



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN.

CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA
CURRICULUM BIOLOGIA GENERALE

ELABORATO DI LAUREA

Analisi ossigrafica dell'emissione fotosintetica di ossigeno in piante superiori.

TUTOR: Prof.ssa Nicoletta Rascio
Dipartimento di Biologia

Laureando: Simone Sello

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

INDICE

	Pagina
1 INTRODUZIONE	1
1.1 Cloroplasti	1
1.2 Pigmenti fotosintetici	3
1.2.1 Clorofille	3
1.2.2 Carotenoidi	3
1.3 Piante eliofile e sciafile	4
2 SCOPO DELL'ELABORATO	5
3 MATERIALI E METODI	5
3.1 Piante utilizzate	5
3.2 Analisi ossigrafica degli scambi di ossigeno tra foglia e ambiente	5
3.2.1 Come funziona l'elettrodo di Clark	6
3.2.2 Procedura sperimentale	7
3.3 Analisi dei pigmenti fotosintetici	9
3.4 Analisi morfologica delle foglie	10
3.5 Analisi statistica dei dati	10
4 RISULTATI E DISCUSSIONE	10
4.1 Organizzazione della lamina fogliare	10
4.2 Pigmenti fotosintetici	11
4.3 Emissione di ossigeno	12
5 CONCLUSIONI	12
6 BIBLIOGRAFIA	13
DOCUMENTAZIONE DEI DATI SPERIMENTALI	15

1 INTRODUZIONE

1.1 Cloroplasti

La fotosintesi è il processo con cui gli organismi vegetali convertono l'energia solare in energia chimica utilizzata per la sintesi di composti organici altamente energetici e in prevalenza per la produzione di zuccheri mediante fissazione e riduzione della CO₂.

Negli eucarioti fotosintetici la fotosintesi viene condotta da organelli cellulari chiamati cloroplasti (Fig. A).

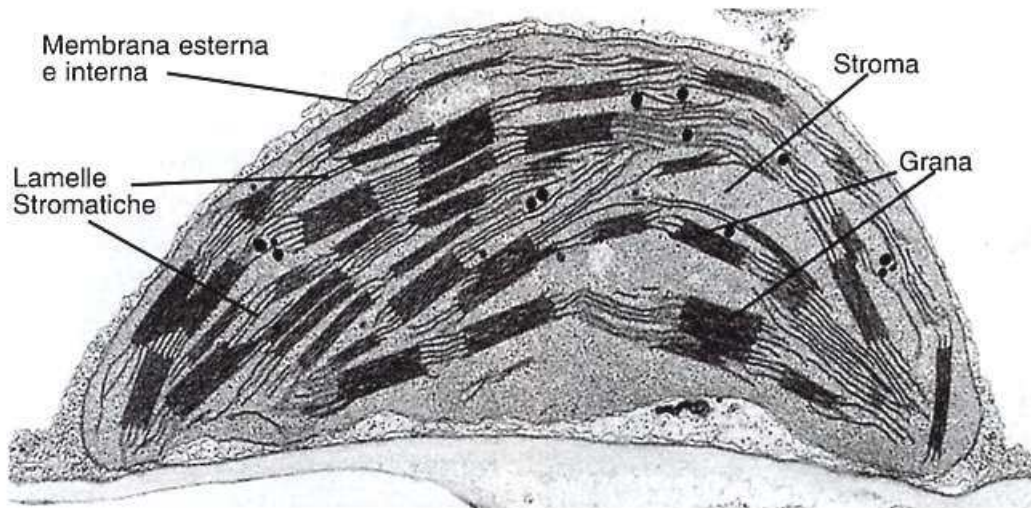


Figura A: micrografia al microscopio elettronico a trasmissione mostrante l'organizzazione ultrastrutturale del cloroplasto (fonte:Pupillo et al., 2003)

Essi sono delimitati da una doppia membrana chiamata "envelope". All'interno degli organelli è presente un esteso sistema di membrane definito sistema tilacoideale. Il sistema tilacoideale è organizzato in tilacoidi che sono cisterne appiattite delimitate da membrane lamellari (membrane tilacoideali) intercomunicanti tra loro. I tilacoidi possono correre singolarmente nello stroma (tilacoidi stromatici) o sovrapporsi gli uni sugli altri a formare i cosiddetti grana (tilacoidi granali).

Tutti i tilacoidi sono in continuità tra loro e costituiscono un ambiente membranale chiuso, senza possibilità di comunicazione tra il lume intratilacoidale e lo stroma (Taiz & Zeiger, 2002).

A livello delle membrane dei tilacoidi (Fig. B) sono inseriti i complessi funzionali in grado di condurre il trasporto di elettroni della fase luminosa della fotosintesi, denominati fotosistema II (PSII), complesso dei citocromi b_6/f e fotosistema I (PSI) (Nugent, 1996).

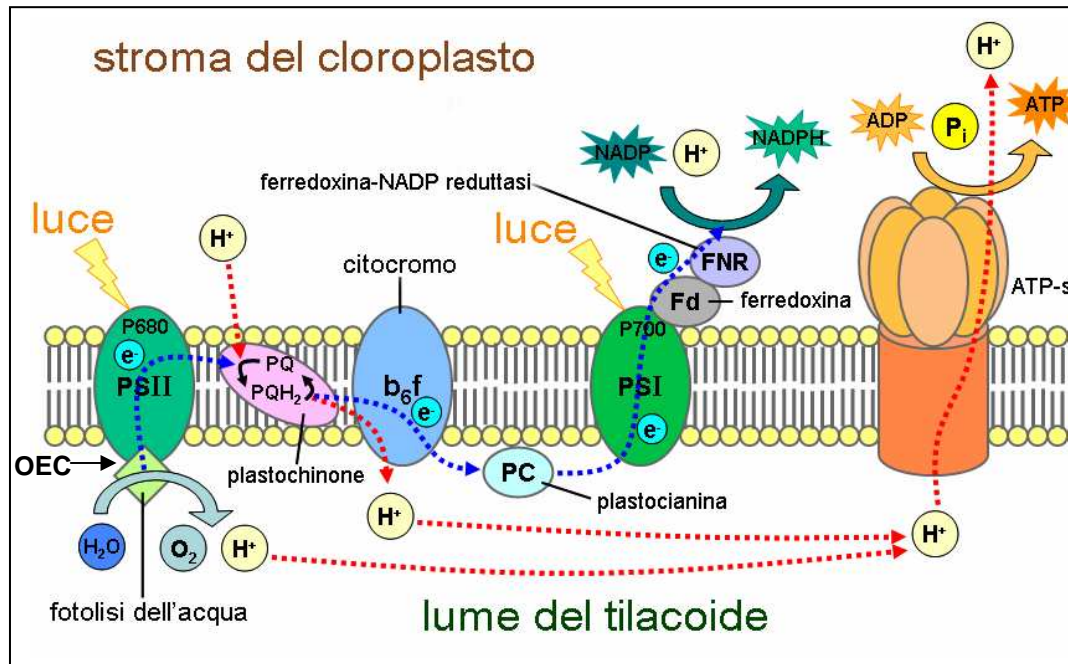


Figura B: catena di trasporto fotosintetica degli elettroni nella membrana tilacoidale (fonte: wikipedia.org)

