviene la migrazione delle proteine che, nel caso dell' SDS-PAGE, si muoveranno verso l'elettrodo positivo in quanto dotate di carica negativa. Al termine della corsa, le proteine saranno visualizzate mediante colorazione con Blue Coomassie (0.025% Coomassie Brilliant Blue, 10% acido acetico e 40% metanolo) per 1h seguita da decolorazione utilizzando la Destaining Solution contenente 30% di etanolo e 10% di acido acetico fino a visualizzazione delle bande.

In particolare, nel profilo proteico ottenuto da foglie di piante sarà possibile osservare chiaramente la presenza della RuBisCO (Ribuloso-1,5-bisfosfato carbossilasi/ossigenasi). Questo è un enzima chiave nella fotosintesi, responsabile della fissazione del carbonio nel ciclo di Calvin. È una delle proteine più abbondanti nei tessuti vegetali, in particolare nelle foglie, e si trova nei cloroplasti. La RuBisCO è una delle proteine più abbondanti sulla Terra e rappresenta circa il 50% delle proteine solubili nelle foglie di piante superiori. Presenta una massa molecolare di circa 550 kDa. Nelle piante superiori e nelle alghe verdi, ha una struttura L8S8, composta da: 8 subunità grandi (L, ~55 kDa ciascuna), codificate dal gene *rbcL* presente nel genoma plastidiale (cloroplasti); 8 subunità piccole (S, ~14 kDa ciascuna), codificate dal gene *rbcS* situato nel nucleo cellulare. La sintesi della RuBisCO richiede quindi un coordinamento tra il genoma plastidiale e quello nucleare.

Il tessuto vegetale (circa 1 gr di foglia) sarà prima macinato in un mortaio in presenza di un tampone di estrazione, seguito dalla rimozione dei detriti mediante filtrazione con garza e infine l'estratto ottenuto sarà centrifugato. La frazione solubile (il surnatante) contenente le varie proteine e quindi anche l'enzima RuBisCO sarà successivamente analizzata tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE).

## Estrazione delle proteine

**Materiale:** rack (supporto in plastica), eppendorf da 2 mL (in n° sufficiente per i campioni da analizzare); tampone di estrazione; forbici; pinzette; sabbia di quarzo; garza; mortai e pestelli.

### Procedimento

Preparare n° eppendorf da 2mL, contrassegnando sul tappino il nome dei campioni. Prelevare 1-2 gr di tessuto fogliare (es. foglie di spinacio), avendo cura di eliminare le principali nervature. Tagliarlo in pezzi piccoli e metterlo in un mortaio. Aggiungere un cucchiaino di sabbia di quarzo lavata. Aggiungere tampone di estrazione. Filtrare l'estratto con 4 strati di garza e metterlo in una provetta/eppendorf. Centrifugare per 20 min max giri a 1300 rpm (4°C). La centrifugazione consente di separare sostanze a diversa densità per mezzo della forza centrifuga. La parte più densa dell'estratto si deposita sul fondo delle provette (**pellet**), mentre la parte meno densa rimane sopra (**surnatante**). Prelevare il surnatante alla fine della centrifugazione.

### Quantificazione delle proteine mediante saggio di Bradford

Il test di Bradford è un metodo colorimetrico usato per determinare il contenuto proteico in una soluzione. La soluzione viene colorata con il reattivo di Bradford e ne viene misurato l'assorbimento a 595 nm.

**Materiale:** rack (supporto in plastica), eppendorf da 2 mL (in n° sufficiente per i campioni da analizzare); reattivo di Bradford, pipette.

**Procedimento:** Una volta terminata la centrifugazione, prelevare con la p1000 il surnatante avendo cura di non prendere anche il pellet e metterlo in nuove eppendorf. Preparare le cuvette per la lettura allo spettrofotometro in accordo con la seguente tabella.

