

Università di Pisa

FACOLTA' DI AGRARIA



Corso di Laurea Specialistica

in

Agricoltura Biologica e Multifunzionale

curriculum Agricoltura Multifunzionale

**FISIOLOGIA DELLA GERMINAZIONE DI
ORZO
SOTTOPOSTO A BASSE TEMPERATURE**

Relatore:

Prof. Lorenzo GUGLIELMINETTI

Candidato:

Caterina DEL ZOPPO

Anno Accademico 2009-2010

INDICE:

1	INTRODUZIONE	4
2.1	CLASSIFICAZIONE BOTANICA E ORIGINE	8
2.2	CARATTERI MORFOLOGICI	9
2.3	ESIGENZE E ADATTAMENTO AMBIENTALE	12
3	MATERIALE VEGETALE	15
4	DATI FENOTIPICI	19
5.1	DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DEI PIGMENTI FOGLIARI	26
5.2	PROCEDIMENTO	27
5.3	RISULTATI	28
6.1	ANALISI DEL CONTENUTO IN AMIDO	32
6.2	PROCEDIMENTO	33
6.3	RISULTATI	35
7.1	ANALISI ENZIMATICA DEGLI ZUCCHERI LIBERI	39
7.2	ESTRAZIONE DEGLI ZUCCHERI LIBERI	40
7.3	DETERMINAZIONE ENZIMATICA DEGLI ZUCCHERI LIBERI	41
7.4	RISULTATI	46
8.1	ELETTROFORESI IN CONDIZIONI NATIVE (NATIVE PAGE)	54
8.2	ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE PER ELETTROFORESI IN CONDIZIONI NATIVE	55
8.3	TRATTAMENTO DEI CAMPIONI PER ELETTROFORESI NATIVE-PAGE	56
8.4	PROCEDIMENTO	57

8.5	RISULTATI	61
9.1	ANALISI DELL'RNA	65
9.2	ESTRAZIONE DELL'RNA	66
9.3	QUANTIFICAZIONE DELL'RNA	68
9.4	ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO DI RNA	69
9.5	RISULTATI	71
10	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	74
	BIBLIOGRAFIA	77

Capitolo 1

1 INTRODUZIONE

Le piante sono continuamente sottoposte a stress, cioè a condizioni in cui un fattore esterno esercita un'influenza negativa nei confronti della pianta e, quindi, sui processi di crescita, di sviluppo e sulla produttività.

Gli stress possono essere suddivisi in stress biotici, a seconda che questi siano determinati da altri organismi viventi, oppure in stress abiotici, qualora vengano provocati da un eccesso o da una carenza dei fattori chimici e fisici che determinano le caratteristiche dell'ambiente in cui vive la pianta.

Lo stress viene considerato in relazione alla risposta delle piante e quindi con il concetto di resistenza allo stress, ovvero l'abilità da parte delle piante stesse di fare fronte a condizioni ambientali sfavorevoli.

I vegetali rispondono agli stress attraverso meccanismi di difesa e adattamento che si traducono in una vasta gamma di risposte a livello genetico, metabolico e biochimico e la durata, l'intensità, e la velocità con cui uno stress colpisce una pianta sono tutti fattori che influenzano la risposta della pianta stessa (Taiz, 2002).

Principalmente le piante si oppongono a condizioni ambientali sfavorevoli attraverso strategie di allontanamento, volte a prevenire l'esposizione allo stress, e strategie di tolleranza, che consentono ai vegetali di sopportare condizioni avverse.

Alcuni meccanismi di resistenza sono costitutivi, e quindi presenti precedentemente all'esposizione allo stress, in altri casi le piante rispondono modificando il loro stato fisiologico acclimatandosi, modificando quindi il proprio equilibrio fisiologico in risposta a cambiamenti dell'ambiente esterno.

Tra le condizioni ambientali che causano situazioni di stress vi sono la siccità, la salinità, la carenza di ossigeno, le basse o alte temperature, i raggi UV.

Le basse temperature rappresentano uno dei più importanti fattori che limitano la produttività, la qualità e la distribuzione spaziale delle specie coltivate (Xin e Browse, 2000).

Per "stress da basse temperature" si indicano complessivamente sia condizioni di freddo (o gelo) caratterizzate da temperature sfavorevoli, ma comprese tipicamente nell'intervallo tra 0 e 12° C, che di congelamento, dovute a temperature inferiori agli 0°C.

Nonostante tali condizioni siano spesso correlate, gli effetti prodotti sui vegetali dai due regimi termici differiscono, in quanto uno stress da condizioni di gelo produce effetti diretti sulle cellule, mentre il congelamento spesso agisce indirettamente, danneggiando le cellule mediante disidratazione (Pearce, 1999).

Le strategie con cui i vegetali sono in grado sopravvivere in queste condizioni di stress sono molteplici; alcune specie sono in grado di acquisire un complessivo incremento di tolleranza al congelamento in seguito all'esposizione a basse temperature, ma superiori al punto di congelamento, attraverso un fenomeno conosciuto come acclimatazione al freddo (Fowler *et al.*, 1999).

Tale processo comporta cambiamenti biochimici e fisiologici che includono alterazioni a livello del metabolismo dei carboidrati, della composizione dei lipidi di membrana, della respirazione, della fotosintesi, degli enzimi e delle molecole antiossidanti (Allen e Ort, 2001) nonché la riduzione o il blocco dell'accrescimento della pianta stessa (Levitt, 1980).

Queste modificazioni sono le risposte messe in atto dalle piante alle basse temperature nell'ambito del processo di acclimatazione e, frequentemente, derivano da cambiamenti nell'espressione dei geni (Guy *et al.*, 1985; Guy 1990; Iba, 2002; Benedict *et al.*, 2006), come dimostrato attraverso l'isolamento e la caratterizzazione di molti geni COR (cold-regulated) in differenti specie di piante (Thomashow, 1998).

A causa dell'importanza dovuta anche alle conseguenze che lo stress da freddo origina a livello della produzione delle specie vegetali, il fenomeno, da tempo, ha richiamato l'attenzione da parte degli studiosi, i quali hanno analizzato gli aspetti fenotipici e strutturali e, successivamente, quelli biochimici associati al processo di acclimatazione da freddo.

Alcuni studi specifici hanno dimostrato una particolare capacità da parte di *Festuca arundinacea* ad acclimatarsi in condizioni di basse temperature: infatti, cariossidi di tale specie poste a germinare a 4°C hanno sviluppato plantule in grado di resistere a questo regime termico, in totale assenza di luce e di nutrienti, sino ad oltre 400 giorni e di riprendere la propria capacità fotosintetica quando trasferite alla luce (Damiani, 2005).

Sulla base di questi interessanti risultati, il presente lavoro ha avuto come fine l'indagine del comportamento di una specie in condizioni ambientali analoghe e che, al contrario di *Festuca*, fosse mappata geneticamente, in modo da poter eventualmente approfondire lo studio di tale comportamento a livello molecolare.

Quindi, è stata presa in esame la fisiologia della germinazione di orzo var. *Nure*, quando sottoposto a stress da basse temperature, andando ad analizzare in particolare gli aspetti metabolici del processo.

Capitolo 2

2.1 CLASSIFICAZIONE BOTANICA E ORIGINE



Orzo (*Hordeum* sp. pl.)

L'orzo (*Hordeum vulgare* L.), graminacea appartenente alla Tribù delle *Hordeae*, Gen. *Hordeum*, è una specie caratterizzata da una notevole importanza dal punto di vista economico, in quanto rappresenta uno dei più importanti cereali coltivati nel mondo.

E' infatti il quarto cereale in ordine di importanza, dopo frumento, riso e mais (Giardini, 2000).

L'esistenza di diverse varianti genetiche conferisce a questa specie una spiccata adattabilità climatica e territoriale, e ciò fa sì che costituisca la principale fonte alimentare per un gran numero di popolazioni, soprattutto in zone fredde e aride dove il frumento non si adatta.

Utilizzato già a partire dalla preistoria in Mesopotamia, l'orzo pare originario del Medio Oriente o, come asserito da alcuni autori del Tibet, e viene attualmente utilizzato per l'alimentazione del bestiame, per la produzione di malto e per l'industria della torrefazione e la sua coltivazione è diffusa in tutto il mondo (Giardini, 2000).

Nel 2009 la coltivazione dell'orzo ha superato i 54 milioni di ettari a livello mondiale, prevalentemente distribuiti in Europa ed Asia, con una resa media mondiale di 2,77 t/ha (dati FAO, 2009).

2.2 CARATTERI MORFOLOGICI

L'orzo è una pianta erbacea annuale, caratterizzata da un culmo cilindrico con internodi cavi presenti in numero variabile da 5 ad 8.

Gli internodi basali sono generalmente più corti e risultano divisi da un setto trasversale.

Il culmo presenta lunghezza variabile: si parte dai 15 cm di alcune forme selvatiche sino a raggiungere i 150 cm di certe cultivar; in genere ogni pianta forma più culmi, uno principale e due o tre accestimenti.

Esistono, inoltre, forme mutanti che originano piante con un basso numero di accestimenti e 2-3 spighe per culmo.

Le foglie sono alterne, presentano lunghe auricole (a differenza degli altri cereali microtermi), una ligula non appariscente, e sono caratterizzate da una lamina liscia nella pagina inferiore e scanalata in quella superiore (Giardini, 2000).



Figura 2.1 Particolare di auricole di foglia di orzo.

Le foglie formano un angolo con il fusto che è un carattere tipicamente varietale, così come altri caratteri quali la lunghezza, la larghezza e la forma delle foglie.

La foglia terminale presenta una conformazione “a bandiera”, ed è di dimensioni inferiori alle altre e la sua guaina, nella fase di botticella, avvolge la spiga, determinando il tipico ingrossamento.

L'infiorescenza è una spiga compatta caratterizzata da un breve rachide, con un numero variabile di nodi, da 10 a 30.

Ad ogni nodo sono inserite tre spighette uniflore.

Tali spighette sono formate da glume sterili, ridotte a semplici formazioni pelose, che racchiudono al loro interno i fiori protetti da piccole brattee fertili: lemma (glumetta inferiore) e palea (glumetta superiore).

La lemma avvolge la palea ed entrambe alla maturazione aderiscono alle cariossidi (frutto vestito), ad eccezione delle varietà dette a cariosside nuda.

I tre fiori risultano fertili nelle forme polistiche, mentre negli orzi distici lo è solamente quello centrale e in questo caso la spiga matura presenta solo due ranghi di cariossidi.

Mentre nel frumento la spiga è generalmente eretta, nell'orzo spesso la spiga è reclinata per l'arcuamento dell'ultimo internodo o della spiga stessa (Bonciarelli, 2001).



Figura 2.2 Spiga di orzo distico (*Hordeum vulgare disticum*): risultano evidenti i due ranghi di cariossidi che conferiscono la forma tipicamente appiattita alla spiga.

Il frutto è una cariosside di colore giallognolo, talvolta biancastro, rossastro, o nero in alcuni casi.

L'embrione risulta strettamente saldato al pericarpo, il solco ventrale è più o meno marcato e l'appendice apicale, la rachilla, si presenta più o meno pelosa.



Figura 2.3 Cariossidi di orzo.

La cariosside presenta una lunghezza che può variare dagli 8 ai 12 mm, una larghezza di 3-4 mm ed uno spessore attorno ai 2-3 mm.

Il peso delle cariossidi vestite varia tra i 27 e i 56 g, e gli invogli seminali costituiscono, in media, dal 10 al 15% del peso del frutto (Giardini, 2000).

L'orzo presenta un apparato radicale di tipo fascicolato che, in terreni profondi, può raggiungere anche due metri.

Al momento della germinazione si sviluppano le radici seminali o primarie, a cui segue l'emissione del coleoptile, che avvolge l'epicotile (la prima foglia vera) sino al momento dell'emergenza.

Il sistema radicale secondario (radici avventizie che si sviluppano dalla base della corona) si accresce in un secondo momento, a partire dalla fase di accestimento; talvolta, a causa di condizioni siccitose o altri fattori di vario genere, la pianta può completare il suo ciclo anche senza lo sviluppo delle radici avventizie o secondarie, e quindi raggiunge al maturità con le sole radici seminali.

Il ciclo vegetativo è simile a quello del frumento e presenta quindi le tipiche fenofasi dei cereali autunno-vernini: germinazione, accestimento, levata, botticella, fioritura e maturazione.

Durante la prima fase l'accrescimento è generalmente piuttosto rallentato, ma risulta più veloce rispetto al frumento durante la fase di levata.

La fioritura, che avviene verso la fine di aprile, inizia dalle spighe centrali e spesso si avvia quando ancora la pianta si trova in fase di botticella e gli stami, talvolta, non sono ancora fuoriusciti.

Dal momento dell'antesi si sviluppano le cariossidi, che rappresentano l'ultimo organo che cessa di accrescersi nella pianta, e il periodo tra la fioritura e la fine del riempimento delle cariossidi varia dai 20 ai 40 giorni.

Il ciclo di sviluppo dell'orzo è più breve di quello del frumento di circa 15 giorni, e ciò gli consente di raggiungere la maturazione prima delle alte temperature estive (Giardini, 2000).

2.3 ESIGENZE E ADATTAMENTO AMBIENTALE

L'orzo presenta esigenze simili agli altri cereali autunno-vernini, ma è caratterizzato da una maggiore resistenza a condizioni siccitose e ciò gli consente, in ambienti dove l'acqua è il fattore limitante, di raggiungere livelli produttivi superiori al frumento, all'avena e alla segale (Giardini, 2000).

La coltivazione di questa specie si può spingere a latitudini più elevate di altri cereali grazie alla precocità del ciclo ed, inoltre, la sua adattabilità la rende idonea a svilupparsi anche ad altitudini elevate.

Tuttavia le produzioni unitarie risentono dell'areale di coltivazione e dell'andamento climatico stagionale, e risultano variabili tra le 2 e le 6 t ha⁻¹.

E' il cereale che resiste maggiormente alla salinità, ed è in grado di produrre normalmente sino ad una E_{Ce} di 8-10 mS cm⁻¹.

Per quanto riguarda le condizioni termiche, l'orzo sopporta bene anche le alte temperature (sino ai 38°C), ma non in presenza di elevata umidità, in quanto tali condizioni favoriscono lo sviluppo di malattie fungine.

Dal punto di vista climatico risulta inoltre moderatamente tollerante il freddo.

Durante l'accrescimento sono ideali temperature che si aggirano intorno ai 15°C, mentre l'optimum durante la fioritura si attesta sui 17-18°C, e come gli altri cereali, tale fase può essere notevolmente compromessa da gelate tardive, le quali possono danneggiare in modo severo la pianta e compromettere la fertilità della spiga.

L'accestimento è favorito da un fotoperiodo breve associato a basse temperature, anche se esistono forme adattate a diverse condizioni fotoperiodiche.

L'orzo viene coltivato in tutti i tipi di terreno, anche se predilige i suoli di medio impasto, ben drenati e con un pH intorno a 7-8.

Le esigenze nutrizionali sono simili a quelle del frumento, ma necessita una buona presenza di fosforo e potassio nei terreni, mentre minore deve essere la presenza di azoto, in quanto questo elemento favorisce la produzione di paglia ed il conseguente fenomeno dell'allettamento.

Come precedentemente accennato, questo cereale presenta una buona resistenza alla siccità, e quindi risulta preferito al frumento dove questa condizione è molto spinta, infatti, grazie alla sua precocità, ai consumi idrici relativamente ridotti e alla tolleranza alle alte temperature, in semina autunnale riesce a maturare tanto presto da sfuggire meglio di altre specie la siccità, e ad utilizzare al massimo la poca acqua disponibile (Bociarelli, 2001).