I fotosistemi sono complessi multiproteici che legano i pigmenti (clorofille e carotenoidi) capaci di catturare e assorbire l'energia luminosa. Entrambi i fotosistemi sono caratterizzati da un centro di reazione costituito da proteine che legano la forma di clorofilla *a* fotochimicamente attiva, in grado cioè di cedere elettroni in seguito all'assorbimento di energia luminosa. A tale centro di reazione sono associati diversi complessi pigmento-proteina definiti "complessi antenna" caratterizzati da proteine che legano clorofille e carotenoidi (pigmenti antenna) deputati all'assorbimento di energia luminosa e al suo trasferimento verso i centri di reazione. I due complessi antenna esterni e più abbondanti sono denominati Light Harvesting Complex (LHCI e LHCII rispettivamente per il PSI e per il PSII) (Pullertis et al., 1996). A differenza dei complessi antenna più interni, che contengono solo clorofilla *a*, nell'LHCI e LHCII sono presenti come pigmenti antenna clorofilla *a* e clorofilla *b*.

I fotosistemi sono i "motori" della catena di trasporto degli elettroni, perchè in grado di utilizzare l'energia radiante catturata per svolgere le reazioni "in salita" del percorso che dall' H_2O , donatore iniziale di elettroni, porta al NADP^+ che è l'accettore finale. Per colmare il dislivello energetico che divide la coppia $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ dalla coppia $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, i due fotosistemi lavorano in serie: il PSI è in grado di ridurre il NADP^+ e il PSII ossida l' H_2O (Pupillo et al., 2003).

L'ossidazione dell'acqua avviene nell'OEC (complesso evolvente ossigeno), associato al centro di reazione del PSII, nel quale l'acqua viene ossidata e da come prodotti ioni idrogeno, elettroni e ossigeno molecolare (O_2). Ciò fa definire la fotosintesi condotta dalle piante superiori "fotosintesi ossigenica".

1.2 PIGMENTI FOTOSINTETICI

1.2.1 Clorofille

Le clorofille sono pigmenti metallo porfirinici caratterizzati da un anello tetrapirrolico ciclico con un atomo di magnesio complessato al centro e da un alcol alifatico a lunga catena, il fitolo.

Nelle piante superiori si distinguono due tipi di clorofilla, la clorofilla *a* e la clorofilla *b*, diverse solo per la presenza, rispettivamente, di un gruppo metilico o aldeidico in posizione C_3 del secondo anello pirrolico (Beale, 1999).

Le clorofille assorbono la luce visibile nel rosso e nel blu e partecipano al processo fotosintetico sia come pigmenti antenna che come pigmenti fotochimicamente attivi (solo clorofilla *a*).

1.2.2 Carotenoidi

I carotenoidi sono dei terpeni derivati dall'isoprene, la cui struttura molecolare presenta una porzione centrale lineare con doppi legami coniugati e con le estremità ciclizzate. Per le loro caratteristiche molecolari vengono distinti in due diverse classi: i caroteni idrocarburi e le xantofille che sono forme ossigenate dei primi. Mentre i caroteni sono presenti soprattutto nei centri di reazione, le xantofille si trovano principalmente nei complessi antenna (Siefermann-Harms, 1985).

I carotenoidi assorbono ad una lunghezza d'onda compresa tra i 390 e i 530 nm ampliando così lo spettro di assorbimento della clorofilla. *In vivo* essi sono inseriti nei complessi pigmento-proteina in stretta associazione con le molecole di clorofilla. Possono svolgere per questo motivo il duplice ruolo di pigmenti antenna e di molecole protettive nei confronti di danni fotoossidativi dell'apparato fotosintetico (Young et al., 1997). Le clorofille infatti, pur avendo un ruolo fondamentale per la fotosintesi, possono rappresentare una potenziale causa di

fotoossidazione dei tessuti vegetali; eccessi di energia luminosa portano infatti le clorofille ad uno stato eccitato di tripletto. Da questo stato la clorofilla può cedere la sua energia a molecole di ossigeno che passano ad uno stato di singoletto estremamente reattivo. Clorofille ed ossigeno in queste forme provocano gravi danni fotoossidativi che possono portare alla degradazione di lipidi, di proteine e di acidi nucleici plastidiali.

I carotenoidi sono in grado di de-eccitare le molecole di clorofilla tripletto e di ossigeno singoletto passando lo allo stato di tripletto e dissipando poi l'energia acquisita sotto forma di calore (Demming-Adams & Adams, 1996).

1.3 Piante eliofile e sciafile

In natura esistono piante proprie di ambienti diversi, caratterizzati da differenti livelli di irradiazione.

Le piante eliofile (o piante di sole) sono specie caratteristiche di ambienti assolati, le piante sciafile (o piante di ombra) vivono in ambienti scarsamente illuminati, come il sottobosco.

Il modello morfogenetico dei due tipi di piante è molto diverso. In particolare, le piante sciafile sviluppano foglie molto espanse, che costituiscono la gran parte della massa dell'intero organismo, per l'esigenza di ampliare la superficie di raccolta della luce. Queste foglie inoltre hanno un solo strato a palizzata, infatti gli eventuali strati sottostanti riceverebbero una radiazione insufficiente a sostenere una efficace fotosintesi. Le foglie delle piante eliofile, invece, sono meno espanse e hanno due o più strati di palizzata, per la possibilità della luce radiante di penetrare più in profondità nella foglia. Queste foglie sono anche provviste di più accentuati dispositivi di controllo della traspirazione, perchè ambienti ad alta irradianza sono generalmente più caldi di quelli a bassa irradianza e possono sottoporre le piante a condizioni di stress idrico.