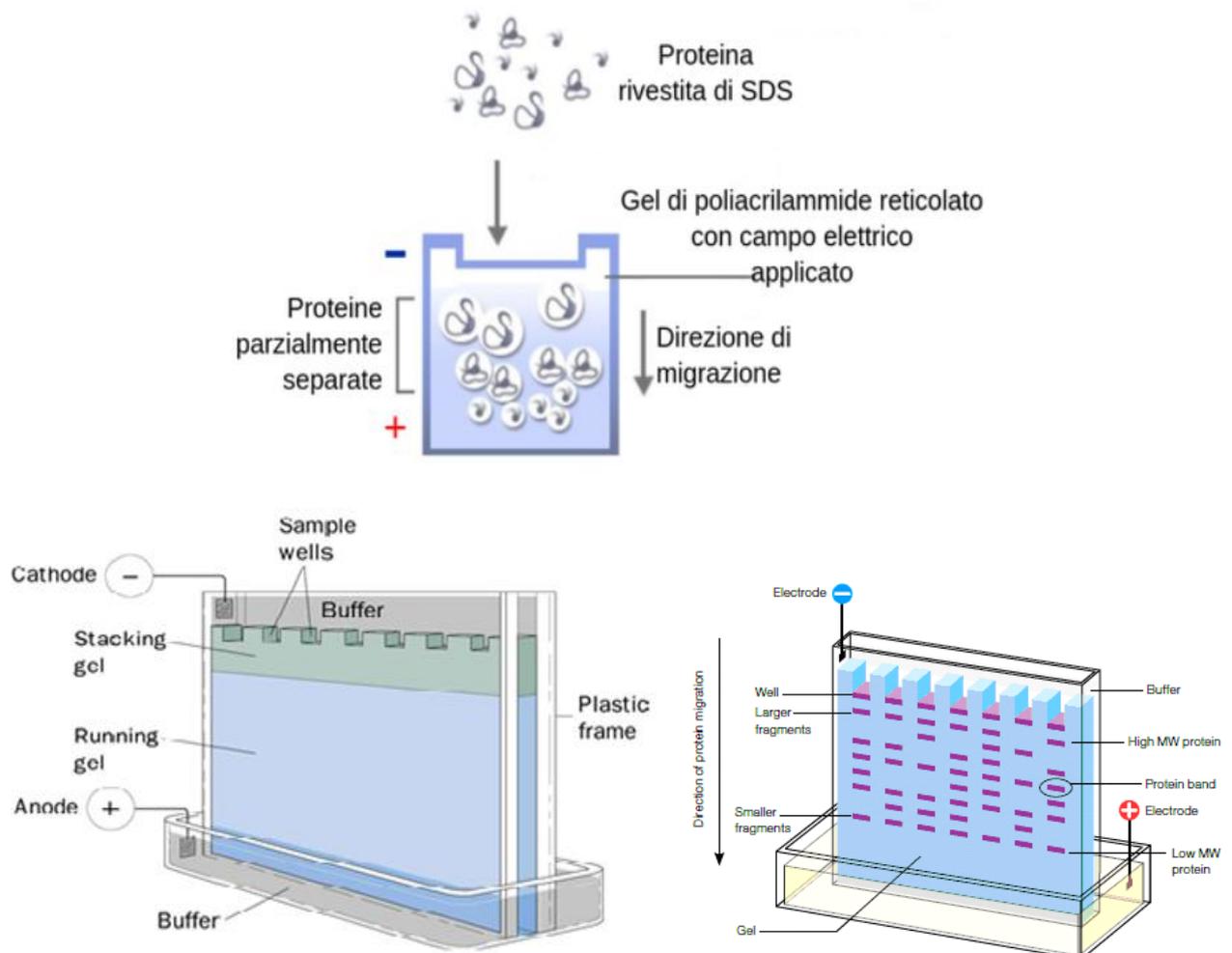
	Bianco	Cuvetta 1	Cuvetta 2	Cuvetta 3
<b>Bradford solution</b>	1000 µL	995 µL	990 µL	980 µL
<b>Estratto</b>	-	5 µL	10 µL	20 µL

Le cuvette così preparate verranno lette allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 595 nm.

## Preparazione del gel per elettroforesi

**Materiale:** vetrini per elettroforesi posteriori e anteriori, castello per il montaggio dei vetri, pettini, elettrodo, vaschetta per la corsa, alimentatore di corrente.