Tuttavia la disponibilità idrica deve essere garantita soprattutto nel periodo di accrescimento vegetativo, durante la fioritura e all'inizio della formazione delle cariossidi.

Infine, per quanto riguarda le avversità, l'orzo presenta una certa suscettibilità a patogeni di natura fungina come l'oidio, l'agente del mal del piede, il *Rhizoctonia* o le ruggini ed in modo particolare risultano più soggette le varietà distiche e le colture autunnali (Bonciarelli, 2001).

In assenza di trattamenti preventivi di concia del seme, si possono avere danni per lo sviluppo di *Helminthosporium gramineum*, *Ustilago* sp. Pl., marciumi radicali o della plantula provocati da *Pythium*, *Fusarium* e *Aspergillus*.

Capitolo 3

3 MATERIALE VEGETALE

Per lo studio sono state utilizzate cariossidi di orzo var. *Nure* gentilmente forniteci dal Dott. Nicola Pecchioni dell'Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Sezione di Fiorenzuola D'Arda (PC).

La cultivar *Nure* è stata selezionata secondo il metodo del pedigree da una popolazione F2 ottenuta dall'incrocio FO 1236 = (Fior 40 x Alpha2) x Baraka.

Nure è un orzo distico, autunno-vernino, che presenta una buona resistenza ai freddi invernali, taglia delle piante media e buona tolleranza all'allettamento.

Questa varietà presenta potenzialità produttive e stabilità elevate anche in diverse tipologie di ambiente, come evidenziato dai risultati delle prove effettuate in località diverse e, anche se si tratta di un orzo distico, presenta livelli di resa analoghi a quelli delle varietà recenti di orzo esastico coltivate in Italia (Alberici *et al.*, 1999).

Il lavoro ha previsto lo studio della fisiologia di tale varietà in condizioni di basse temperature e totale assenza di luce, al fine di individuarne le reazioni a seguito di tali condizioni di stress ambientale.

In una prima fase è stata prevista la germinazione del materiale vegetale all'interno di capsule Petri con carta bibula imbevuta di acqua distillata, previo trattamento delle cariossidi con una soluzione di sodio ipoclorito al 7%, con funzione sterilizzante.

La semina effettuata in condizioni di sterilità ha purtroppo creato problematiche a carico della germinazione, quindi è stato pensato di porre il materiale vegetale a germinare in condizioni quanto più possibile simili a quelle naturali.

È stata quindi effettuata la semina diretta in vaso delle cariossidi, in una miscela di terriccio e perlite con una densità di 20 semi per vaso di 10 cm di diametro.

Durante il periodo di accrescimento il substrato è stato mantenuto, in media, alle condizioni di umidità di capacità idrica di campo, e tutto il materiale è stato conservato in appositi contenitori (scatole di cartone che permettessero una certa traspirazione, per evitare situazioni di condensa eccessiva) al fine di assicurare le condizioni di buio.

Il materiale è stato quindi posto in camera fredda alla temperatura di 4°C e umidità relativa del 100%.

Sono stati effettuati prelievi mensili, prevedendo il trasferimento di una parte del materiale in camera di crescita in condizioni di fotoperiodo lungo, alla temperatura di 23°C e con il 60% di umidità relativa, dove doveva essere mantenuto per 7 giorni, al fine di verificarne la capacità di ripresa dei processi fotosintetici.

Il campionamento ha prodotto materiale vegetale prelevato a 30, 60, 90, 120 e 150 giorni dalla semina e i loro rispettivi (recovery) posti alla luce per 7 giorni (tranne nel caso dei 150 giorni, caso in cui è stata constatata la mancata sopravvivenza delle plantule).

In particolare sono stati prelevati i coleptili e gli endospermi, di cui sono stati raccolti dati di tipo fenotipico, quali peso e lunghezza (per i soli coleptili).

Il materiale vegetale è stato quindi conservato in congelatore a – 80° C, in attesa delle analisi.

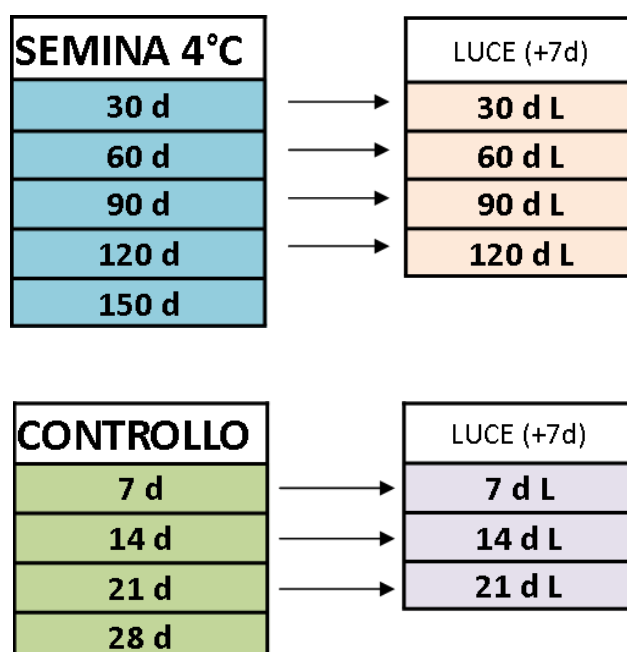


Figura 3.1 Schema dei campionamenti effettuati per la semina a condizioni di basse temperature (4°C) e del controllo a 23°C. Le frecce indicano il trasferimento in camera di crescita a 23°C e 60% di umidità relativa, in condizioni di fotoperiodo lungo, dove i campioni permangono per una settimana (recovery).

Analogamente è stata effettuata la semina di controllo, ponendo il materiale al buio in camera di crescita a 23°C e 60% di umidità, dove è stato mantenuto sino al

momento in cui le plantule hanno terminato ogni tipo di riserva ed è stata constatata la loro mancata sopravvivenza.

Anche in questo caso sono stati effettuati prelievi periodici (settimanali) con trasferimento di parte del materiale alla luce per il processo di “inverdimento” (recovery).

Sono stati quindi ottenuti campioni prelevati a 7, 14, 21 e 28 giorni dalla semina e i loro rispettivi dopo trasferimento alla luce.

Anche in questo caso si è proceduto all'analisi del peso degli endospermi e dei coleoptili e dell'allungamento di questi ultimi.

Il materiale vegetale è stato quindi stoccato a -80°C in attesa di essere analizzato

Le analisi effettuate, descritte in dettaglio nelle pagine successive, sono le seguenti:

- **analisi del contenuto in amido**
- **analisi del contenuto degli zuccheri liberi**
- **analisi del contenuto dei pigmenti fogliari**
- **determinazione delle proteine e analisi dell'attività amilolitica**
- **analisi quali-quantitativa del contenuto in RNA**

Capitolo 4

4 DATI FENOTIPICI

Durante la fase di prelievo del materiale vegetale sono state realizzate due serie di campioni, come descritto in precedenza, relative al controllo a 23°C , alla semina a 4°C e ai relativi recovery.

Per ogni singolo campione è stata rilevata una serie di dati fenotipici riguardanti il peso delle cariossidi, il peso dei coleoptili e la loro lunghezza.

Ogni prelievo ha inoltre previsto la raccolta di una serie di immagini delle plantule campionate, di cui sono state selezionate le più significative al fine di illustrare lo sviluppo dell'orzo nelle varie fasi del lavoro (Fig. 4.1 e 4.2).

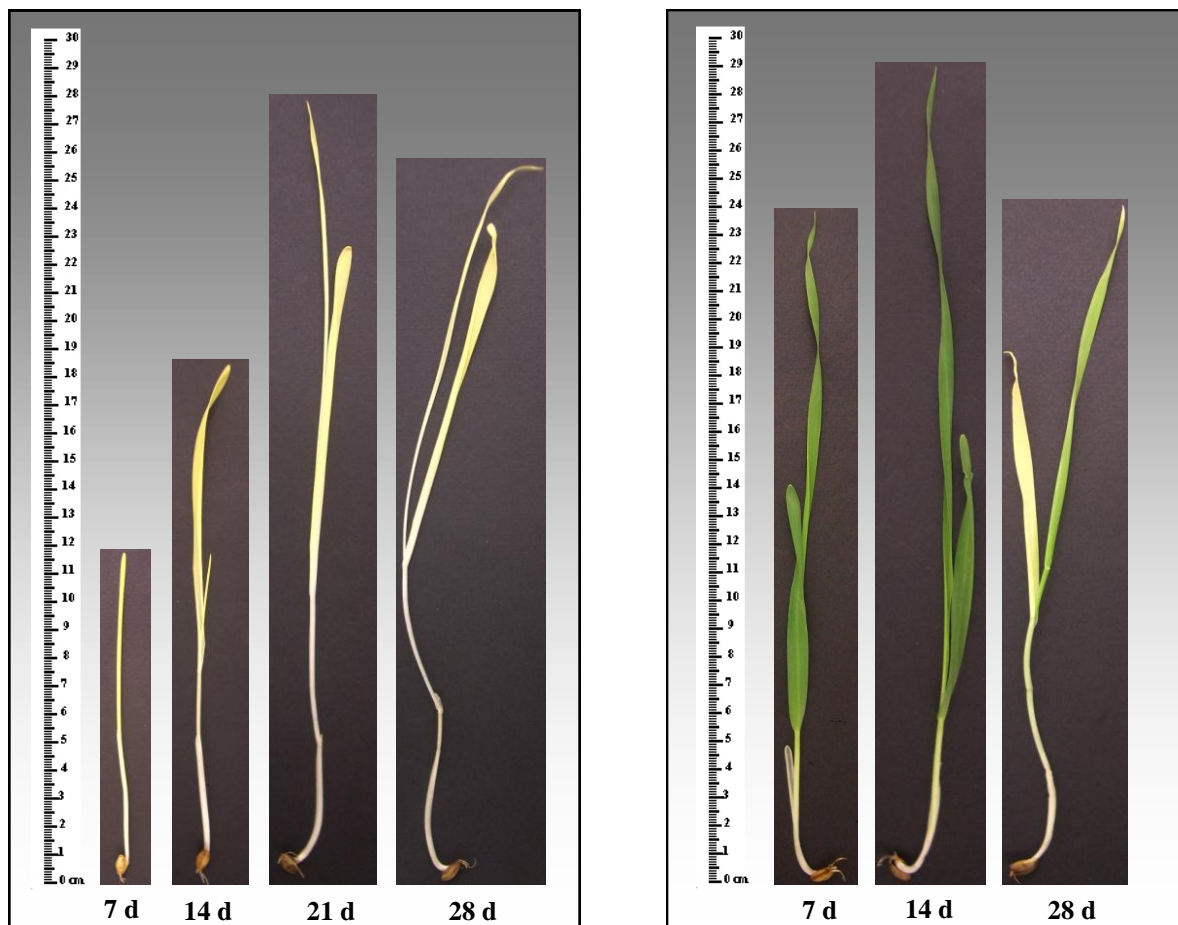


Figura 4.1 Stato di accrescimento delle plantule di controllo (23°C, 60% di umidità) al momento del loro prelievo (d=day, giorno), rispettivamente per i campioni al buio, ed i corrispettivi dopo una settimana di luce a 23° C (recovery).

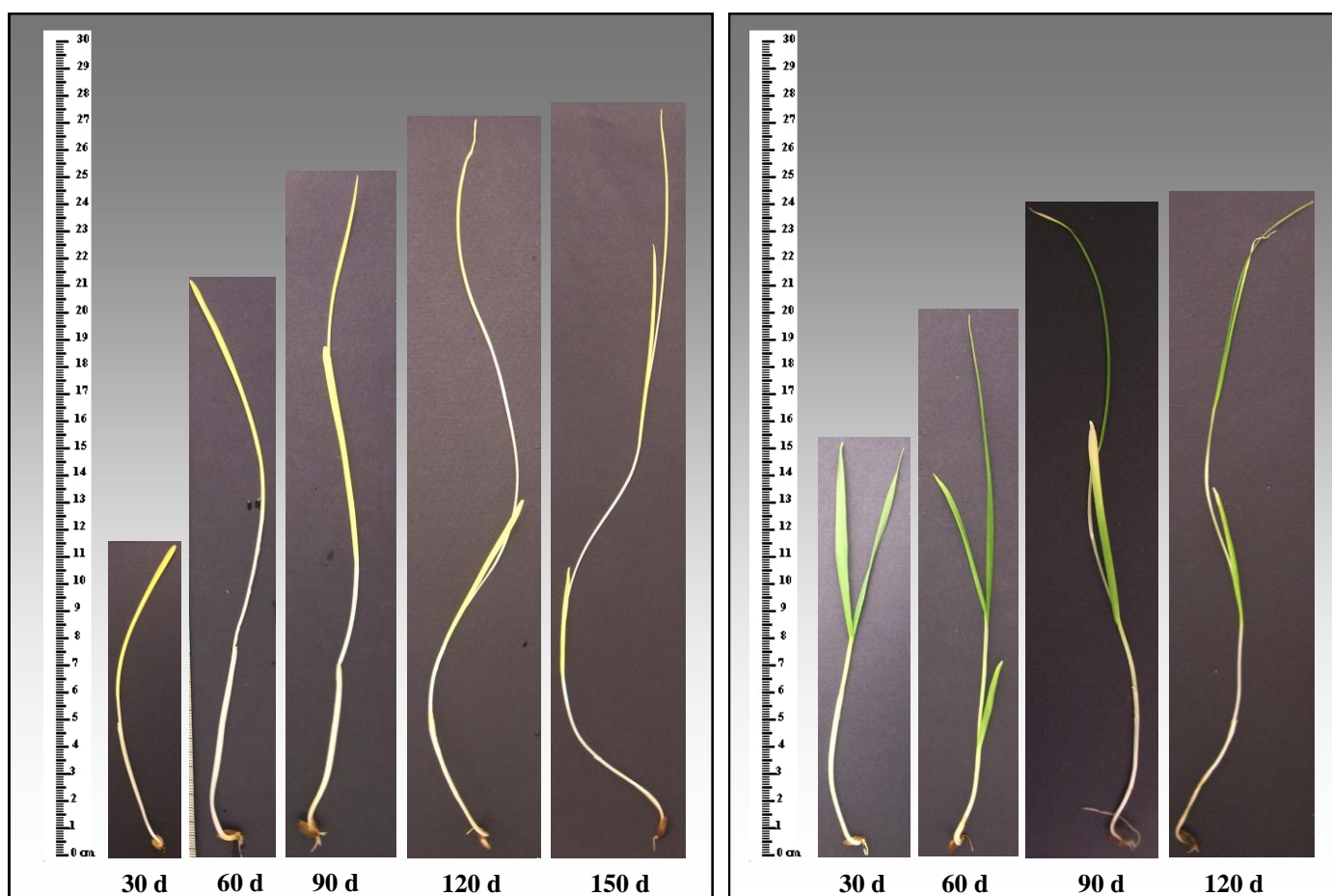


Figura 4.2 Stato di accrescimento delle plantule della semina a basse temperature (4°C, 100% di umidità) al momento del loro prelievo (d=day, giorno), rispettivamente per i campioni al buio, ed i corrispettivi dopo una settimana di luce a 23° C (recovery).

Le plantule sottoposte a condizioni di basse temperature si presentano, come visibile dalle figure, maggiormente filate rispetto a quelle del controllo ed inoltre, sempre dalle immagini, è già possibile intuire come l'accrescimento delle prime risulti rallentato rispetto alle seconde.

Infatti si instaura una sorta di “corrispondenza” tra i vari campionamenti delle due serie, e quindi il “ciclo”, che nel controllo si conclude a 28 giorni con la morte delle piante, si realizza invece in tempi molto più lunghi a 4°C.