Le differenze fra specie eliofile e sciafile riguardano tutti i livelli dell'apparato fotosintetico, non solo quello istologico. Il parenchima clorofilliano delle piante sciafile contiene un elevato numero di cloroplasti che sono più grossi e più ricchi di clorofille rispetto a quelli delle piante eliofile. Queste ultime, tuttavia, avendo una maggiore quantità di parenchima clorofilliano, hanno un più elevato contenuto in clorofille per unità di superficie fogliare. Infine, nei cloroplasti di piante sciafile sono più abbondanti i sistemi di cattura della luce, visto che per loro è la luce il fattore limitante la fotosintesi. Di conseguenza in questi cloroplasti aumentano le dimensioni dell'LHCI e LHCII. Poichè in questi complessi è presente oltre alla clorofilla *a* anche la clorofilla *b* il rapporto clorofilla *a/b* è più basso nelle piante sciafile rispetto alle eliofile.

2 SCOPO DELL'ELABORATO

Lo scopo del presente elaborato è stato quello di confrontare l'attività fotosintetica di due piante di ambiente diverso attraverso la misurazione della quantità di ossigeno emesso dalle foglie.

Le due piante utilizzate sono state *Salix purpurea* come pianta eliofila e *Atropa belladonna* come pianta sciafila.

L'analisi dell'emissione di ossigeno è stata condotta ossigraficamente su dischetti di tessuto fogliare e la quantità di gas emessa è stata riferita all'unità di peso fresco della foglia, all'unità di superficie e all'unità di pigmenti clorofilliani contenuti in essa.

Allo scopo di valutare la quantità totale di ossigeno fotosintetico emesso dalle foglie delle piante è stato misurato ossigraficamente anche il consumo respiratorio di O₂.

L'organizzazione interna delle foglie delle due piante è stata analizzata al microscopio ottico su sezioni trasversali a fresco.

Le foglie di entrambe le piante sono state raccolte da individui che crescevano nell'Orto Botanico di Padova.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Piante utilizzate

Come è già stato detto le due piante utilizzate per le analisi sono state *Salix purpurea* e *Atropa belladonna*.

Salix purpurea appartiene alla famiglia delle Salicaceae. Comunemente noto come salice rosso, ha l'aspetto di un arbusto alto dai 3 ai 5 metri, dalle foglie strette e allungate (Fig. 1). Cresce in ambiente soleggiato e spesso lungo le rive dei fiumi poiché richiede molta acqua. L'esemplare utilizzato per l'esperienza era esposto alla piena luce solare.

Atropa belladonna appartiene alla famiglia delle Solanaceae. Essendo una pianta che vive generalmente nel sottobosco, presenta un fenotipo con foglie molto grandi ed espanse che compongono la maggior parte della biomassa vegetale (Fig. 2). L'esemplare utilizzato per l'esperienza cresceva in condizioni di più bassa intensità luminosa per l'ombreggiatura prodotta dalla tettoia di una serra.

3.2 Analisi ossigrafica degli scambi di ossigeno tra foglia e ambiente

L'emissione di ossigeno, utilizzata come indice dell'attività fotosintetica, e l'assorbimento di ossigeno, utilizzato come indice dell'attività respiratoria, sono stati misurati utilizzando l'elettrodo di Clark *in vivo* su campioni di pezzetti di

foglie.

Leland C. Clark sviluppò l'elettrodo nel 1957 per poter misurare la concentrazione di ossigeno nel sangue. Successivamente l'elettrodo fu utilizzato per numerose altre applicazioni sia in organismi animali che vegetali.

Nel 1977 Ryuichi Ishii mise a punto un metodo che permette di misurare l'emissione fotosintetica di O₂ alla luce non di cloroplasti isolati, bensì di pezzetti interi di materiale vegetale in sospensione acquosa, il che permette di avere un risultato più verosimile dato che le cellule utilizzate sono intere e formano un tessuto integro.

Questo metodo inoltre è anche molto più rapido rispetto ad altri perché non prevede l'estrazione degli organelli cellulari dal tessuto in esame.

Altrettanto facilmente è possibile misurare il tasso di ossigeno consumato dall'attività respiratoria semplicemente ponendo il campione in condizioni di buio completo.

3.2.1 Come funziona l'elettrodo di Clark

L'elettrodo di Clark prevede l'utilizzo di un principio polarografico, che rileva cioè la corrente che si viene a creare tra due elettrodi a cui è applicata una differenza di potenziale (Jones et al., 1996).

Le tecniche amperometriche permettono infatti di misurare il passaggio di corrente in celle voltammetriche a potenziale prestabilito.

La corrente elettrica di diffusione che si sviluppa nella cella voltammetrica a causa delle reazioni chimiche viene misurata da un microamperometro ed è proporzionale alla concentrazione della specie chimica sotto osservazione.

Il sensore elettrochimico dell'ossigeno è tipicamente un sensore di piccole dimensioni. Esso contiene due elettrodi di materiale diverso completamente immersi in un liquido elettrolita.

Le molecole di ossigeno, diffondendo attraverso una membrana semipermeabile installata sulla base del sensore, si aggregano subito al catodo (+) formando uno ione positivo. Questo successivamente migra verso l'anodo (-) generando un potenziale elettrico. La corrente generata è direttamente proporzionale alla pressione parziale di ossigeno contenuto nel liquido oggetto di misurazione.

In questo modo è sufficiente convertire la corrente letta da un millivoltmetro applicato agli elettrodi per avere una lettura del gas contenuto in soluzione

Questo tipo di ossigrafo è molto utilizzato perché permette una rapida e precisa misura della quantità di ossigeno molecolare in soluzione.

L'elettrodo di Clark è composto da una camera al cui interno sono posti un catodo di platino (Pt), che funge da elettrodo di lavoro, e un anodo di argento (Ag) che funge da elettrodo di riferimento.

Essi sono tenuti in contatto da una goccia di soluzione elettrolita contenente

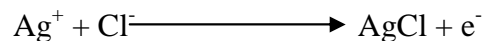
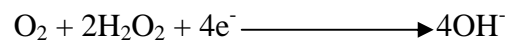
cloruro di potassio (KCl). Gli elettrodi e la soluzione sono separati inferiormente dal mezzo liquido in cui verrà analizzato il contenuto di ossigeno tramite una membrana di Teflon permeabile all'ossigeno. Questa membrana evita che altri componenti chimici reagiscano col catodo e creino un'interferenza.

L'applicazione di una differenza di potenziale di -0,7 volt tra gli elettrodi fa assumere un potenziale negativo al catodo rispetto al controelettrodo.

Sulla superficie dell'elettrodo di lavoro avviene la riduzione dell'ossigeno molecolare a perossido di idrogeno (H_2O_2), che determina un passaggio di corrente. Questo a sua volta viene ridotto a ioni idrossido (OH^-).