**Procedimento:** lavare i vetrini con acqua distillata, sovrapporre il vetrino piccolo sul vetrino grande, inserirli insieme nel *casting frame*, chiudere le ali verdi verso l'esterno, bloccare la pinza superiore. Il gel di poliacrilammide è composto da due fasi: lo stacking gel e il running gel. Il primo, posto nella parte superiore, rappresenta la porzione di gel all'interno del quale vengono realizzati i pozzetti di caricamento; inoltre consente di "impaccare" tutto il materiale caricato in modo che arrivi uniformemente sul fronte di corsa. Il secondo invece è la porzione di gel dove avviene la vera e propria corsa elettroforetica che consente di separare il campione di interesse in base alle sue dimensioni. Stacking gel e running gel hanno composizione uguale ma presentano una differente concentrazione di acrilammide.



## Estrazione e misura dei pigmenti

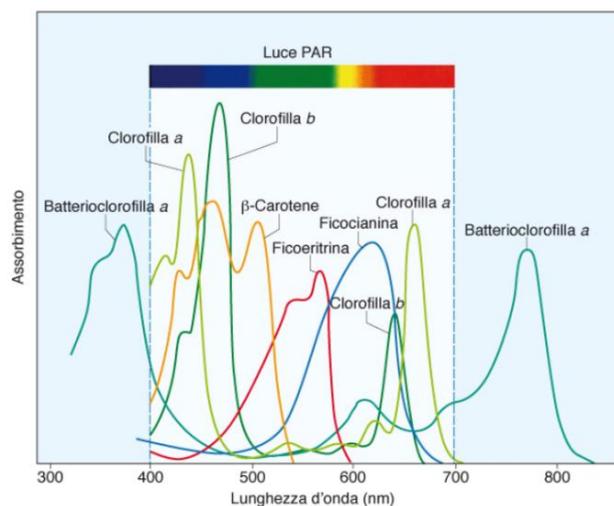
### Base teorica

Le piante contengono diversi pigmenti fotosintetici liposolubili (apolari), tra cui le clorofille e i carotenoidi, che vengono estratti utilizzando solventi organici apolari. Questi pigmenti sono funzionalmente localizzati all'interno delle membrane tilacoidali, dove sono strettamente associati ai due fotosistemi. Per questo motivo, presentano caratteristiche prevalentemente lipofile.

I carotenoidi sono fortemente idrofobi, mentre le clorofille, pur possedendo un anello tetrapirrolico di natura polare, sono dotate di una lunga catena idrofobica, il fitolo, che ne consente l'ancoraggio alla membrana tilacoidale.

Ogni pigmento assorbe l'energia luminosa in base all'energia dei fotoni, ovvero a specifiche lunghezze d'onda dello spettro luminoso. Misurando l'assorbanza di un campione contenente un pigmento solubilizzato e isolato dagli altri in funzione della lunghezza d'onda, è possibile ottenere il suo spettro di assorbimento. Questo spettro, caratteristico per ogni pigmento, presenta uno o più picchi di assorbimento. Nella tabella sono riportati i massimi di assorbimento dei principali pigmenti fotosintetici.

Tipo di pigmento	massimi ass. (nm)
<i>Clorofille</i>	
clorofilla a	420, 663
clorofilla b	435, 645
clorofilla c	445, 625
clorofilla d	450, 690
<i>Carotenoidi</i>	
$\beta$ -carotene	425, 450, 480
$\alpha$ -carotene	420, 440, 470
luteina	425, 445, 475
violaxantina	425, 450, 475
fucoxantina	425, 450, 465
<i>Ficobiline</i>	
ficoeritrina	460, 526, 566
ficocianina	598
alloficocianina	650



## Protocollo sperimentale

**Materiale:** rack (supporto in plastica), eppendorf da 2 mL (in n° sufficiente per i campioni da analizzare); acetone 80%; forbici; pinzette; sabbia di quarzo; garza; mortai e pestelli.

### Procedimento

Omogenare circa 1 g di materiale vegetale con una aliquota di sabbia e 4 mL di acetone 80%.