E' altresì possibile notare come le plantule sottoposte a condizioni di luce per una settimana, presentino gradualmente un minore rigoglio vegetativo con il procedere dei campionamenti; questo può indicare il progressivo aumento della difficoltà nella ripresa dell'attività fotosintetica, situazione che risulta evidente ai 21 giorni del controllo e ai 120 della semina a 4°C.

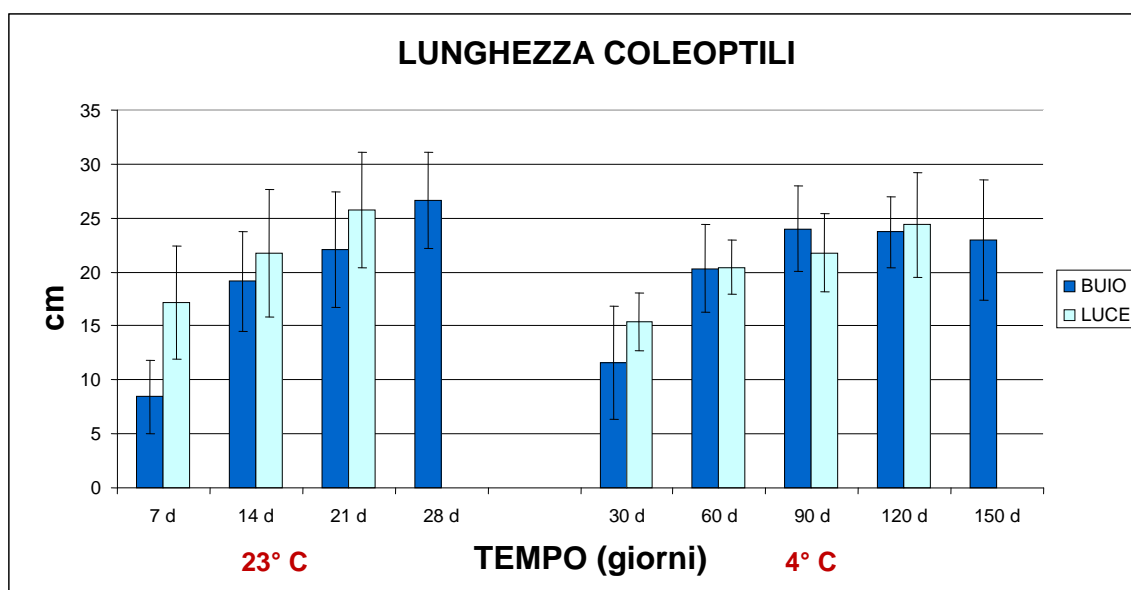


Figura 4.3 Grafico relativo all'accrescimento medio dei coleoptili, in cm. Sono poste a confronto le due semine al buio (controllo a 23°C e 4°C) e i relativi recovery (luce).

Le cariossidi a 23°C germinano e si sviluppano in pochi giorni, al contrario dei campioni posti a 4°C, i quali impiegano più tempo a mostrare i primi segni di germinazione e che raggiungono uno sviluppo analogo ai primi al momento del loro primo prelievo, a 30 giorni dalla semina, come è possibile rilevare dal grafico.

Questo dato, insieme ai successivi, va a confermare quanto intuito precedentemente, e cioè che l'orzo al buio e in condizioni di basse temperature si sviluppa in modo analogo al quello al buio a 23°C, impiegando però un periodo di tempo molto più lungo: la capacità di riprendere ogni tipologia di processo fotosintetico viene meno, infatti, tra i 120 giorni e i 150 giorni dalla semina.

E' possibile inoltre affermare come, in entrambi i casi, i coleoptili, da un determinato momento in poi, terminano il proprio accrescimento, andamento meno evidente nel controllo, ma che risulta più palese nei campioni al freddo, dove lo sviluppo si arresta praticamente a partire dal secondo prelievo a 60 giorni.

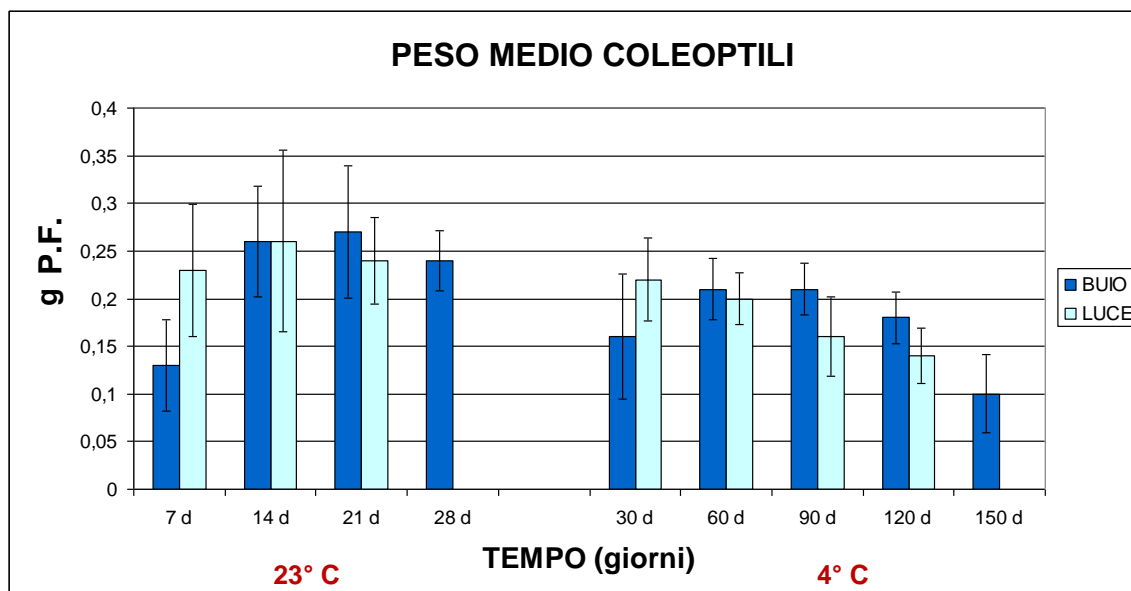


Figura 4.4 Grafico relativo all'accrescimento dei coleoptili, espresso come peso medio in grammi di peso fresco, relativamente alle due semine al buio (controllo a 23°C e 4°C), e i rispettivi recovery (luce).

Anche il peso dei coleoptili del controllo a 23°C presenta un andamento simile alla lunghezza: si riscontra il loro accrescimento sino a 14 giorni, momento in cui il peso si stabilizza.

I campioni a 4°C, invece, evidenziano un incremento del peso sino a 60 giorni dalla semina, momento in cui si registra una tendenza negativa sino all'ultimo prelievo.

Per quanto riguarda i recovery di entrambe le serie, si registra un incremento durante le prime fasi rispetto ai campioni al buio; dal secondo prelievo in poi (14 e 60 giorni rispettivamente per i 23°C e i 4°C) il peso tende a non aumentare dopo l'esposizione alla luce.

Analogo comportamento si registra per i recovery in entrambe le serie anche per quanto riguarda il dato relativo alla lunghezza.

Un ulteriore dato derivato dai campionamenti è la percentuale di germinazione, che viene riportata nelle tabelle seguenti, nelle quali vengono indicati i valori medi per ogni singolo campionamento.

% GERMINAZIONE		
	4°C	RECOVERY
30 d	70	72,5
60 d	72,5	80
90 d	77,5	92,5
120 d	90	80
150 d	60	-

% GERMINAZIONE		
	23°C	RECOVERY
7 d	36,7	46,7
14 d	36,3	25
21 d	20,8	38,3
28 d	31,5	-

Figura 4.5 Tabelle relative alla percentuale di germinazione media per singolo campionamento.

Le condizioni in cui vengono poste le cariossidi influenzano notevolmente il loro processo germinativo: infatti i risultati ottenuti dal controllo a 23°C sono notevolmente più bassi rispetto a quelli derivati dalla semina a 4°C.

La differenza tra le varie percentuali di germinazione superano il 30% in ogni caso, con punte anche molto più elevate.

Questo andamento è probabilmente dovuto ad una situazione di stress derivata dall'associazione di temperature mediamente elevate per questa coltura a condizioni di elevata umidità dell'ambiente, condizioni che favoriscono, inoltre, la formazione di muffe, la cui presenza può avere influito sui processi germinativi e di sviluppo delle plantule.

Capitolo 5

5.1 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DEI PIGMENTI FOGLIARI

Le clorofille costituiscono una famiglia di composti tetrapirrolici derivati dalla protoporfirina IX, che presentano un atomo di magnesio coordinato al centro della molecola.

Si distinguono diverse tipologie di clorofilla, tra cui le principali, che si trovano nei cloroplasti delle piante superiori, sono la clorofilla a e la clorofilla b.

Sono entrambi pigmenti verdi che presentano spettri di assorbimento leggermente diversi, in modo tale da integrarsi tra loro e quindi da ampliare le regioni dello spettro della luce visibile in cui si ha un assorbimento di fotoni.

Oltre alla clorofilla, il cloroplasto, contiene altri pigmenti quali i caroteni e le xantofille, detti carotenoidi.

La loro funzione è quella di assicurare l'assorbimento della luce in ambiti spettrali non adeguatamente coperti dalla clorofilla e presentano, inoltre, l'importantissima funzione di proteggere l'apparato fotosintetico da possibili foto-ossidazioni (Alpi, 2004).

Tali pigmenti non sono inizialmente presenti all'interno dei tessuti vegetali; infatti, all'inizio dello sviluppo si devono evolvere cloroplasti fotosinteticamente attivi dai protoplastidi o dagli ezioplasti dei tessuti cresciuti al buio, ed è solamente durante questo cambiamento che vengono sintetizzati (Taiz, 2002).

L'analisi descritta nel paragrafo seguente ha avuto quindi come scopo la quantificazione di questi pigmenti nei tessuti vegetali dei campioni di orzo.

5.2 PROCEDIMENTO

La concentrazione di clorofilla a, clorofilla b e di carotenoidi è stata determinata attraverso via spettrofotometrica, adattando il protocollo di Zhang e Kirkham (1996).

L'analisi ha riguardato unicamente i campioni costituiti dai coleoptili, derivati dalla semina in condizioni di freddo, del controllo e dei loro rispettivi dopo il periodo di esposizione alla luce (recovery).

I campioni, di cui è noto il peso, sono stati immersi in 5 ml di soluzione di acetone all'80%, al fine di solubilizzare i pigmenti contenuti nelle plantule.

Successivamente i campioni sono stati mantenuti al buio e alla temperatura di 4°C per un periodo di una settimana.

Al termine del periodo di incubazione si è proceduto alla lettura spettrofotometrica del surnatante, utilizzando le lunghezze d'onda specifiche per ciascuna tipologia di pigmento.

In particolare le lunghezze d'onda utilizzate sono di 663.2, 648.8 e 470.0 nm, valori corrispondenti ai picchi di assorbimento rispettivamente della clorofilla a (chl a), della clorofilla b (chl b) e dei carotenoidi (car); il bianco è costituito dal solvente puro.

I valori di assorbanza (A_{λ}), ottenuti dalla lettura spettrofotometrica, permettono quindi di ricavare le concentrazioni dei tre pigmenti, in termini di $\mu\text{g/ml}$ di surnatante, attraverso il calcolo delle seguenti relazioni matematiche:

$$[\text{chl a}] \mu\text{g ml}^{-1} = (12.25 \cdot A_{663.2}) - (2.79 \cdot A_{648.8})$$

$$[\text{chl b}] \mu\text{g ml}^{-1} = (21.50 \cdot A_{648.8}) - (5.10 \cdot A_{663.2})$$

$$[\text{car}] \mu\text{g ml}^{-1} = [(1000 \cdot A_{470.0}) - (1.82 [\text{chl a}] + 85.02 [\text{chl b}])] / 198$$

Al fine di trovare le concentrazioni dei pigmenti relativamente all'unità di peso fresco (PF) del materiale vegetale, i valori ottenuti vengono quindi rapportati al peso di ciascun campione e al volume totale di surnatante ($V_{\text{surn.}}$) secondo la seguente relazione:

$$[\text{pigmento}] \mu\text{g g}^{-1} = (V_{\text{surn.}} / \text{PF}) \cdot [\text{pigmento}] \mu\text{g ml}^{-1}$$

5.3 RISULTATI

La concentrazione della clorofilla a (chl a), della clorofilla b (chl b) e dei carotenoidi (car) è stata espressa in rapporto al peso fresco del materiale vegetale di partenza.

I dati ottenuti attraverso l'analisi spettrofotometrica hanno consentito di confrontare le concentrazioni dei pigmenti nei vari campioni.

E' stato quindi elaborato il seguente grafico (Fig. 5.1) al fine di evidenziare le differenze riscontrate nei risultati.

Risulta immediatamente evidente come nei campioni al buio, sia nel controllo a 23°C che nella semina a 4°C, vi sia una quasi totale assenza di ogni tipo di pigmento, e di come questi vengano prodotti prontamente dalle plantule al momento dell'esposizione alla luce.

Al momento del primo prelievo, 7 giorni per il controllo e 30 giorni per la semina a basse temperature, si riscontra un contenuto analogo sia di clorofilla che di carotenoidi: ciò indica, in entrambi i casi, una pronta ripresa dell'attività vegetativa e dell'avvio dei processi di fotosintesi da parte delle plantule.

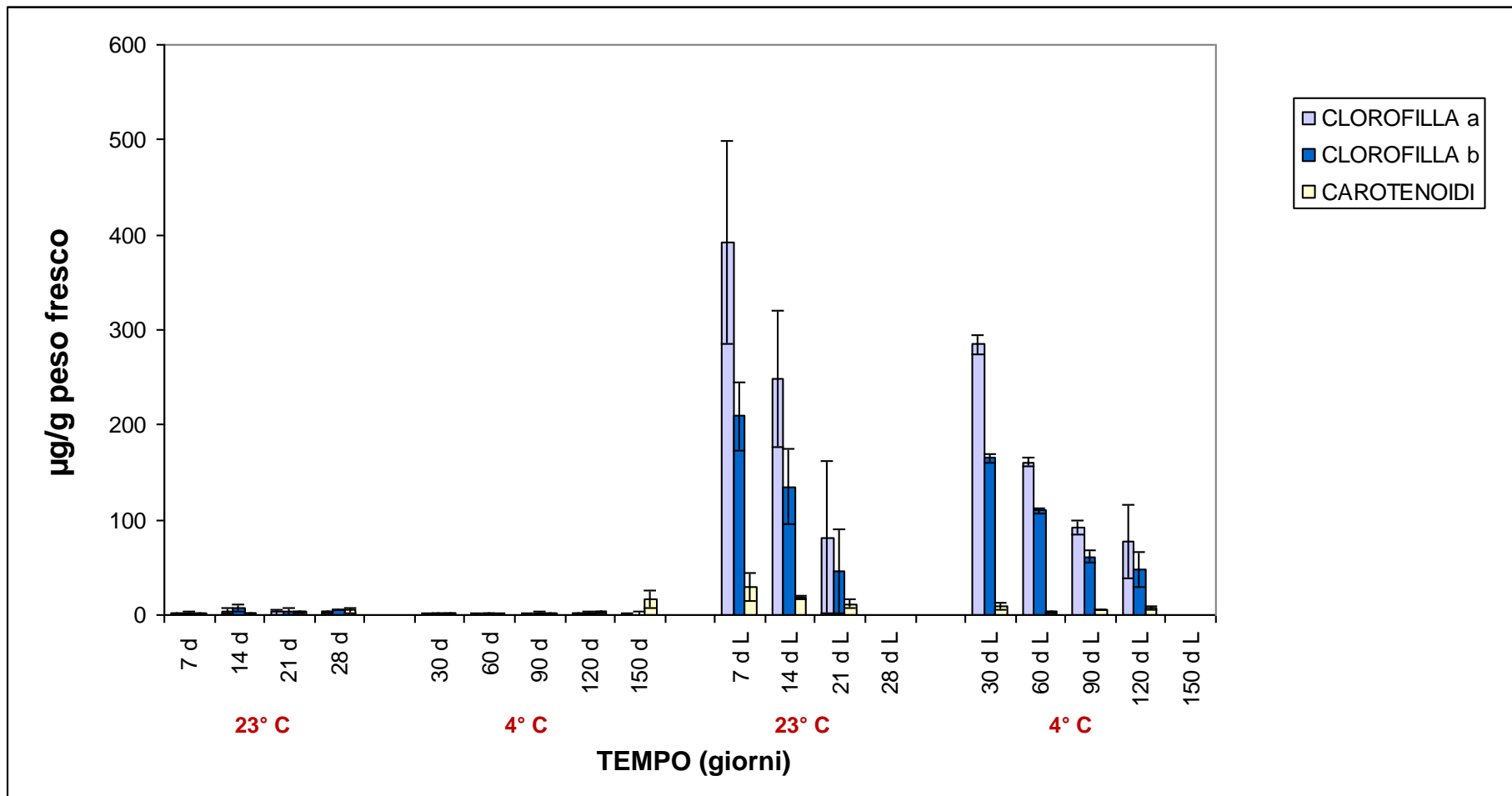


Figura 5.1 Contenuto dei pigmenti fogliari (clorofille e carotenoidi) nelle plantule della semina a 4° C, del controllo a 23° C e delle rispettive recovery (L).