I quattro elettroni necessari per la reazione sono forniti dall'ossidazione all'anodo dell'argento metallico a ioni Ag^+ , che si combinano con gli ioni Cl^- per dare cloruro d'argento ($AgCl$).

Le reazioni che avvengono, rispettivamente, al catodo e all'anodo, sono le seguenti:



Quindi la corrente di elettroni generatasi fra l'anodo e il catodo è direttamente proporzionale alla concentrazione di ossigeno al catodo ed è misurabile (Walker, 1997). La variazione di corrente elettrica viene tradotta in variazione di concentrazione di ossigeno ed inviata ad un registratore. Questo provvede a tracciare, su un rotolo di carta che procede a velocità nota, una linea ad andamento proporzionale all'aumento o alla diminuzione di contenuto di ossigeno nella soluzione d'interesse.

Dato che la temperatura e il pH condizionano la quantità di ossigeno prodotto e la concentrazione del gas in soluzione, questi due parametri devono essere di entità nota e costante. Per quanto riguarda il pH, viene utilizzata una soluzione a concentrazione di ioni idrogeno nota. Per quanto riguarda la temperatura invece, la provetta in cui avviene la reazione viene mantenuta a temperatura costante da un bagnetto termostatico.

3.2.2 Procedura sperimentale

L'emissione fotosintetica e il consumo respiratorio di O_2 sono stati misurati su dischetti di tessuti fogliari delle due piante in esame, secondo il metodo di Ishii et al. (1977) utilizzando un ossigrafo (YSI-5331, Spring Instruments) costruito

specificamente per questo tipo di analisi (Figura 3).

In questo strumento l'elettrodo di Clark è racchiuso in un "pistone" il cui diametro combacia con quello interno di una provetta cilindrica in cui avviene la reazione (Fig.3A).

Il medium di sospensione dei campioni di foglie usato per queste analisi era costituito da una soluzione di HEPES (acido N-2-idrossietilpiperazin-N'-etansulfonico) 50 mM pH 7.2 contenente CaSO_4 0.5 mM. Il carbonio organico per la fotosintesi veniva fornito come NaHCO_3 nella concentrazione finale di 20 mM. La liberazione di CO_2 per la fotosintesi si otteneva con l'aggiunta al mezzo di analisi di anidra carbonica (nella concentrazione finale di 33 $\mu\text{g/ml}$).

Prima dell'inizio delle analisi il livello di ossigeno nel medium veniva abbassato mediante l'aggiunta di una piccola quota di ditionito di sodio che si ossidava a ditionato.

La fotosintesi è stata avviata illuminando il campione con la lampada di un proiettore (150 W) (Fig.3B). Regolando la distanza tra la fonte luminosa e l'ambiente di reazione è stata mantenuta l'intensità luminosa attorno ai 3000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$.

Questo valore di intensità, infatti, risultava essere saturante per i campioni analizzati.

Il consumo respiratorio veniva analizzato dopo aver spento la luce e aver coperto l'impianto contenente i campioni con un cappuccio nero. Le variazioni della quantità di ossigeno disciolte nel medium venivano rilevate attraverso un registratore collegato all'ossigrafo (Fig. 3C).

L'analisi ossigrafica è stata condotta su un numero noto di dischetti ottenuti dalle foglie in esame con un foratappi di diametro di 0,6 cm. Successivamente il materiale è stato pesato. L'esperimento prevedeva un peso fresco di circa 0,5 g.

I dischetti sono stati quindi tagliati in più parti con una lametta e i pezzetti di tessuto sono stati inseriti nella provetta di analisi che conteneva 2,9 ml di HEPES e bicarbonato di sodio.

Il tutto è stato messo in agitazione sotto la luce per qualche minuto affinché i cloroplasti si attivassero. Successivamente sono stati aggiunti 100 μl di anidra carbonica (portando così a 3 ml il volume del medium di analisi) e la piccola quantità di ditionito di sodio. Infine è stato inserito l'elettrodo nella provetta di analisi facendo attenzione a far uscire tutta l'aria dalla scanalatura presente su un lato del pistone. È stato così ottenuto l'isolamento completo del mezzo di analisi dall'ambiente aereo.

A questo punto è iniziata la misurazione dell'ossigeno fotosintetico emesso dai pezzetti fogliari alla luce, che è stato rilevato sul rullo di carta del registratore, che avanzava a velocità stabilita e costante.

Dopo aver ottenuto una curva sufficientemente lunga per valutare la produzione di ossigeno fotosintetico, la lampadina del proiettore è stata spenta e l'ossigrafo è

stato coperto con un cappuccio nero, di modo che non passasse luce e venisse registrato solo il consumo respiratorio di O₂. Anche questo processo è stato lasciato continuare per un tempo sufficiente per registrare l'attività respiratoria.

Il calcolo delle µmol di ossigeno sviluppate o consumate per unità di tempo è stato effettuato tenendo conto della velocità di avanzamento della carta del registratore e considerando che alla temperatura di 20 °C in una soluzione satura di O₂, la concentrazione del gas è pari a 0,276 µmol/ml.

Le analisi sono state ripetute su sei diversi campioni per ciascuna pianta, allo scopo di poter effettuare un'analisi statistica.

3.3 Analisi dei pigmenti fotosintetici

Alla fine dell'analisi ossigrafica l'elettrodo è stato estratto dalla provetta di reazione e i pezzetti di foglia sono stati recuperati. Questi sono stati trasferiti in una provetta in cui sono stati aggiunti 2 ml di dimetilformamide (DMF). La DMF è un solvente molto potente che permette di estrarre i pigmenti fotosintetici (clorofille e carotenoidi) senza la necessità di macinare il campione, riducendo così errori nella successiva analisi della quantità di pigmenti (Moran & Porath, 1980).

I campioni sono stati conservati in frigorifero a 4°C per 48 ore affinché avvenisse l'estrazione.

L'analisi dei pigmenti fotosintetici estratti con dimetilformamide dai campioni fogliari è stata condotta con uno spettrofotometro (Beckman Coulter DU 530 UV/VIS spectrophotometer).

Per la clorofilla *a* è stata letta l'assorbanza a 664 nm, per la *b* a 647 nm e per i carotenoidi totali a 480 nm.