Filtrare l'estratto con 4 strati di garza e metterlo in una provetta. L'estratto ottenuto viene misurato tal quale, contro un bianco (acetone 80%), allo spettrofotometro. La lettura allo spettrofotometro viene eseguita con cuvette di vetro alle seguenti lunghezze d'onda:

- 663 nm (clorofilla a)
- 648 nm (clorofilla b)
- 470 nm (carotenoidi)

Calcolo (valido solo per acetone 80%)

$$1) \text{ Chl a} = 12.25 \times \text{ABS663} - 2.55 \times \text{ABS648} \text{ (}\mu\text{g/mL)}$$

$$2) \text{ Chl b} = 20.31 \times \text{ABS648} - 4.91 \times \text{ABS663} \text{ (}\mu\text{g/mL)}$$

$$3) \text{ Chl a+b} = 17.76 \times \text{ABS648} + 7.34 \times \text{ABS663} \text{ (}\mu\text{g/mL)}$$

$$4) \text{ Car} = (1000 \times \text{ABS470} - 1.82 \times [\text{Chl a}] - 85.02 \times [\text{Chl b}]) / 198 \text{ (}\mu\text{g/mL)}$$

Confrontare i risultati ottenuti dalle piante cresciute nelle tre condizioni sperimentali.

## Misura in vivo del contenuto di clorofille totali attraverso lo SPAD



### Base teorica

Lo SPAD (Soil and Plant Analysis Development) è uno strumento portatile utilizzato per stimare il contenuto di clorofilla nelle foglie in modo rapido e non distruttivo. Il suo funzionamento si basa sulla trasmissione differenziale della luce attraverso il tessuto fogliare, sfruttando il principio per cui la clorofilla assorbe selettivamente alcune lunghezze d'onda dello spettro elettromagnetico. In particolare, assorbe fortemente la luce rossa intorno ai 650 nm, mentre lascia passare quasi indisturbata la luce nel vicino infrarosso, intorno ai 940 nm. Lo SPAD emette quindi luce a queste due lunghezze d'onda e misura la quantità che attraversa la foglia, confrontando i valori per stimare indirettamente la concentrazione di clorofilla.

Il valore fornito dallo strumento non è una misura diretta della quantità di clorofilla presente, ma un indice relativo che aumenta all'aumentare della concentrazione di questo pigmento. In generale, valori SPAD elevati indicano foglie con un alto contenuto di clorofilla, spesso associate a un buono stato nutrizionale e a un'efficiente attività fotosintetica, mentre valori più bassi possono suggerire carenze nutrizionali, stress ambientali o senescenza fogliare. Per questo motivo, lo SPAD è ampiamente utilizzato in agronomia per monitorare la salute delle colture, ottimizzare la fertilizzazione, in particolare l'apporto di azoto, e valutare lo stato fisiologico delle piante nel tempo.

### Procedimento

Accendere il dispositivo SPAD ed effettuare la calibrazione su un'area priva di pigmenti.

Selezionare foglie rappresentative della pianta, preferibilmente quelle completamente espanse e in buono stato fisiologico. Evitare foglie troppo giovani o senescenti, poiché potrebbero influenzare

le letture. Aprire la pinza dello SPAD e inserire delicatamente la foglia tra i due sensori ottici. È importante posizionare sempre la foglia nella stessa regione (ad esempio, lungo la nervatura centrale o in un'area specifica della lamina fogliare) per ottenere misurazioni coerenti. Chiudere la pinza dello SPAD e attendere qualche secondo fino alla stabilizzazione del valore. Il dispositivo fornirà una lettura numerica corrispondente all'indice SPAD.

Confrontare i risultati ottenuti nelle tre condizioni.

***Tabella comparativa per le tre condizioni di crescita***

	<b><i>Controllo</i></b>	<b><i>-N</i></b>	<b><i>Buio</i></b>
<b><i>Clorofilla a</i></b> ( $\mu\text{g/mL}$ )			
<b><i>Clorofilla b</i></b> ( $\mu\text{g/mL}$ )			
<b><i>Carotenoidi</i></b> ( $\mu\text{g/mL}$ )			
<b><i>SPAD unit</i></b>			
<b><i>Proteine</i></b> ( $\text{mg/mL}$ )			