La tendenza, in entrambi i casi, è quella di diminuire progressivamente il contenuto dei pigmenti fogliari con un andamento tendenzialmente analogo, ma con tempistiche differenti, dovute alla diversa capacità di sopravvivenza delle plantule sottoposte alle diverse condizioni ambientali.

A 4°C infatti, le plantule, sono in grado di sintetizzare tali pigmenti sino a 120 giorni dalla semina, con un quantitativo simile a quello riscontrato nel prelievo a 21 giorni dalla semina nelle plantule del controllo.

Dopo questi termini di tempo, le plantule non sono più in grado di riprendersi se trasferite alla luce, e quindi di sintetizzare i pigmenti analizzati.

Capitolo 6

6.1 ANALISI DEL CONTENUTO IN AMIDO

L'amido è il principale polisaccaride immagazzinato degli endospermi delle graminacee come sostanza di riserva e rifornisce l'embrione di zuccheri solubili, prevalentemente di glucosio, durante il processo della germinazione, attraverso la sua idrolizzazione.

Il processo di degradazione dell'amido è controllato da complessi meccanismi che coinvolgono sia la regolazione ormonale che quella metabolica (Perata *et al.* 1998), e viene provocato da un gruppo di enzimi, quali l' α -amilasi, la β -amilasi, l'enzima deramificante e l' α -glucosidasi (Dunn, 1974; Sun & Henson, 1991).

Degli enzimi presenti durante il processo di germinazione, l' α -amilasi è il più importante nel degradare i granuli di amido immagazzinati all'interno dei semi come riserva: anche l' α -glucosidasi è in grado di sostenere il processo, ma l' α -amilasi gioca un ruolo maggiore e, quindi, viene considerato l'enzima chiave (Dunn, 1974; Sun & Henson, 1991).

Comunque sia è l'azione integrata di tutto il gruppo enzimatico che consente l'approvvigionamento delle vie metaboliche, e quindi anche della germinazione: in assenza di essi il processo non può avvenire.

La germinazione può essere considerata terminata quando si osserva la fuoriuscita dei tessuti embrionali dai tegumenti esterni, tuttavia lo sviluppo successivo della plantula dovrà comunque essere sostenuto dall'utilizzo delle riserve, per un periodo più o meno lungo, sino al raggiungimento della sua autonomia autotrofa (Alpi, 2004).

Quindi, alla luce del comportamento delle plantule di orzo sottoposto a condizioni di basse temperature, è importante determinare il contenuto di questa forma di riserva per comprendere il comportamento in queste particolari condizioni ambientali.

6.2 PROCEDIMENTO

Per determinare il contenuto in amido negli endospermi dei campioni presi in esame, le cariossidi di orzo var. *Nure*, è stato utilizzato un metodo di analisi che sfrutta l'assorbimento di una specifica lunghezza d'onda da parte dello iodio, sostanza indicatrice specifica dell'amido.

L'amido è un polimero costituito da due tipi di molecole: l'amilosio (circa il 20-30 %) e l'amilopectina (che costituisce il 70-80 %).

L'amilosio, cioè la frazione non ramificata, è formata da una catena di molecole di glucosio collegate tra loro che si stabilizza formando una struttura ad elica.

Lo iodio si inserisce all'interno di questa elica, provocando la variazione di colore della soluzione in base alla quantità di amido presente.

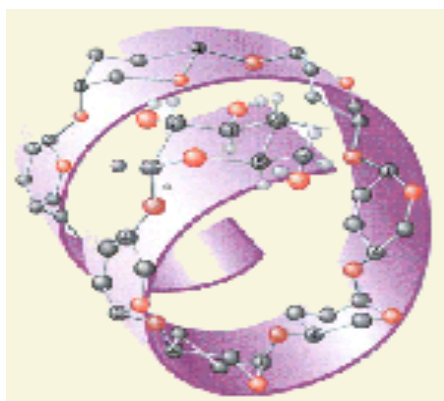


Figura 6.1 Struttura dell'amido (amilosio).

Sono stati analizzati gli endospermi posti a germinare a 4°C e quelli del controllo a 23°C .

E' stato inoltre previsto un campione a "tempo zero", costituito da cariossidi completamente disidratate.

Come primo passaggio per l'analisi, il materiale vegetale viene omogenato finemente.

Ogni campione omogenato è stato quindi risospeso in 40 ml di KOH 10 mM.

La sospensione così ottenuta deve essere portata ad ebollizione nel forno a microonde per un minuto, al fine di solubilizzare l'amido contenuto nei campioni.

Al termine di questa operazione sono stati aggiunti, ad ogni singolo campione, 400 µl di HCl 1 N al fine di neutralizzare completamente la soluzione.

Prima di procedere alla lettura spettrofotometrica occorre preparare una serie di standard a cui i campioni devono essere paragonati.

A questo scopo è stata quindi approntata una soluzione costituita da 50 mg di amido solubile (proveniente da patata, Sigma Aldrich) diluito in 50 ml di H₂O, solubilizzato previa bollitura nel microonde per un minuto.

Gli standard vengono preparati come di seguito:

0, 20, 40, 60, 80 e 100 µl della soluzione di amido precedentemente preparata, portati a volume di 100 µl con H₂O.

Agli standard sono stati quindi aggiunti 50 µl di soluzione "neutralizzata", costituita da 100 ml di KOH 10 mM più 1 ml di HCl 1 N, con lo scopo di creare le stesse condizioni dei campioni.

Per i campioni si utilizzano 50 µl di estratto e a questo si aggiungono 100 µl di H₂O.

Come ultimo passaggio è stata aggiunta agli standard e ai campioni 1 ml di soluzione di iodio, ottenuta diluendo la soluzione madre (K₂ 1,3 % - KI 3 %) 1: 10 con H₂O.

Il materiale, dopo un'attesa di alcuni minuti, è quindi pronto per la lettura allo spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 595 nm, assorbanza specifica per lo iodio.

Il volume degli standard utilizzati corrisponde alla loro quantità espressa in µg.

Quindi, dopo le opportune elaborazioni matematiche, è stato possibile ricavare la quantità di amido presente nei singoli campioni.

6.3 RISULTATI

Attraverso la curva di riferimento elaborata con i valori di assorbanza degli standard alla lunghezza d'onda di 595 nm, è stato possibile estrapolare il contenuto di amido dei campioni sui 50 µl di estratto utilizzati.

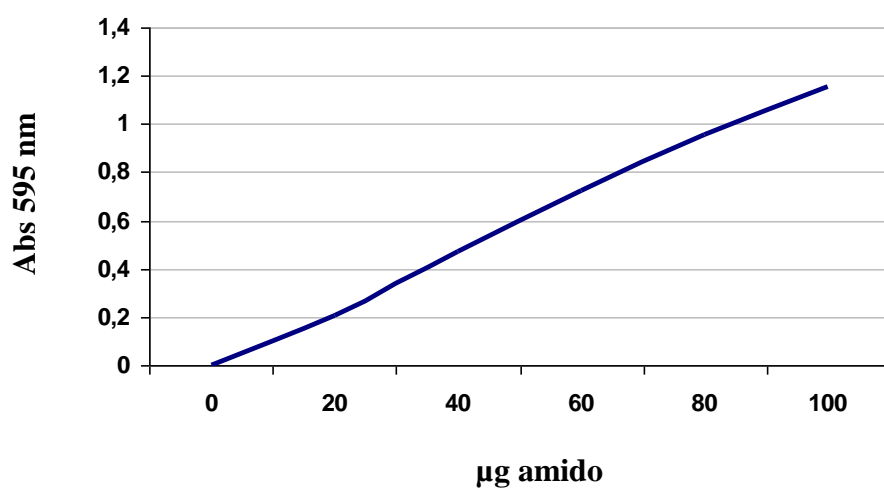


Figura 6.2 Curva di riferimento dell'amido.

Il valore ottenuto è stato successivamente rapportato ai 50 ml di soluzione estratta inizialmente, e quindi al peso del singolo campione.

Dai dati derivati è stato quindi possibile elaborare il seguente grafico (Fig.6.3), al fine di evidenziare l'andamento del contenuto in amido nei campioni in esame.

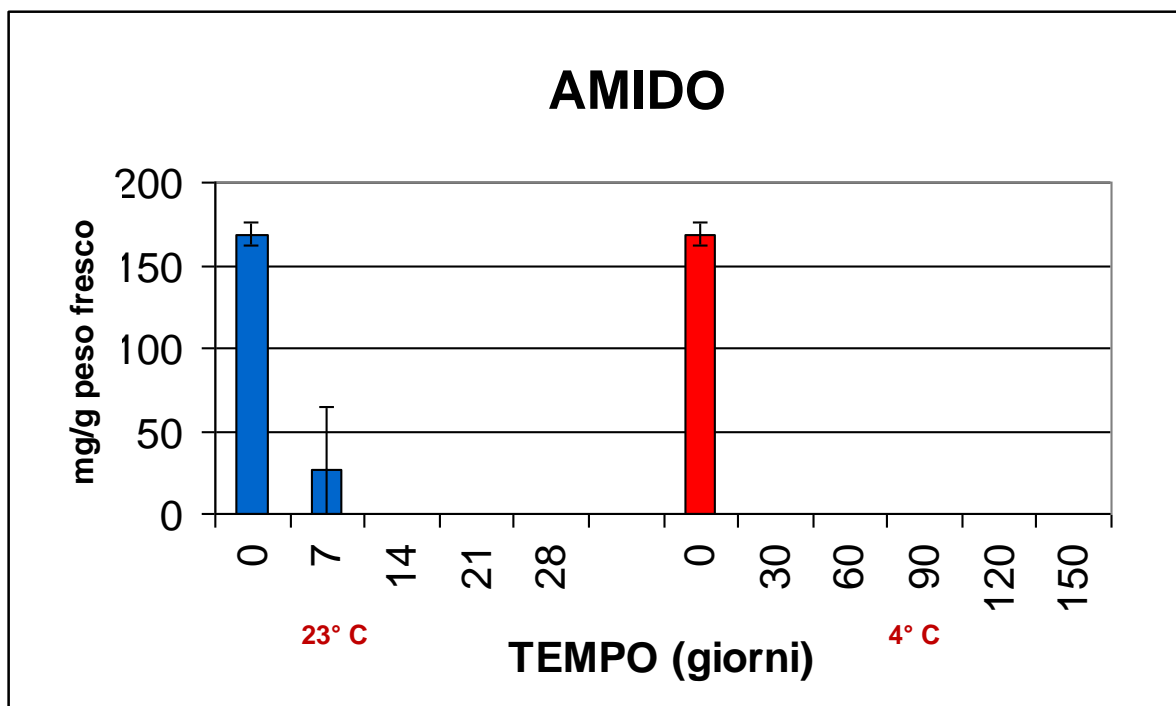


Figura 6.3 Contenuto in amido degli endospermi di orzo relativi al controllo a 23°C (serie in blu), e alla semina a 4°C (serie in rosso).

Dal grafico ottenuto è possibile comprendere il comportamento del materiale vegetale circa la mobilitazione e l'utilizzo dell'amido nei processi germinativi nelle due differenti condizioni.

Risulta evidente come, nelle cariossidi del tempo zero, vi sia presente l'amido sotto forma di sostanza di riserva che non è stata ancora mobilitata, in quanto non è stato attivato il processo germinativo.

Queste riserve vengono mobilizzate a seguito dell'avvio dei processi germinativi e, nel caso del controllo a 23°C, si presentano notevolmente "intaccate" dopo soli 7 giorni dalla semina.

Per questa serie di campioni il contenuto in amido si azzerava completamente nel periodo di tempo che intercorre tra il settimo giorno ed il quattordicesimo.

Questo processo avviene anche nelle cariossidi poste a condizioni di basse temperature e, nel caso specifico, il totale esaurimento delle riserve amilacee viene registrato nel primo campionamento a 30 giorni.

Il dato ottenuto risulta quindi essere notevolmente importante, in quanto le

plantule sviluppate a 4°C sono in grado di mantenersi vitali, in condizioni di totale assenza di rifornimento da parte dell'endosperma, già a partire da prima del primo prelievo, e quindi da prima dei 30 giorni dalla semina.

Questa particolare condizione si mantiene, inoltre, per un periodo di tempo molto più lungo rispetto al materiale vegetale del controllo: le plantule a 4° C, infatti, risultano in grado di “riattivare” i processi metabolici sino a 120 giorni dalla semina, contro i 21 del caso del controllo a 23° C.

Rispetto ai dati rilevati riguardo a *Festuca arundinacea* sottoposta a condizioni analoghe (Damiani, 2005), l'orzo termina le proprie riserve di amido in tempi molto più brevi (30 giorni contro i 210 di *Festuca arundinacea*); occorre comunque ricordare che i tempi di sopravvivenza di *Festuca* risultano notevolmente più lunghi rispetto a quelli dell'orzo: la prima, infatti, presenta capacità di ripresa a 4° C sino a 400 giorni, la seconda sino a 120 giorni.

Capitolo 7

7.1 ANALISI ENZIMATICA DEGLI ZUCCHERI LIBERI

Al momento della germinazione ha luogo una breve fase eterotrofa alimentata dalle riserve immagazzinate durante la formazione del seme.

Infatti, proprio durante l'accrescimento dei semi, vengono attuati processi di accumulo di sostanze necessarie a sostenere questa fase.

Nelle cariossidi di orzo la riserva maggiormente rappresentata è l'amido, ed è proprio attraverso il catabolismo di questa sostanza che si liberano esosi che entrano nella via glicolitica.

Per determinare la presenza degli zuccheri solubili all'interno dei campioni in analisi occorre, per prima cosa, estrarre questi metaboliti dal materiale vegetale, procedimento eseguito secondo la modalità descritta successivamente.

L'analisi è stata condotta sugli endospermi e sui coleoptili dei campioni sottoposti a condizioni di basse temperature e del controllo a 23°C, e dei coleoptili sottoposti a periodo di "inverdimento" dopo 7 giorni (recovery).

7.2 ESTRAZIONE DEGLI ZUCCHERI LIBERI

Il procedimento prevede lo sfarinamento del materiale vegetale mediante l'utilizzo di azoto liquido al fine di ridurre i campioni in una polvere fine e facilitare l'estrazione dei metaboliti.

Il materiale ridotto in polvere deve essere sospeso in HClO_4 5,5 %: occorrono 6 ml di acido per ogni grammo di materiale vegetale utilizzato.