Dai valori di assorbanza è stata ricavata la quantità dei pigmenti fotosintetici utilizzando i coefficienti di estinzione (Porra et al., 1989) tramite le seguenti formule (Wellburn, 1994):

- [Chl *a*] : $(12 \cdot A_{664} - 3,11 \cdot A_{647}) V/W$
- [Chl *b*] : $(20,78 \cdot A_{647} - 4,88 A_{664}) V/W$
- [Car] : $[(1000 \cdot A_{480}) - (1,12 \cdot \text{Chl } a) - (34,07 \cdot \text{Chl } b)]/245 V/W$

dove :

A_{664} , A_{647} , A_{480} rappresentano i valori di assorbanza dei pigmenti alle relative lunghezze d'onda;

V rappresenta il volume in ml di dimetilformamide in cui sono disciolti i pigmenti fotosintetici;

W rappresenta il peso fresco del campione di tessuto vegetale espresso in mg.

Le analisi dei pigmenti fotosintetici sono state condotte su ciascuno dei sei

campioni delle due foglie sottoposti all'indagine ossigrafica.

3.4 Analisi morfologica delle foglie

Con lo scopo di definire le differenze morfologiche delle foglie delle due piante scelte, sono state fatte delle sezioni trasversali a mano.

L'osservazione della morfologia cellulare è stata effettuata mediante microscopio ottico Leica DMR. Le foto sono state acquisite da un analizzatore di immagini collegato al microscopio mediante una telecamera digitale. I campioni sono stati osservati in luce visibile.

3.5 Analisi statistica dei dati

Per valutare la significatività delle differenze tra i valori dei parametri misurati nelle foglie delle due diverse piante è stato applicato il t-test (Sheldon, 2003).

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Organizzazione della lamina fogliare

Le sezioni trasversali delle due foglie osservate al microscopio ottico hanno rivelato una diversa organizzazione dei tessuti fotosintetici.

Nella foglia di salice (*Salix purpurea*) (Fig. 4) i tessuti interni erano costituiti da due strati molto compatti di tessuto a palizzata con cellule allungate e ricche di cloroplasti e da più strati di lacunoso, anch'esso molto compatto. Questo tipo di organizzazione è caratteristico delle foglie di sole. Ciò rispecchia il modello morfogenetico delle piante eliofile che hanno più strati di palizzata fotosintetizzante poiché vivono in un ambiente in cui la luce penetra di più nei tessuti. Questo modello permette di sfruttare maggiormente la radiazione luminosa. Nella foglia di atropa (*Atropa belladonna*) (Fig. 5) il tessuto a palizzata era formato da un'unica fila di cellule cilindriche, voluminose ma poco allungate e ricche di cloroplasti. Il lacunoso sottostante aveva cellule più rotondeggianti e con ampi spazi intercellulari.

La presenza di un palizzata monostratificato è tipico delle foglie delle piante sciafile e serve ad ottenere una migliore esposizione alla luce delle cellule fotosintetizzanti.

Lo spessore delle due foglie non era molto diverso nonostante il differente numero di strati cellulari. Ciò era dovuto al fatto che nelle foglie di salice le cellule erano molto più piccole rispetto a quelle di atropa.

4.2 Pigmenti fotosintetici

Dalle analisi dei contenuti di pigmenti fotosintetici nei tessuti fogliari delle due piante è risultato che in salice erano presenti più clorofille totali per grammo di peso fresco rispetto ad atropa (Fig 6a). Ciò dimostrava che nei tessuti fogliari compatti della pianta eliofila si aveva una maggiore concentrazione di cloroplasti. Inoltre nella foglia di salice c'erano anche più clorofille per unità di superficie, per la presenza di tessuti compatti e privi di spazi intercellulari.

Le differenze quantitative rilevate per i pigmenti clorofilliani si ripetevano anche per i carotenoidi che erano presenti in quantità maggiore nella foglia di salice rispetto a quella di atropa (Tab. 1).

Il rapporto carotenoidi/clorofille aveva invece valore simile nelle foglie delle due piante. Questo dato era interessante perchè dimostrava che le foglie di atropa nelle condizioni di illuminazione a cui erano esposte, non mostravano segni di stress da eccesso di luce.

L'incremento della sintesi dei carotenoidi, che porta alla salita del rapporto di questi pigmenti con le clorofille, è infatti un meccanismo che le piante mettono comunemente in atto per fotoprotgersi da un'intensità luminosa eccessiva (Young et al., 1997).

Un'ulteriore dato emerso dalle analisi ha riguardato i rapporti clorofilla *a/b* nelle due piante studiate. Anche in questo caso le differenze fra le foglie di salice ed atropa non erano significative.

Una delle caratteristiche più frequenti e distintive tra foglie di sole e foglie di ombra consiste nel fatto che in queste ultime il rapporto clorofilla *a/b* è più basso. Ciò dipende dall'aumento della dimensione delle antenne periferiche dei fotosistemi adibite alla raccolta della luce, scarsamente disponibile nell'ambiente di crescita. Nella nostra pianta di *Atropa belladonna*, esposta ad un'intensità luminosa ridotta, ma non eccessivamente bassa, questa esigenza non si è presentata. Così la foglia di atropa, pur mantenendo il modello morfogenetico di sviluppo dipendente dal programma genetico della pianta, ha messo in atto meccanismi di modulazione dell'apparato fotosintetico, adattando la dimensione delle antenne esterne dei fotosistemi alle condizioni di illuminazione. In tali condizioni una eccessiva dimensione dei complessi antenna sarebbe stata controproducente esponendo la foglia a danni fotoossidativi a causa della troppo elevata energia radiante assorbita.

4.3 Emissione di ossigeno

Come per i contenuti in pigmenti, anche per l'emissione fotosintetica di ossigeno i valori registrati erano più alti nelle foglie di salice rispetto a quelle di atropa. Ciò sia se l'emissione di ossigeno veniva riferita a peso fresco (Fig. 7a) sia se riferita a unità di superficie (Fig. 7b).

I tessuti fogliari di salice, più compatti e quindi più ricchi di masse citoplasmatiche, inoltre, mostravano un più elevato consumo respiratorio di ossigeno (Fig. 7a,b). Quindi, se alla quantità di ossigeno emessa (sopra il punto di compensazione) si aggiungeva quella consumata con la respirazione, la differenza tra i valori totali di ossigeno fotosintetico nelle due foglie era ancora più accentuata ($169,8 \mu\text{mol O}_2/\text{h/g p.f.}$ e $2,4 \mu\text{mol O}_2/\text{h/cm}^2$ in salice rispetto a $96,8$ e $1,6$, rispettivamente, in atropa).

Se però la produzione di ossigeno veniva riferita ad unità di clorofille (Fig. 8) i valori riscontrati nelle due piante risultavano molto simili. Ciò stava ad indicare che la funzionalità dell'apparato fotosintetico della pianta di ombra e di quella di sole era confrontabile.