I campioni vengono quindi mantenuti a 4° C per circa un'ora e, successivamente, vengono centrifugati a 14.000 giri per 10 minuti.

Dopo questo passaggio viene recuperato il surnatante, il quale deve essere neutralizzato con K_2CO_3 3,5 M in quantità pari ad un decimo della quantità di acido utilizzata.

Questo passaggio è necessario per creare un estratto acquoso (l'aggiunta della base provoca la formazione di sale e rilascio di anidride carbonica) ed eliminare l'acido in eccesso.

Successivamente si procede con il controllo del pH, che deve essere compreso indicativamente tra 6,5 e 7,5, affinché gli enzimi che verranno utilizzati per la quantificazione dei metaboliti, i quali necessitano di un pH neutro o sub-acido, possano funzionare.

Dopo l'aggiunta della base si ha una seconda attesa di un'ora, durante la quale i campioni sono nuovamente mantenuti a 4° C.

I campioni vengono quindi nuovamente centrifugati al massimo dei giri per 15 minuti, e ne viene recuperato il surnatante al fine di eliminare il sale formatosi dopo l'aggiunta della base.

Durante la fase del recupero viene inoltre effettuata la quantificazione del surnatante, operazione necessaria al calcolo della concentrazione esatta degli zuccheri liberi.

I campioni vengono quindi mantenuti a -20° C per una notte o comunque sino al momento della successiva fase dell'analisi.

7.3 DETERMINAZIONE ENZIMATICA DEGLI ZUCCHERI LIBERI

Effettuata l'estrazione degli zuccheri liberi si procede alla loro determinazione quantitativa attraverso un metodo che sfrutta l'azione di enzimi ancillari e letture spettrofotometriche.

L'analisi si basa sull'utilizzo di quattro enzimi differenti, che nella loro azione portano alla riduzione del NAD a NADH, il quale, nella forma ridotta, ha un'assorbanza specifica a 340 nm.

Il primo enzima è l'esochinasi che catalizza la fosforilazione del glucosio a glucosio-6-fosfato, con ATP come donatore di gruppo fosforico.

Lo stesso enzima catalizza anche la fosforilazione del fruttosio a fruttosio-6-fosfato (anche in questo caso l'ATP dona il proprio gruppo fosforico, trasformandosi in ADP).

Dal fruttosio-6-fosfato si ha l'isomerizzazione reversibile in glucosio 6-fosfato grazie all'azione dell'enzima fosfoglucosio isomerasi.

A questo punto si ottiene un prodotto comune derivato dal fruttosio e dal glucosio, il glucosio 6-fosfato, che viene deidrogenato grazie all'azione dell'enzima glucosio 6-fosfato deidrogenasi.

L'accettore degli elettroni di questa reazione è il NAD che si riduce a NADH, e viene utilizzato per la determinazione spettrofotometrica.

Il quarto enzima utilizzato agisce a pH acido: è l'invertasi, che catalizza la scissione del saccarosio a fruttosio e glucosio; successivamente a questo passaggio le reazioni proseguono come nei casi precedenti.

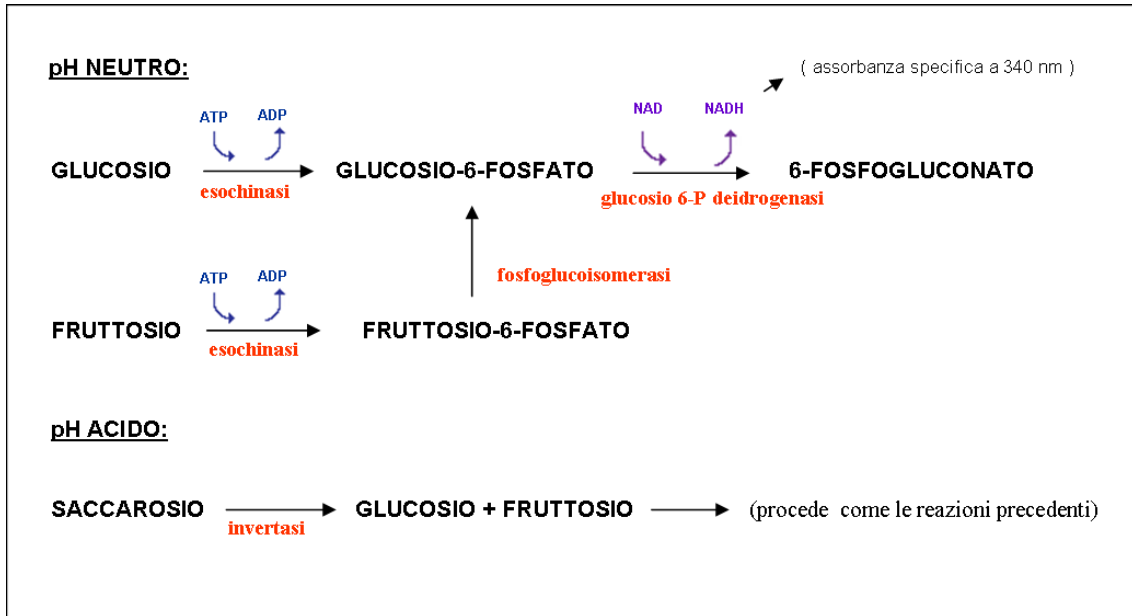


Figura 7.1 Schema generale dell'azione degli enzimi che agiscono nella determinazione enzimatica degli zuccheri liberi.

Per la determinazione viene utilizzato il materiale estratto secondo il metodo descritto nel paragrafo precedente, relativo agli endospermi della semina a 4°C e del controllo a 23° C, e dei coleptili a 4° C e a 23° C con i rispettivi recovery.

Ogni singolo campione viene preparato in duplicato e, per ognuno di essi, vengono preparate due serie costituite da un'aliquota di soluzione estratta pari a 10 µl.

Ogni campione viene portato al volume di 200 µl con H₂O distillata.

Per procedere con l'analisi spettrofotometrica, occorre preparare una serie di standard a cui i campioni sotto esame verranno comparati.

Gli standard sono costituiti da una soluzione di glucosio costituita da 1 mg di glucosio diluito in 1 ml di H₂O distillata: con questa soluzione si preparano i campioni utilizzati per la curva di taratura.

Ogni standard contiene una quantità nota di glucosio, a cui corrisponde un certo numero di moli: le quantità di glucosio e le moli corrispondenti sono indicate nella seguente tabella.

µl di GLUCOSIO	nmoli di GLUCOSIO
0 µl	0 nmoli
5 µl	28 nmoli
10 µl	56 nmoli
20 µl	112 nmoli
40 µl	224 nmoli
80 µl	448 nmoli
160 µl	896 nmoli

Occorre quindi preparare le soluzioni contenenti i vari enzimi, con cui verranno incubati i campioni da analizzare e che agiranno secondo le modalità già descritte in precedenza.

Per comodità vengono fornite le composizioni delle soluzioni per un quantitativo di dieci campioni, quindi la quantità effettiva deve essere adeguata al numero dei campioni da analizzare.

SOLUZIONE A :

1 ml di soluzione tampone Na-acetato 50 mM a pH 4,6

800 U di invertasi liofilizzata

SOLUZIONE B:

1 ml di tampone Na-acetato 50 mM a pH 4,6

SOLUZIONE C:

4 ml di tampone Tris-HCl 300 mM a pH 7,6

3 ml di MgCl₂ 10 mM

15 mg di ATP

6 mg di NADP

10 U di esochinasi

10 U di glucosio 6-fosfato deidrogenasi

SOLUZIONE D:

100 µl di tampone Tris-HCl 300 mM a pH 7,6

20 U di fosfo-gluco-isomerasi

Una serie di duplicati viene quindi incubata con 100 µl della soluzione A e l'altra serie con 100 µl della soluzione B.

Gli standard precedentemente preparati, vengono portati a volume di 200 µl con H₂O e a questi vengono uniti 100 µl della soluzione B.

E' stata quindi creata una serie di campioni posta ad incubare con la soluzione A, contenente invertasi che agisce a pH acido, scindendo il saccarosio in glucosio e fruttosio.

Agli altri campioni e agli standard è stata unita una soluzione tampone a pH acido; tutto il materiale è stato quindi posto a 37° C per circa trenta minuti.

Dopo questo periodo di attesa vengono uniti 700 µl della soluzione C a tutti i campioni e agli standard e il materiale viene nuovamente incubato a 37° C per altri 30 minuti.

Terminata l'attesa si procede con la lettura dell'assorbanza dei campioni allo spettrofotometro: il valore ottenuto è da comparare con quello degli standard.

Nella fase seguente si trattano solo i campioni a cui precedentemente erano state unite le soluzioni B e C: a questi si aggiungono 10 μ l della soluzione D e successivamente vengono incubati a 37° C per 15 minuti.

Dopo quest'ultimo passaggio viene letta l'assorbanza dei campioni trattati con la soluzione D alla lunghezza d'onda di 340 nm.

Al termine delle varie operazioni sono stati ottenuti i valori di assorbanza da cui si possono ricavare le quantità di zuccheri liberi presenti nel materiale vegetale derivato dai vari campionamenti.

Infatti, nei campioni trattati con le soluzioni B e C si trova il glucosio libero.

Nei campioni trattati con le soluzioni A e C invece si trova il glucosio libero insieme al glucosio derivante dal saccarosio scisso dall'invertasi.

Infine, nei campioni trattati con le soluzioni B, C e D si trova il glucosio libero e il fruttosio libero.

Per cui comparando i valori di assorbanza ottenuti con quelli della curva di riferimento si possono ottenere le moli contenute nei singoli campioni.

Quindi abbiamo il valore di ciascuna componente: la quantità del glucosio ricavabile dai campioni trattati con le soluzioni B e C; la quantità del saccarosio si ottiene con la differenza tra il valore dei campioni trattati con A e C e i campioni che contengono glucosio libero.

La quantità del fruttosio si ricava con la differenza del valore dei campioni trattati con le soluzioni B, C e D e i campioni che contengono il glucosio libero.

7.4 RISULTATI

Dai dati ricavati attraverso la lettura dell'assorbanza a 340 nm degli standard è stata ricavata una curva di riferimento dalla quale è stato possibile estrapolare la quantità di zuccheri liberi presenti all'interno dei campioni.

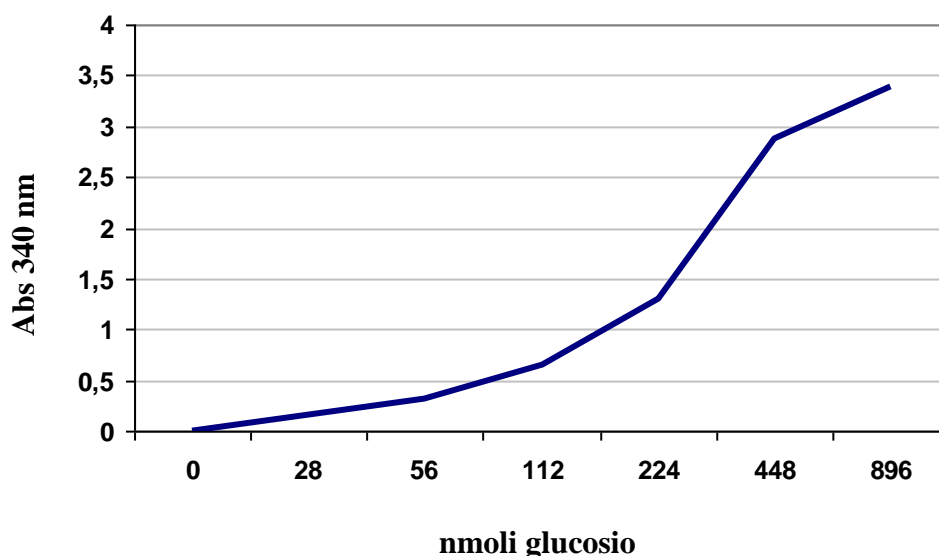


Figura 7.2 Curva di riferimento del glucosio.

Per quanto riguarda gli endospermi, sono stati elaborati i seguenti grafici (Fig. 7.3, 7.4, 7.5, 7.6).

E' stata rilevata, nelle cariossidi disidratate, che costituiscono il tempo zero, una elevata presenza di zuccheri liberi totali, costituiti prevalentemente da fruttosio e saccarosio.

Questo dato differisce dalla situazione di partenza di *Festuca arundinacea*, nelle cui cariossidi il livello di zuccheri liberi al tempo zero risulta quasi del tutto assente (Damiani, 2005).

Si registra un incremento di tale contenuto in corrispondenza del primo prelievo, 7 giorni per i campioni a 23° C e 30 giorni per quelli a 4° C, andamento che corrisponde con lo sviluppo delle plantule e della mobilitazione delle riserve di amido.

Nei prelievi successivi il contenuto di zuccheri totali diminuisce nettamente.

Analizzando il contenuto specifico di glucosio, fruttosio e saccarosio, si nota come questo andamento viene rispecchiato solamente per quanto riguarda il glucosio.

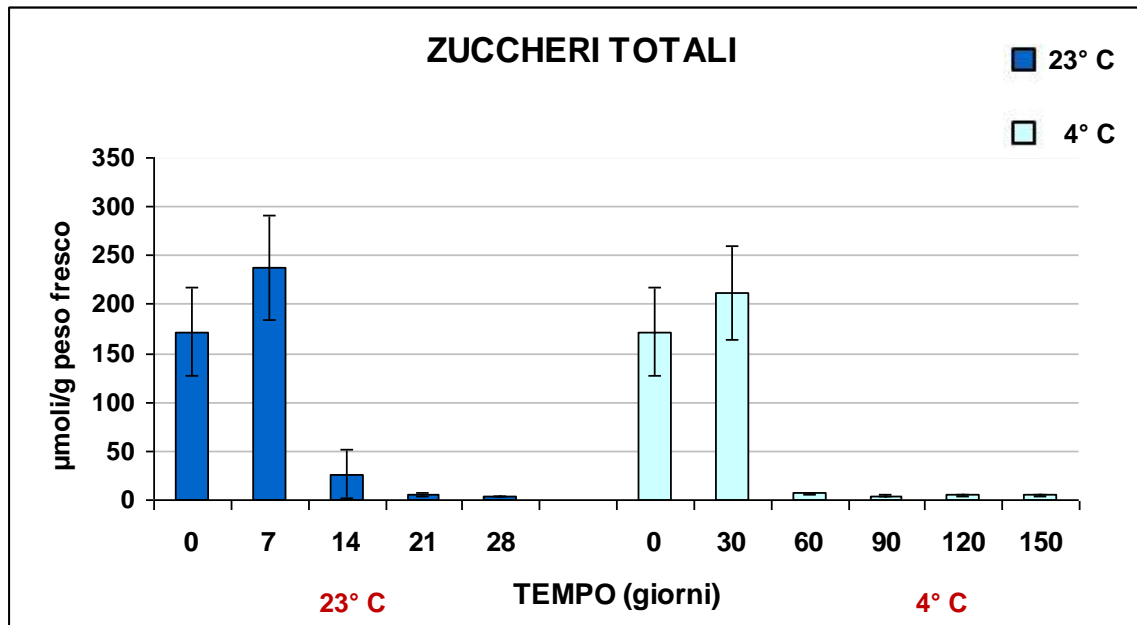


Figura 7.3 Contenuto degli zuccheri liberi totali negli endospermi di orzo: vengono confrontati i prelievi dei campioni a 23°C e a 4°C. Lo zero si riferisce al contenuto negli endospermi disidratati (tempo zero). I valori sono espressi in esosi equivalenti.

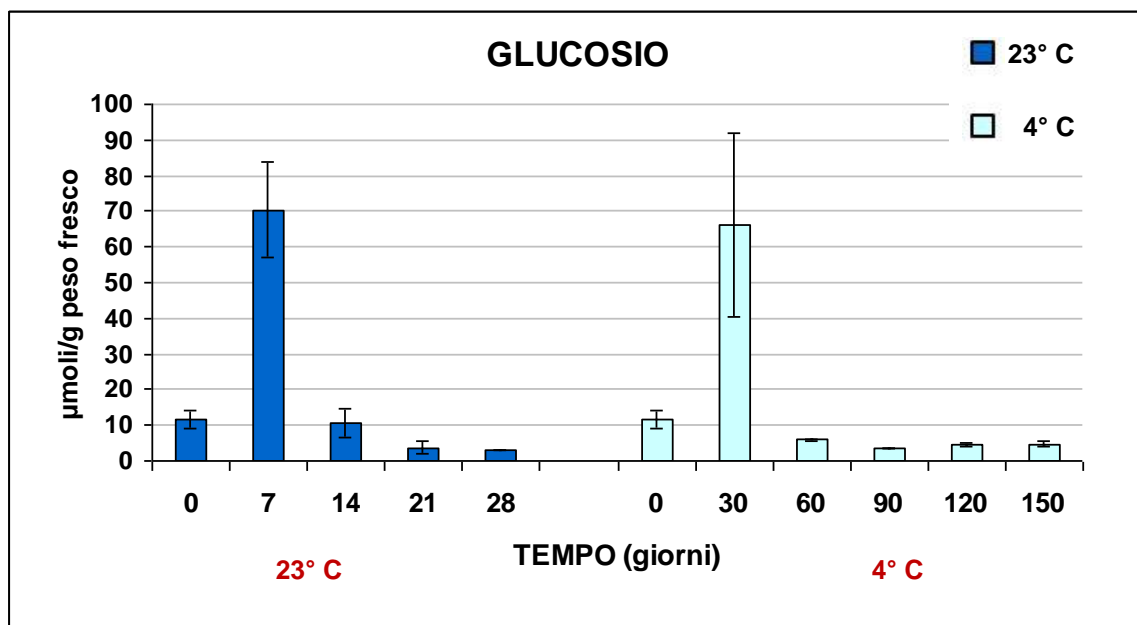


Figura 7.4 Contenuto di glucosio negli endospermi di orzo: vengono confrontati i prelievi dei campioni a 23°C e a 4°C. Lo zero si riferisce al contenuto negli endospermi disidratati (tempo zero). I valori sono espressi in esosi equivalenti.

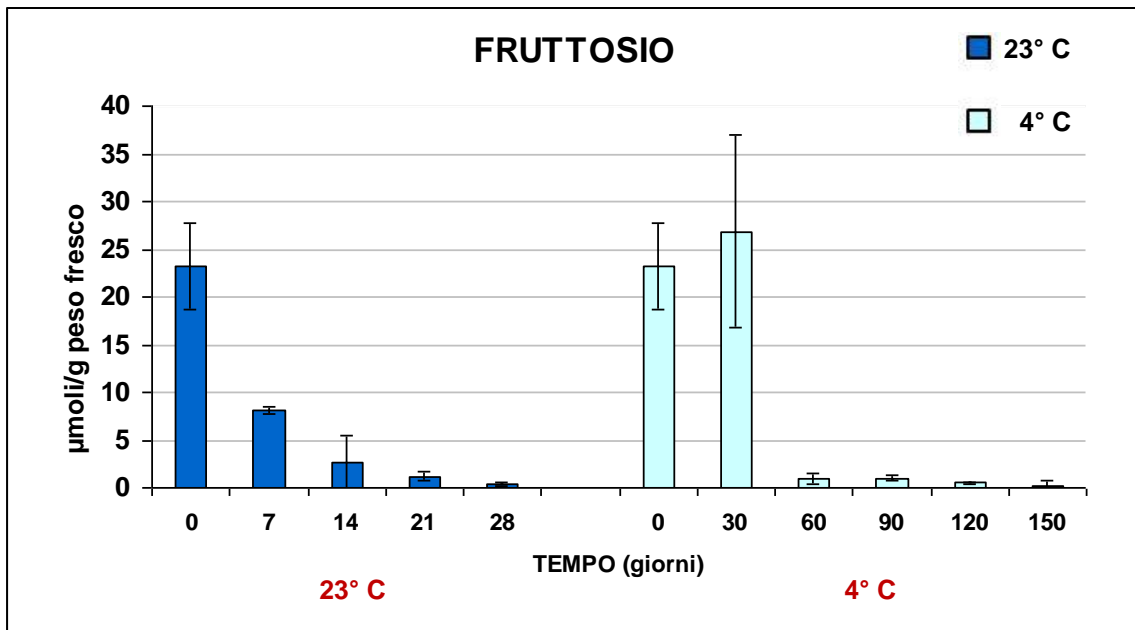


Figura 7.5 Contenuto di fruttosio negli endospermi di orzo: vengono confrontati i prelievi dei campioni a 23°C e a 4°C. Lo zero si riferisce al contenuto negli endospermi disidratati (tempo zero). I valori sono espressi in esosi equivalenti.

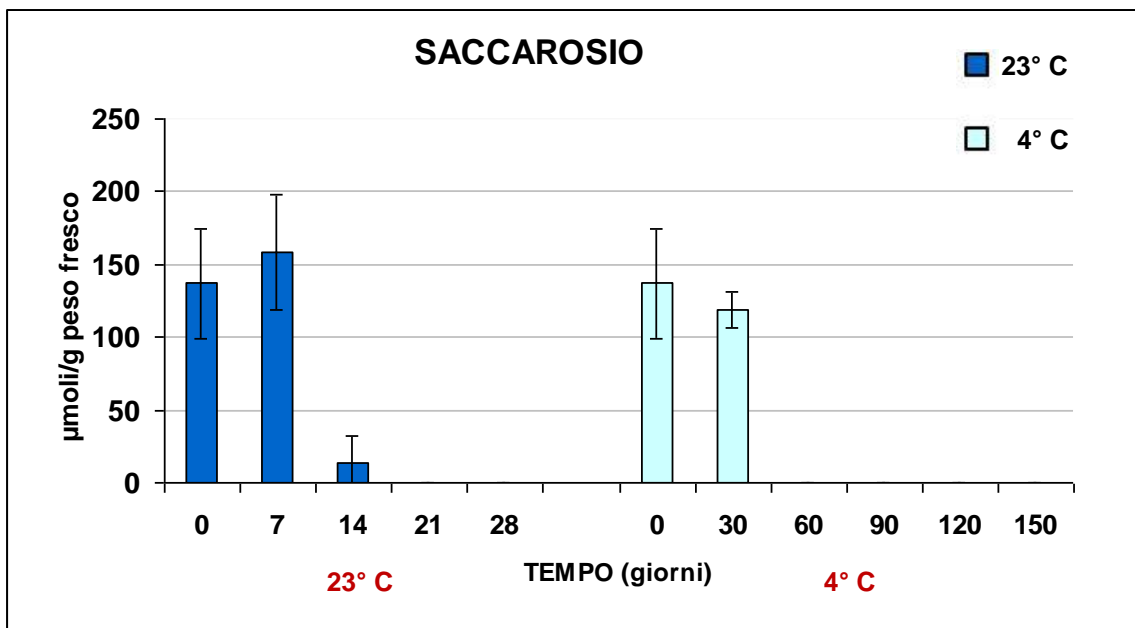


Figura 7.6 Contenuto di saccarosio negli endospermi di orzo: vengono confrontati i prelievi dei campioni a 23°C e a 4°C. Lo zero si riferisce al contenuto negli endospermi disidratati (tempo zero). I valori sono espressi in esosi equivalenti.

Differisce, infatti, l'andamento del fruttosio nei campioni a 23° C, dove si registra un suo decremento ad ogni prelievo.

Situazione invertita per il saccarosio, il quale decrementa nei campioni sottoposti a basse temperature e presenta invece un picco al primo prelievo in quelli a 23° C.

Il saccarosio scompare completamente negli endospermi ai 21 giorni per i campioni a 23° C e ai 60 di quelli a 4° C.

Il contenuto degli zuccheri liberi è stato valutato anche per quanto riguarda i coleptili che si sono sviluppati nell'ambito delle due tipologie di condizioni e nei rispettivi recovery: i risultati sono riportati nei seguenti grafici (Fig. 7.7, 7.8, 7.9, 7.10).

Si registra un picco del contenuto degli zuccheri totali al primo prelievo in entrambe le serie di campioni, in concomitanza con lo sviluppo dei coleptili ed in conseguenza della mobilitazione delle riserve degli endospermi.

Nei prelievi successivi dei coleptili al buio, gli zuccheri totali diminuiscono nettamente con valori prossimi allo zero, tendenza che comunque appare più graduale, dal secondo prelievo in poi (60 giorni), per quanto riguarda i campioni a 4° C.

Questo comportamento potrebbe essere correlato con una funzione osmoprotettiva di tali metaboliti, come reazione alle condizioni di basse temperature e come riscontrato nell'ambito di studi precedenti (Lerbogne *et al.*, 1995; Travert *et al.*, 1997).

Livelli molti bassi si registrano per gli zuccheri totali rilevati nei recovery di entrambe le serie: notevole differenza si denota, infatti, già al momento del primo prelievo.

Tale andamento è probabilmente dovuto all'utilizzo degli zuccheri per la ripresa vegetativa delle piante al momento del trasferimento alla luce.

Stesso comportamento è generalmente riscontrato nell'analisi del contenuto dei singoli zuccheri, con un picco massimo al primo prelievo e un decremento rilevante dal secondo in poi, con una tendenza meno "accentuata" per i campioni della semina a 4° C.

Nel contenuto totale degli zuccheri, al primo prelievo, lo zucchero tendenzialmente più rappresentato è il saccarosio, seguito dal glucosio; le maggiori differenze tra le serie si registrano, invece, per quanto riguarda il fruttosio che, al primo prelievo dei campioni a 23° C, è presente in quantità decisamente inferiori rispetto al contenuto delle plantule della semina a 4° C.

In generale si registra una certa analogia nel trend riscontrato nei coleptili di orzo e di *Festuca arundinacea* alla temperatura di 4°C: in entrambi i casi, infatti, viene

riscontrato un picco iniziale a cui segue una diminuzione di tali metaboliti con il trascorrere dei giorni.

Varia invece, a causa della diversa capacità di adattamento, il periodo di tempo entro cui si sviluppa questo andamento.

Non si denotano invece, al momento del primo prelievo, notevoli differenze nella concentrazione degli zuccheri, tra i campioni a 4°C e quelli a 23°C, come invece riscontrato in *Festuca arundinacea* (Damiani, 2005).

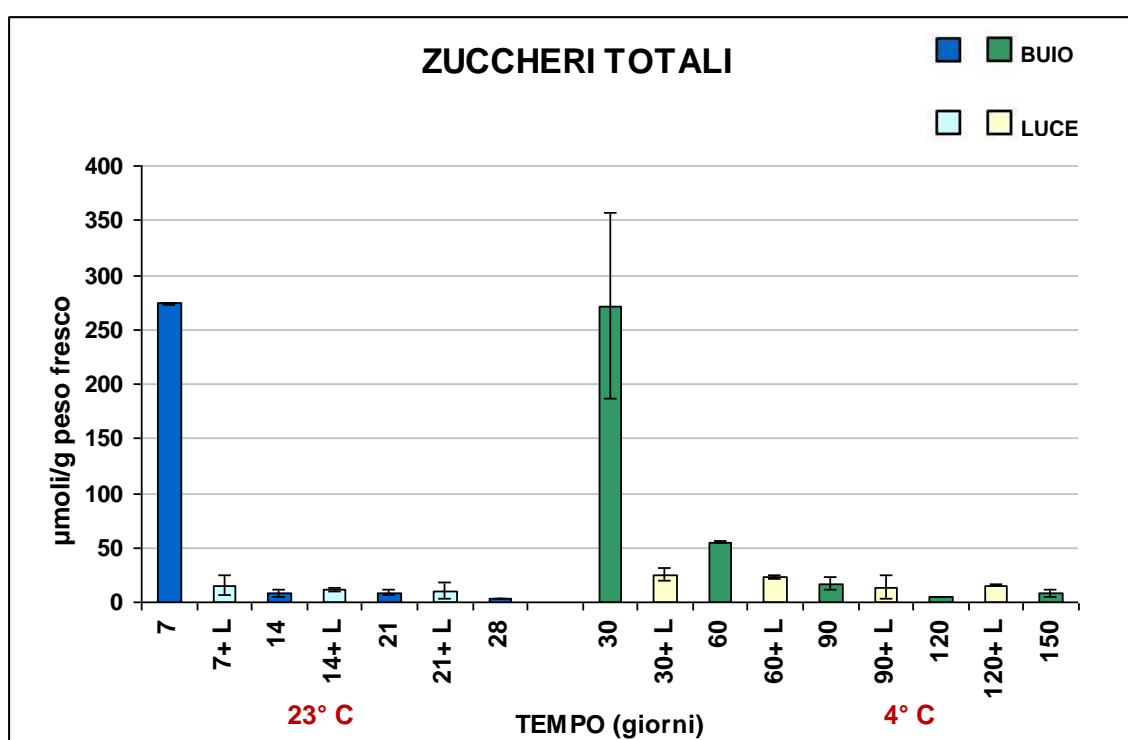


Figura 7.7 Contenuto degli zuccheri liberi totali nei coleptili di orzo: vengono confrontati i prelievi dei campioni a 23°C e a 4°C con i rispettivi recovery (+7 L). I valori sono espressi in esosi equivalenti.

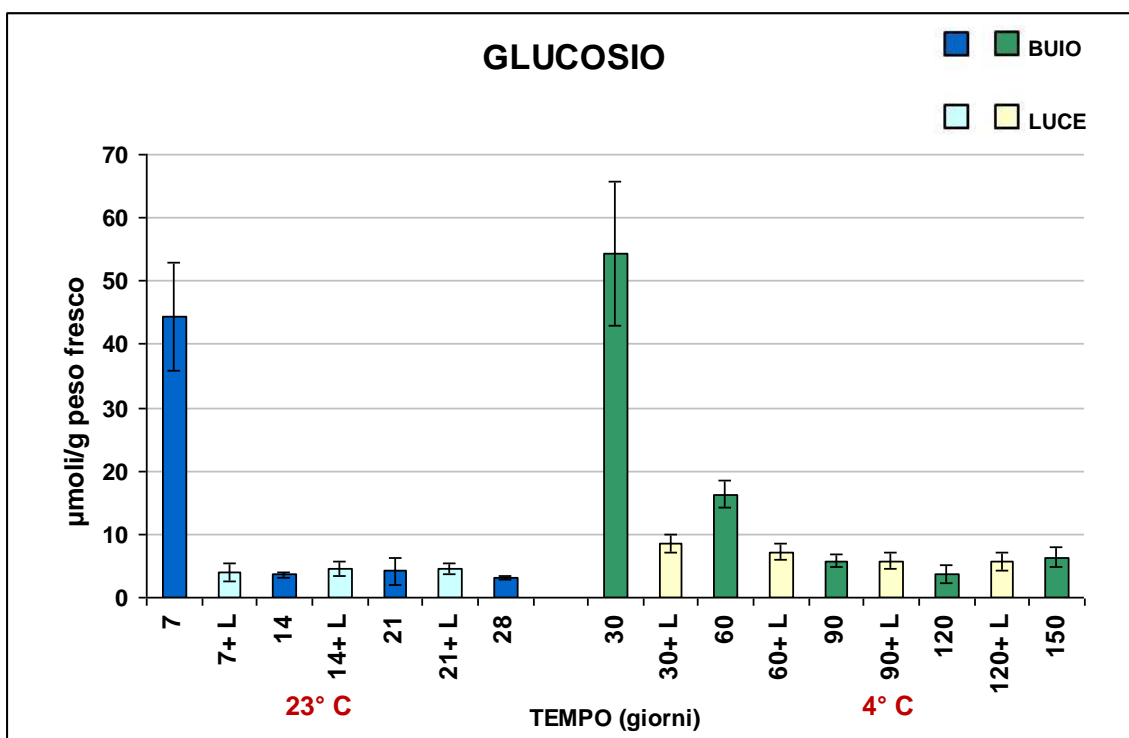


Figura 7.8 Contenuto di glucosio nei coleptili di orzo: vengono confrontati i prelievi dei campioni a 23°C e a 4°C con i rispettivi recovery (+7 L). I valori sono espressi in esosi equivalenti.