Questa era un'ulteriore riprova che le foglie di atropa si erano ben adattate alle condizioni di illuminazione dell'ambiente di crescita e che l'intensità luminosa a cui la pianta era esposta non era fotoinibitoria.

5 CONCLUSIONI

Il confronto fra le foglie della pianta di sole *Salix purpurea* e della pianta di ombra *Atropa belladonna* ha dimostrato che:

le foglie di salice, morfogeneticamente più piccole, hanno tessuti fotosintetici pluristratificati e più compatti, contenuti in pigmenti fotosintetici più alti e attività fotosintetica e respiratoria più elevata sia a parità di peso fresco che di unità di superficie, rispetto alle foglie di atropa.

Le foglie di atropa, morfogeneticamente molto espanse hanno tessuti fotosintetici meno stratificati e più lassi, quantità più basse di pigmenti e attività fotosintetica e respiratoria più limitate a parità di peso fresco e di unità di superficie.

I valori confrontabili nelle due piante dei rapporti carotenoidi/clorofille e clorofilla *a/b*, così come le velocità simili di emissione di ossigeno fotosintetico riferite ad unità di pigmenti clorofilliani dimostrano che *Atropa belladonna* si è ben adattata alle condizioni di illuminazione, limitate, ma non particolarmente basse dell'ambiente di crescita, mettendo in atto meccanismi di aggiustamento dell'apparato fotosintetico, come una dimensione contenuta delle antenne periferiche dei fotosistemi.

6 BIBLIOGRAFIA

Beale S. I., 1999. Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research*. 60: 43-73.

Demming-Adams B. & Adams III W. W., 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trend in Plant Science*. 1: 21-26.

Ishii R., Yamagishi T.Y., Murata Y., 1977. On a method for measuring photosynthesis and respiration of leaves slices with an oxygen electrode. *Japanese Journal Crop Science*. 46: 53-57.

Jones A., Reed R., Weyers J., 1996. *Laboratorio di biologia*. Casa Editrice Ambrosiana. pp. 269.

Moran R.& Porath D., 1980. Chlorophyll determination in intact tissue using N,N'-dimethylformamide. *Plant Physiology*. 69: 1376-1381.

Nugent J. H. A., 1996. Oxigenic Photosynthesis: electron transfer in photosystem I and photosystem II. *European Journal of Biochemistry*. 237: 519-531.

Porra R. J., Thomson W. A., Kriedermann P. E., 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophylls standards by absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 975: 348-394

Pullertis T. & Sundström V., 1996. Photosynthetic light-harvesting pigment-protein complexes: toward understanding how and why. *Account of Chemical Research*. 29: 381-389.

Pupillo P., Cervone F., Cresti M., Rascio N., 2003. *Biologia vegetale*, Zanichelli. pp. 482.

Sheldon M.R., 2003. *Probabilità e statistica per l'ingegneria e le scienze*,. Apogeo. pp. 624.

Siefermann-Harms D., 1985. Carotenoids in photosynthesis. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochimica et Biophysica Acta*. 811: 325-355.

Taiz L. & Zeiger E., 2002. *Fisiologia vegetale*, seconda edizione. Piccin. pp. 792.

Walker D., 1997. The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. The University of Sheffield Press. pp. 230.

Wellburn A. R., 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Plant Physiology*. 144: 307-313.

Young A. J., Phillip D., Savill J., 1997. Carotenoids in higher plant photosynthesis. In: *Handbook of photosynthesis* (Ed. Pessaraki M.). Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 575-596.

Documentazione dei dati sperimentali



Figura 1: pianta di *Salix purpurea* cresciuta nell'Orto Botanico di Padova



Figura 2: pianta di *Atropa belladonna* cresciuta nell'Orto botanico di Padova



Figura 3A: ossigrafo utilizzato per l'analisi dell'emissione fotosintetica e del consumo respiratorio di ossigeno da tessuti fogliari *in vivo* (YSI-5331, Spring Instruments).
 (a) bagno termostatico per il mantenimento della temperatura di analisi a 20°C; (b) ossigrafo; (c) provette di analisi; (d) elettrodo di Clark; (e) proiettore per il rifornimento di luce per la fotosintesi



Figura 3B: analisi in atto di emissione di O₂ alla luce da pezzetti di tessuto fogliare



Figura 3C: registratore collegato all'ossigrafo per la misurazione delle variazioni di concentrazione di ossigeno nel mezzo di analisi

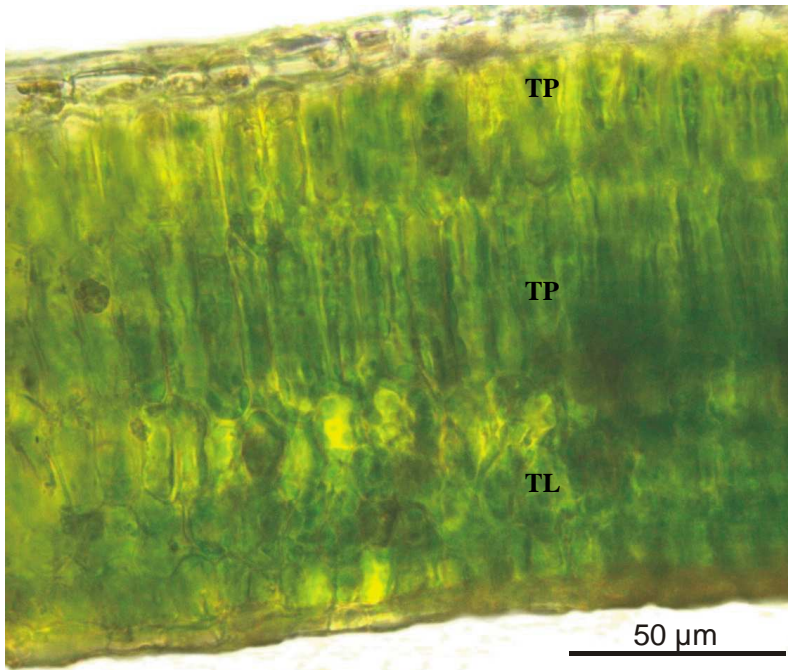


Figura 4: sezione trasversale a fresco di foglia di *Salix purpurea*.
 Notare la compattezza del doppio strato del tessuto a palizzata (TP) e del tessuto lacunoso (TL).

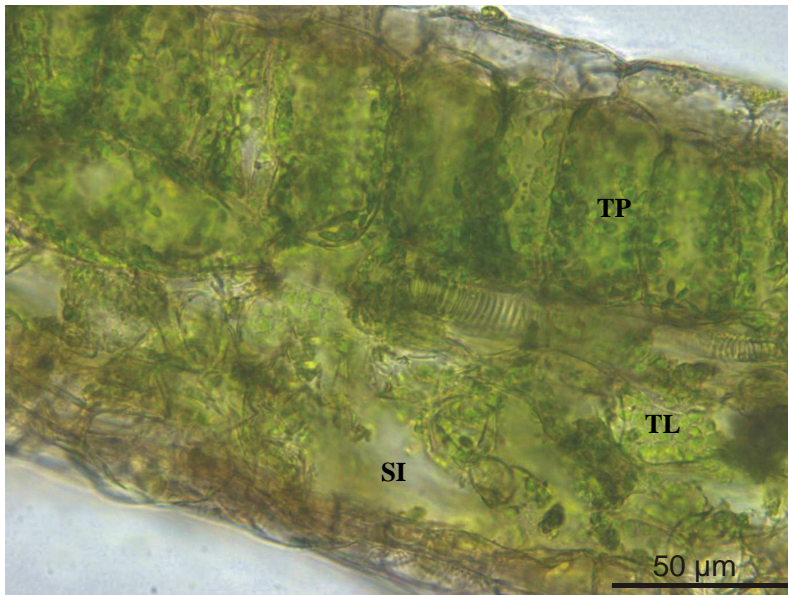


Figura 5: sezione trasversale a fresco di *Atropa belladonna*. Il tessuto a palizzata (TP) è monostratificato e il tessuto lacunoso (TL) è piuttosto lasso, con evidenti spazi intercellulari (SI).

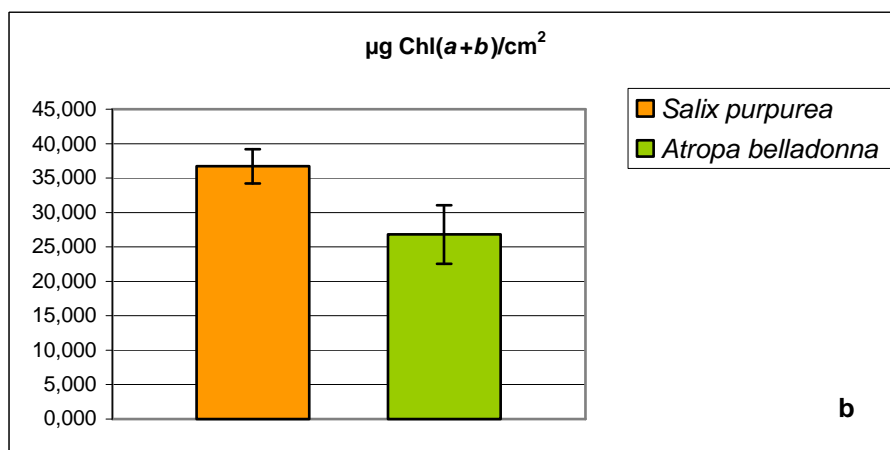
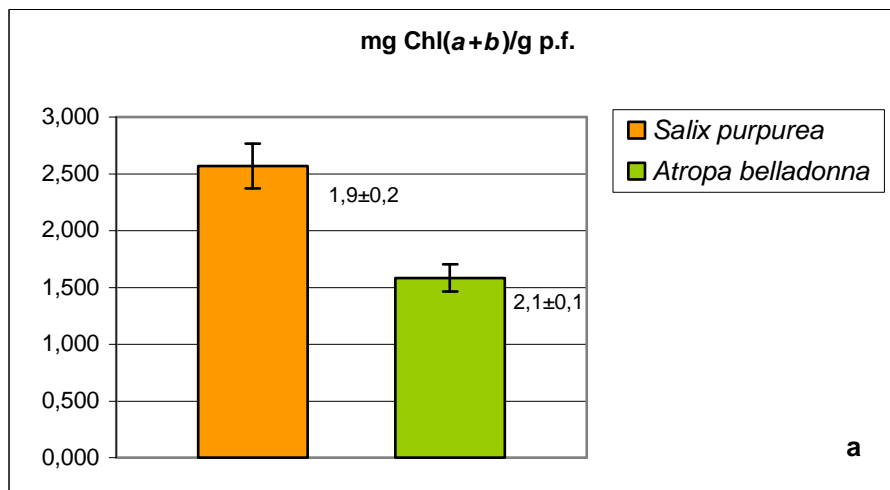


Figura 6: contenuto in clorofille (a+b) per unità di peso fresco (a) e unità di superficie (b) in foglie di salice e atropa. I numeri a fianco degli istogrammi nella figura (a) indicano i valori dei rapporti clorofilla a/clorofilla b.

Le differenze dei contenuti in clorofille delle foglie di salice e atropa sono sempre altamente significative ($P < 0,001$) mentre non sono significative le differenze dei rapporti clorofilla a/b.

	mg Car/g p.f.	Car/Chl
<i>Salix purpurea</i>	0,36±0,04	0,14±0,01
<i>Atropa belladonna</i>	0,21±0,02	0,13±0,01

Tabella 1: contenuto in carotenoidi (Car) per unità di peso fresco e rapporto carotenoidi/clorofille (Chl) in foglie di salice e atropa.

Le differenze fra i contenuti in carotenoidi delle foglie di salice e atropa sono altamente significative ($P < 0,001$) mentre non sono significative le differenze fra i rapporti Car/Chl.