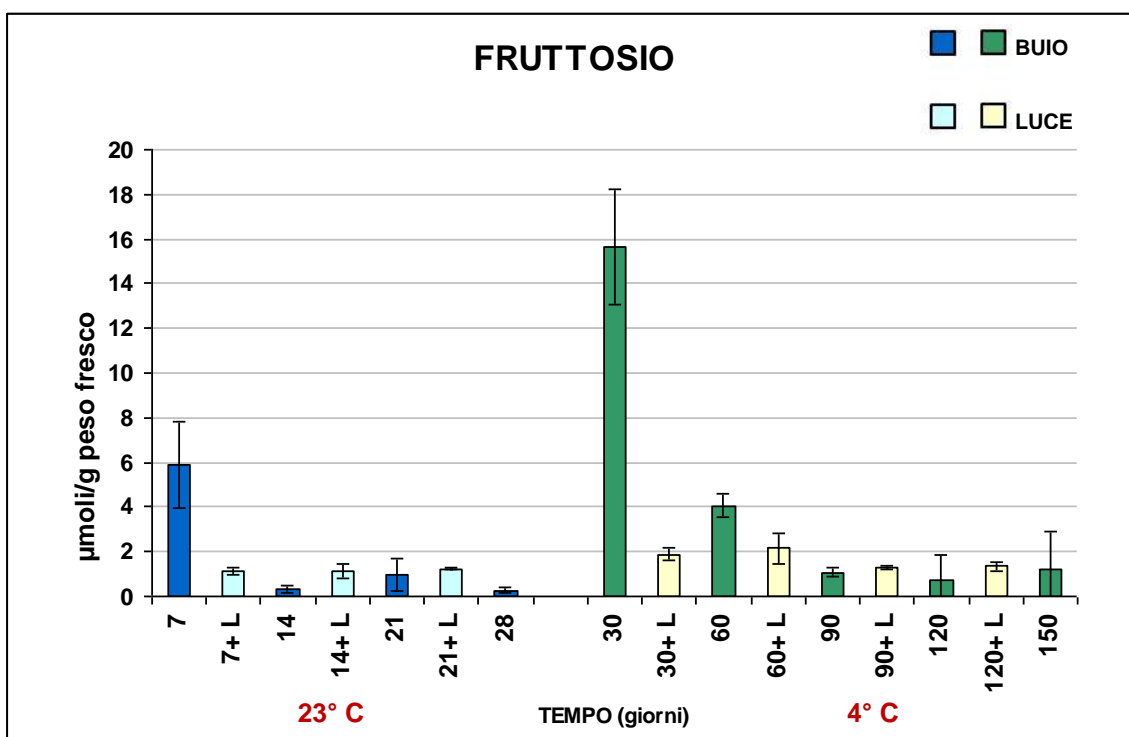


Figura 7.9 Contenuto di fruttosio nei coleptili di orzo: vengono confrontati i prelievi dei campioni a 23°C e a 4°C con i rispettivi recovery (+7 L). I valori sono espressi in esosi equivalenti.

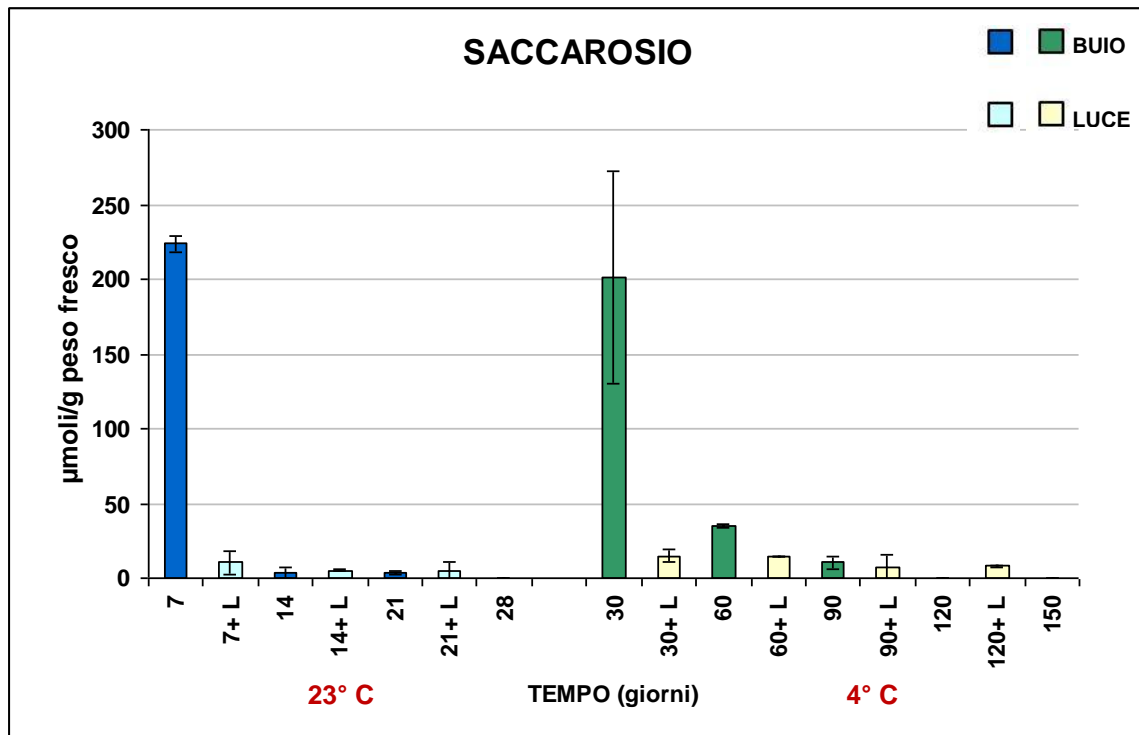


Figura 7.10 Contenuto di saccarosio nei coleptili di orzo: vengono confrontati i prelievi dei campioni a 23°C e a 4°C con i rispettivi recovery (+7 L). I valori sono espressi in esosi equivalenti.

Capitolo 8

8.1 ELETTROFORESI IN CONDIZIONI NATIVE **(NATIVE PAGE)**

Con il termine elettroforesi si va ad indicare la migrazione di particelle cariche dovuta all'influenza di un campo elettrico.

Esistono molte ed importanti molecole di interesse biologico quali gli aminoacidi, i peptidi, le proteine, i nucleotidi e gli acidi nucleici che possiedono gruppi ionizzabili e che quindi, a valori di pH specifici, si trovano in soluzione sotto forma di specie cariche elettricamente, sia come cationi che come anioni.

Quando si applica un campo elettrico attraverso una soluzione che contiene ioni, si sviluppa una corrente in cui queste particelle cariche migrano verso il catodo o verso l'anodo, a seconda della natura della loro carica.

Quindi l'elettroforesi è un processo tramite il quale le molecole cariche si separano nel campo elettrico in conseguenza delle loro diverse mobilità.

L'apparecchiatura richiesta per l'elettroforesi è costituita principalmente da due parti: un alimentatore e una cella elettroforetica (ne esistono di tipi che funzionano sia in verticale che in orizzontale).

Esistono quindi diverse tecniche elettroforetiche, adottabili a seconda del tipo di separazione che vuole essere effettuata sulle molecole in analisi; in questo caso, sui campioni in esame, è stata svolta un'elettroforesi in condizioni native, al fine di individuare l'attività biologica delle amilasi (attività amilolitica).

In questo caso l'analisi si svolge utilizzando come materiale di supporto un gel di poliacrilammide (come nel caso dell' SDS-PAGE), ma in assenza di SDS, in modo tale da non denaturare le proteine prima del caricamento.

Le proteine, secondo questo metodo, si separano in base alle loro differenti mobilità elettroforetiche e agli effetti di setaccio del gel e, successivamente, possono essere individuate grazie alla loro attività biologica, incubando il gel in una soluzione di substrato adatta.

Per procedere con l'elettroforesi le proteine devono essere precedentemente estratte e quantificate, secondo la metodologia descritta nel paragrafo seguente.

8.2 ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE PER ELETTROFORESI IN CONDIZIONI NATIVE

L'estrazione, effettuata in modo da mantenere la struttura nativa delle proteine, è stata condotta sugli endospermi della semina a 4° C e della semina di controllo a 23° C, entrambi in condizioni di buio.

E' stato previsto un "tempo zero" costituito dalle cariossidi di orzo disidratate.

Il materiale vegetale è stato omogenato con Tris HCl 100 mM a pH 6,8 e, successivamente, centrifugato per 10 minuti a 15.000 giri.

E' stato quindi recuperato il surnatante, contenente le proteine, e stoccato a -20° C in attesa della quantificazione.

Terminata la fase di estrazione delle proteine, queste ultime vengono quantificate utilizzando il metodo di Bradford.

Questo sistema si basa sull'azione del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250, che si lega alle proteine formando forti complessi covalenti, tramite interazioni elettrostatiche con gruppi amminici e carbossilici e tramite forze di van der Waals.

Il colorante si lega in modo specifico a residui di arginina, triptofano, tiroxina, istidina e fenilalanina e provoca uno spostamento del massimo di assorbimento a 595 nm in soluzioni acide (Bradford, 1976; Sedmark e Grossberg, 1977).

L'analisi è sensibile ed accurata e la procedura è rapida: è costituita da un unico passaggio in cui il colorante viene aggiunto ai campioni.

La curva di riferimento viene preparata utilizzando una soluzione standard di BSA (albumina di siero bovino) a concentrazioni note : 0, 5, 10, 15, 20 µg di BSA, più 1 ml di soluzione d'uso, costituita dal colorante Biorad diluito 1: 5 con H₂O distillata.

Vengono utilizzati 5 µl di estratto per ogni singolo campione da quantificare, a cui viene unito 1 ml della soluzione d'uso.

Il materiale è quindi pronto per la lettura allo spettrofotometro che si esegue a 595 nm, la lunghezza d'onda a cui il colorante legato alla proteina ha il suo massimo di assorbimento.

8.3 TRATTAMENTO DEI CAMPIONI PER ELETTROFORESI NATIVE-PAGE

Al fine di eseguire un'analisi relativa all'attività amilolitica dell'estratto dei campioni di orzo, e nello specifico di distinguere tra l'attività totale e la specifica attività α -amilasica di tali campioni, è necessario trattare il materiale secondo il procedimento descritto di seguito.

Per ogni campione vengono preparate due serie, una relativa all'estratto non denaturato e l'altra, trattata con il calore, in cui solo l' α -amilasi ha mantenuto la sua struttura nativa.

La seconda serie si ottiene unendo 50 μ l di campione estratto con 0,5 μ l di CaCl_2 1 M, e sottoponendo il tutto ad una temperatura di 70° C per 15 minuti: le alte temperature degradano le proteine contenute nei campioni, ad eccezione delle α -amilasi, le quali sono protette, a livello del loro sito attivo, dalla presenza di calcio aggiunto preventivamente.

Successivamente, a tutti i campioni viene aggiunto 1 volume di Sample Buffer (SB) ogni 2 volumi di campioni, la cui composizione viene riportata di seguito.

- Glicerolo 20%
- Tris HCl 200 mM pH 6,8
- Blu di Bromofenolo 0,20%

L'aggiunta di Blu di Bromofenolo ha la funzione di seguire l'andamento della corsa elettroforetica; il glicerolo ha, invece, la funzione di appesantire il campione e quindi di rendere la densità della soluzione del campione tale da stratificare facilmente attraverso il tampone elettroforetico sul fondo del pozzetto, al momento del caricamento (Wilson, Walker, 1995).

8.4 PROCEDIMENTO

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide viene detta anche PAGE, come abbreviazione di *PolyAcrilamide Gel Electrophoresis*.

Questo gel viene preparato mediante la copolimerizzazione di un monomero di acrilamide in presenza di piccole quantità di N, N' – metilenbisacrilamide (chiamata solitamente bis-acrilamide).

Durante la polimerizzazione dei monomeri di bis-acrilamide, di tipo testa-coda, si formano lunghe catene all'interno delle quali si posiziona occasionalmente una molecola di bis-acrilamide.

In questo modo si formano legami trasversali a formare un reticolo tridimensionale.

Le dimensioni medie dei pori di un gel di poliacrilamide possono essere controllate variando la quantità di monomero usato, oppure aumentando il grado di legami trasversali per ottenere pori più stretti (Wilson, Walker, 1995).

Quindi in ogni specifico gel verranno separate soltanto le proteine che sono in un particolare ambito di dimensioni.

I campioni che devono essere separati non vengono caricati direttamente all'interno del gel di separazione (*separating gel*), ma su un gel di impaccamento (*stacking gel*) più corto, che viene versato sull'estremità superiore del gel di separazione, e nel quale vengono formati i pozzetti di caricamento.

Lo *stacking gel* ha la funzione di concentrare il campione in una banda sottile prima che entri nel gel di separazione, scopo che si ottiene mediante pori del gel molto grandi (minore concentrazione di acrilamide) e pH differente dal *separating gel*.

La composizione dello *stacking gel* è la seguente:

Acryl/ bis Acryl (bis acrilamide) 30%	2,7 ml
Tris HCl 0,5 M pH 6,8	4,5 ml
H ₂ O distillata (DW)	10,62 ml
APS 10%	120 µl
TEMED	10 µl

Il gel di separazione (*separating gel*), dove avviene la separazione delle proteine, ha la seguente composizione:

Acryl/ bis Acryl (bis acrilamide) 30%	11,25 ml
Tris HCl 1,5 M pH 8,8	6,75 ml
H ₂ O distillata (DW)	8,7 ml
APS 10%	150 µl
TEMED	15 µl

Il gel viene formato tra due lastre di vetro separate tra loro grazie a degli spaziatori: gli spazi aperti, che potrebbero permettere la fuoriuscita della soluzione non ancora polimerizzata, vengono sigillati con una soluzione di agarosio all'1% diluito nel tampone di corsa.

La composizione del tampone di corsa è la seguente:

- Glicina 144 g
- Tris HCl 30,3 g
- H₂O distillata portare a 10 litri

Nella composizione del gel entrano a far parte il TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiammina, una base) e l' APS (ammonio persolfato) che sono due sostanze copolimerizzanti, che devono essere aggiunte come ultimo passaggio, perché insieme sono le responsabili della formazione del gel (altrimenti si avrebbe solamente una soluzione liquida).

Il TEMED catalizza la decomposizione dello ione persolfato con la produzione di un radicale libero.

I radicali liberi sono specie chimiche altamente reattive a causa della presenza di un elettrone spaiato, che deve accoppiarsi con un altro elettrone per stabilizzare la molecola.

Quindi si formano legami singoli tra il radicale libero e una molecola del monomero dell'acrilamide.

Questa condivisione di elettroni da parte delle due molecole comporta la formazione di un nuovo radicale libero che si legherà ad una seconda molecola di monomero, e così via sino alla formazione di lunghe catene di acrilamide (Wilson, 1995).

La soluzione viene poi messa all'interno dello spazio tra le due lastre di vetro, precedentemente preparate, fino alla completa polimerizzazione che avviene generalmente in circa 1 ora (per evitare che la soluzione evapori si stende un sottile velo di butanolo sulla parte a contatto con l'aria).