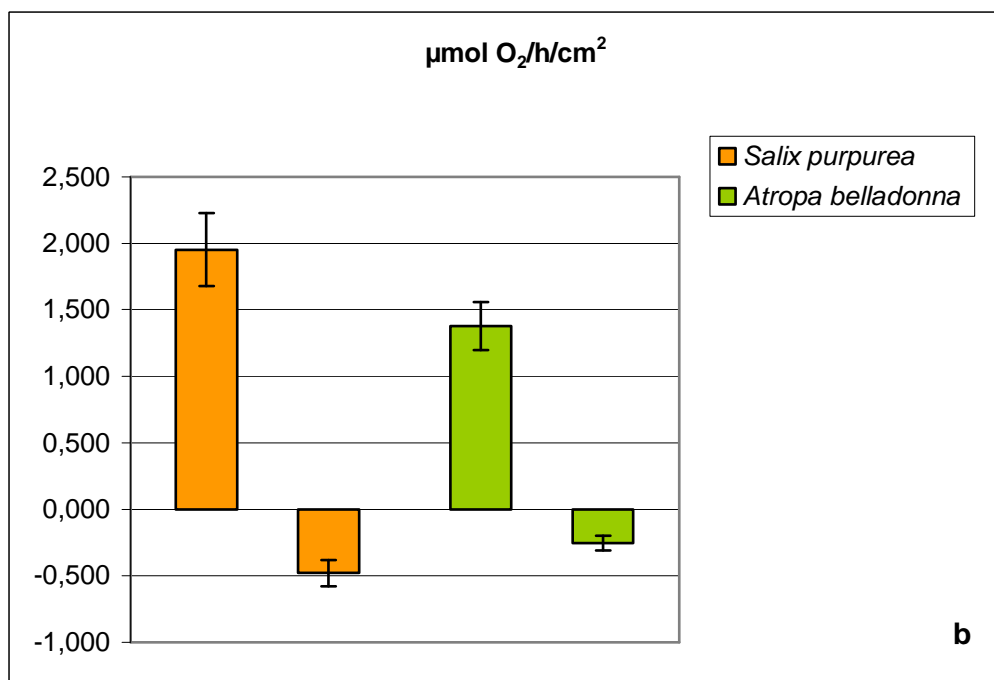
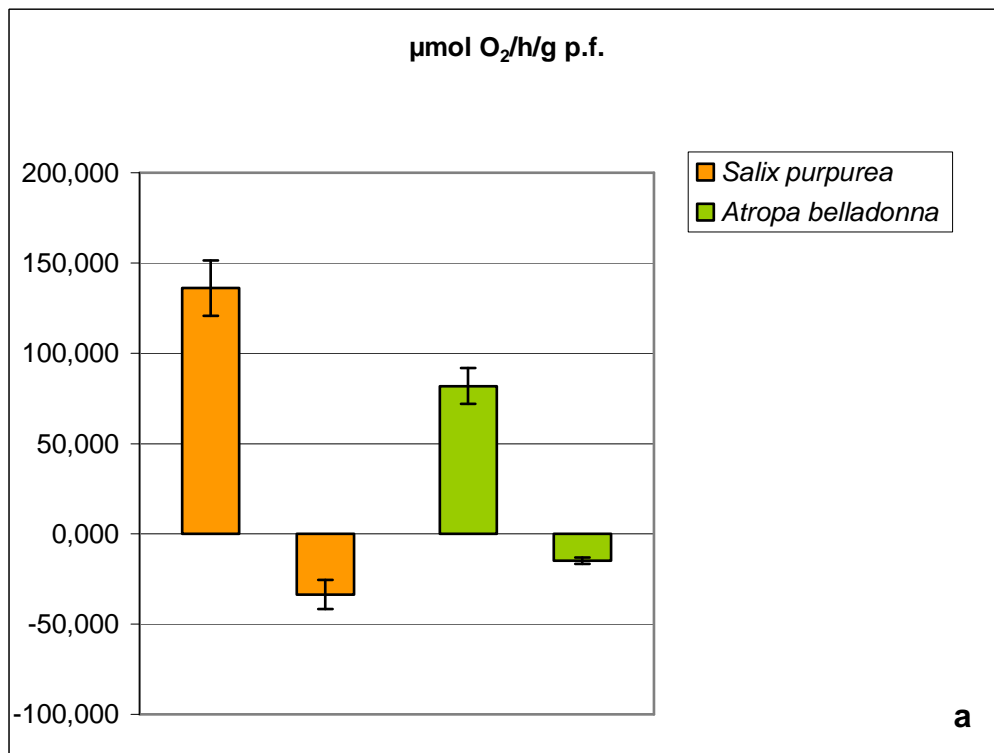


Figura 7: emissione fotosintetica e consumo respiratorio di ossigeno riferiti a peso fresco (a) e unità di superficie (b) in foglie di salice e atropa. (Le differenze tra i valori delle foglie di salice e di atropa sono sempre altamente significative: $P < 0,001$)

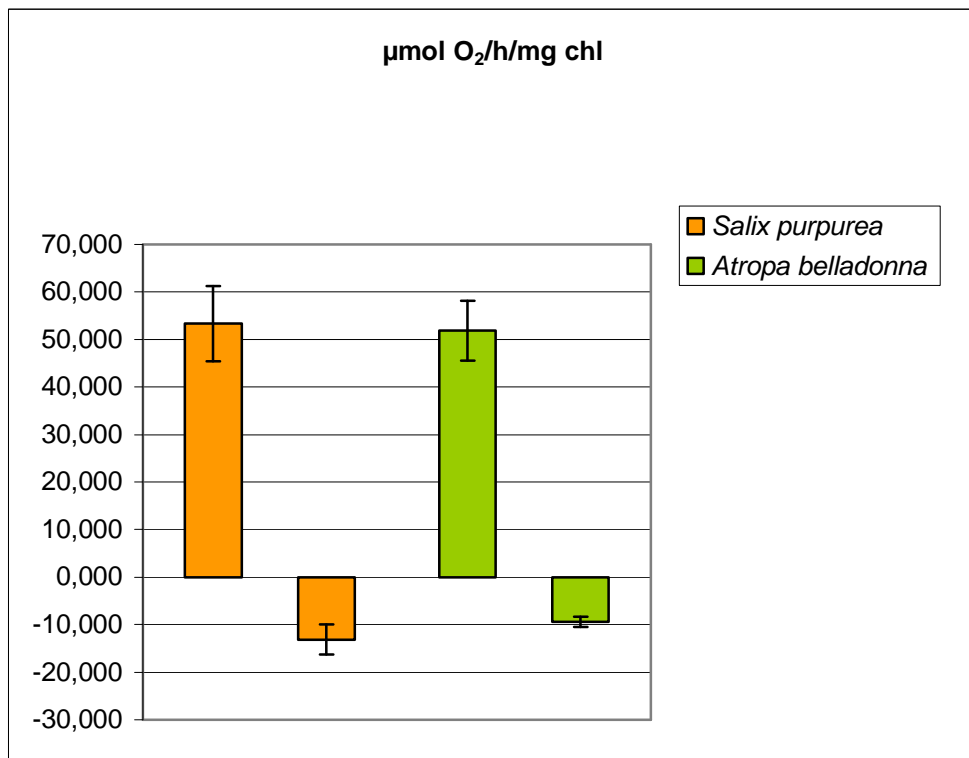


Figura 8: emissione fotosintetica e consumo respiratorio di ossigeno riferiti a unità di clorofille in foglie di salice e atropa. (Le differenze tra i valori delle foglie di salice e di atropa non sono significative)