Al termine si procede, previa eliminazione del butanolo, a colare lo stacking gel sopra il separating gel precedentemente polimerizzato.

All'interno dello stacking gel viene posto un pettine spaziatore in grado di creare, a polimerizzazione avvenuta, i pozzetti di caricamento dei campioni.

Terminata la preparazione del gel, i campioni vengono caricati negli appositi pozzetti, in quantità corrispondente a 2 µg di proteina.

Il macchinario utilizzato per la corsa elettroforetica è un OWL P9DS (CWI Separation System Inc., Portsmouth, NH, USA), un sistema elettroforetico verticale, e le condizioni di corsa impostate sono le seguenti:

Volts	mAmpere	Watt	Tempo (ore)
1000 V	75 mA	150 W	2 h

Terminata la corsa elettroforetica si procede alla colorazione del gel, al fine di rivelare le proteine presenti.

In questo caso, avendo lavorato in condizioni native (cioè non denaturanti), è possibile individuare una particolare proteina sulla base della sua attività biologica e, nel caso specifico degli endospermi di orzo, in base alla loro attività amilasica.

In un primo passaggio, il gel con le proteine separate, viene immerso in una soluzione di amido che satura il gel stesso .

La soluzione di amido 1% è composta da:

- Na acetato 50 mM pH 5,2 250 ml
- CaCl₂ 1 M 2,5 ml
- Amido 2,5 g

Il gel viene lasciato ad incubare sommerso da questa soluzione per 2 ore, in modo tale che tutto il gel ne venga saturato.

Terminato il tempo di attesa viene eliminato l'amido in eccesso con un passaggio di 45 minuti in una soluzione identica alla precedente, ma priva di amido.

Successivamente si passa alla colorazione con una soluzione a base di iodio (I₂ 1,3 % - KI 3 %), sostanza che funziona come indicatore specifico per l'amido.

Il colorante in eccesso viene eliminato mediante ripetuti passaggi in H₂O distillata, sino a che risultano evidenti le singole bande.

Il gel risulterà, quindi, colorato solo dove l'attività amilasica non risulta presente: nelle altre zone, dove l'amido è stato degradato dagli enzimi, il gel si presenterà trasparente.

8.5 RISULTATI

Al termine dell'analisi si ottengono due gel, uno relativo all'attività amilasica totale e l'altro relativo all'attività α -amilasica, dell'estratto degli endospermi di orzo posto a germinare a 4° C e del controllo a 23° C.

La figura ottenuta è stata elaborata in negativo per rendere maggiormente evidenti le singole bande.

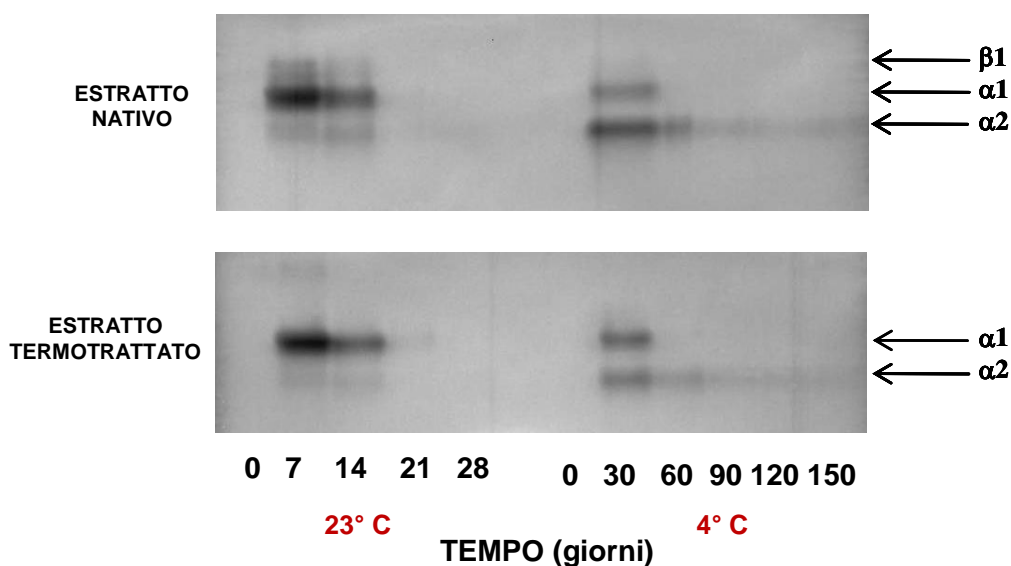


Figura 8.1 Gel relativi all'attività amilasica totale (in alto), derivata dall'elettroforesi dell'estratto nativo, e all'attività α -amilasica (in basso) dei campioni trattati con il calore e CaCl_2 .

E' stata, inoltre, eseguita un'analisi densitometrica delle singole bande espresse, mediante un software specifico, in modo da quantificare l'espressione dei singoli enzimi; con i risultati ottenuti sono stati elaborati dei grafici che esprimono l'intensità delle singole bande in valore percentuale.

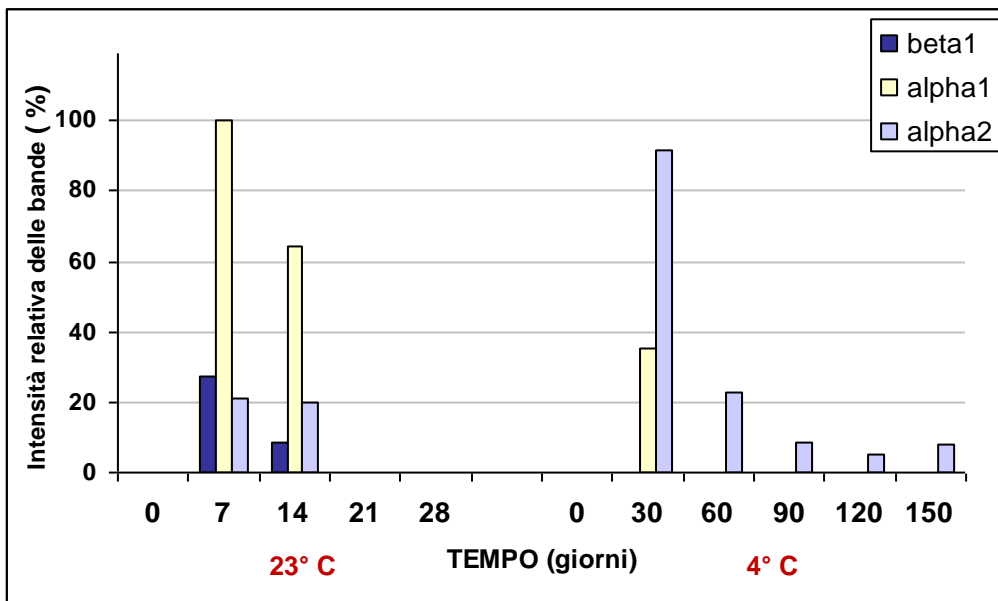


Figura 8.2 Intensità relativa delle bande negli estratti nativi.

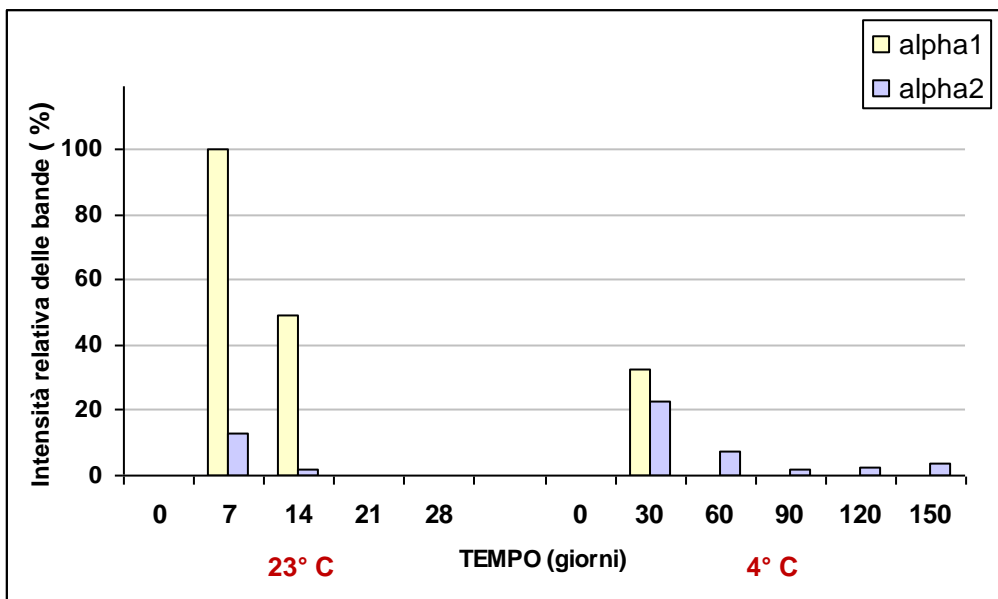


Figura 8.3 Intensità relativa delle bande negli estratti termotrattati .

I risultati evidenziano differenze nell'espressione delle bande tra i campioni a 4° C e quelli a 23°C; infatti, nei secondi, si rileva la presenza di una specifica β -amilasi che risulta completamente assente nei campioni della semina a basse temperature.

Questa situazione, visibile già a livello dell'immagine, trova conferma nel grafico dell'analisi densitometrica, dove non si rileva minimamente la presenza di tale banda nei campioni a 4° C.

Altra divergenza nell'espressione dell'attività amilasica è quella della presenza, a 4°C, di due bande di α -amilasi espresse in modo differenziale al momento del primo prelievo a 30 giorni, come risulta evidente in entrambe le immagini.

Questo particolare trova un'analogia nel comportamento di *Festuca arundinacea*, quando sottoposta a basse temperature, in quanto anche essa presenta l'espressione differenziale di specifiche isoforme di α -amilasi, assenti nei campioni del controllo a 23°C (Damiani, 2005).

Nei campioni del controllo si evidenzia, inoltre, una assenza dell'attività amilasica negli ultimi due prelievi, attività che, sebbene a livelli minimi, risulta essere espressa a carico della seconda forma α -amilasi negli endospermi di orzo a 4° C sino al momento dell'ultimo prelievo, a 150 giorni dalla semina.

Capitolo 9

9.1 ANALISI DELL'RNA

La risposta da parte dei vegetali a condizioni di stress si origina quando tali condizioni vengono riconosciute a livello cellulare.

Una volta che lo stress viene percepito ed individuato, si innescano vie di trasduzione del segnale che propagano l'informazione rilevata in tutta la pianta.

Tipiche risposte ad uno stress sono modificazioni a carico del metabolismo e dello sviluppo che, spesso, derivano da modificazioni dell'espressione genica.

Questi mutamenti, indotti dallo stress stesso, producono una serie di risposte che, attraverso la repressione o la sovraespressione di alcuni geni, vanno a coinvolgere determinate molecole, come l'acido abscissico o il calcio, oltre che all'aumento di processi trascrizionali a carico dell'RNA.

L'RNA, o acido ribonucleico, è un polimero organico formato da ribonucleotidi ed è coinvolto nei processi di traduzione dell'informazione genetica.

E' importante quindi indagare se si siano verificate modificazioni a carico dell'RNA delle plantule di orzo sottoposte a basse temperature.

9.2 ESTRAZIONE DELL'RNA

L'analisi dell'RNA è stata condotta sui campioni di orzo costituiti dai coleoptili della semina a 4° C, del controllo a 23° C e dei rispettivi recovery.

I campioni, conservati a -80° C, sono stati preventivamente congelati e sfarinati con l'ausilio dell'azoto liquido e quindi omogenati con 1 ml della seguente soluzione:

- Buffer ATA 983,6 µl
- β-mercaptoetanololo 12,3 µl
- ANTIFOAM 4,1 µl

I campioni omogenati sono stati recuperati in eppendorf e ad ognuno vengono aggiunti 84 µl di KCl 3 M.

Successivamente il materiale deve essere mantenuto in ghiaccio per 15 minuti.

Al termine di questa attesa il materiale viene centrifugato a 4° C per cinque minuti a 8000 rpm.

Si recupera il surnatante a cui viene aggiunto LiCL 8M in quantità pari ad almeno il volume di recupero.

Il materiale vegetale viene quindi mantenuto a 4° C overnight.

Il primo passaggio della fase successiva è una centrifugazione dei campioni per 20 minuti a 8000 rpm e 4°.

Dal materiale ottenuto è stato recuperato il pellet, che deve essere sospeso in 400 µl di H₂O DEPC.

A sospensione effettuata vengono aggiunti 40 µl di Na-acetato 3M pH 5,2 e, in un secondo momento, 450 µl di una soluzione di Fenolo-cloroformio: a seguito di questa aggiunta occorre procedere ad un passaggio al vortex, al fine di miscelare adeguatamente le fasi, acquosa ed idrofoba, che si vengono a creare.

Si procede, quindi, con un nuovo passaggio in centrifuga per 20 minuti a 8000 rpm e 4° e con il recupero della fase acquosa, dove si trovano gli acidi nucleici.

Per ogni volume di estratto recuperato viene aggiunta una uguale quantità di cloroformio; il materiale viene miscelato con l'ausilio del vortex e nuovamente centrifugato a 4° C per 5 min a 15000 rpm.

Terminata la centrifuga viene recuperato il surnatante e posto in eppendorf da 2 ml, a cui vengono aggiunti 2,5 volumi di EtOH a -20° C e successivamente, 10 µl di Na-acetato 3 M pH 5,2.

Nel passaggio successivo i campioni vengono mantenuti a -20° C per 30 minuti.

Dopo questo tempo di attesa, necessario alla precipitazione degli acidi nucleici, si procede con la centrifugazione del materiale a 4° C per 10 minuti a 15000 rpm e all'eliminazione di tutto il surnatante ottenuto.

Il pellet, dove si trova l'RNA estratto, viene risospeso in 50 µl di H₂O DEPC e mantenuto a -80° C in attesa della quantificazione e dell'elettroforesi.

9.3 QUANTIFICAZIONE DELL'RNA

A seguito dell'estrazione dell'RNA dalle plantule di orzo, si esegue la quantificazione dei singoli campioni attraverso analisi spettrofotometrica.

Il procedimento si basa sulla capacità di assorbimento di una specifica lunghezza d'onda, 260 nm, da parte dell'RNA.

Viene preparata un'aliquota di campione (2 μ l), che deve essere diluita in 400 μ l di H₂O DEPC (oppure H₂O distillata); con il materiale pronto si procede alla lettura allo spettrofotometro.

I valori di assorbanza ottenuti consentono di quantificare l'RNA contenuto nel campione, applicando la seguente formula.

$$[\text{RNA}] \text{ ng } \mu\text{l}^{-1} = \text{Abs}_{260} \cdot C \cdot \text{r.d.}$$

Dove:

C = Coefficiente di estinzione molare dell'RNA = 40

r.d. = rapporto di diluizione del campione

Al fine di trovare la concentrazione dell'RNA relativamente all'unità di peso fresco (PF) del materiale vegetale, i valori ottenuti vengono rapportati al peso di ciascun campione e al volume totale in cui l'estratto è stato risospeso (V_{sosp} , 50 μ l in questo caso), secondo la seguente relazione:

$$[\text{RNA}] \text{ ng mg}^{-1} = [\text{RNA}] \text{ ng } \mu\text{l}^{-1} \cdot V_{\text{sosp}} / \text{PF}$$

Oltre alla lettura spettrofotometrica a 260 nm è stata valutata l'assorbanza dei campioni ad una seconda lunghezza d'onda, 280 nm, lunghezza d'onda specifica per valutare la presenza di contaminazioni proteiche nell'estratto.

Il rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e quella a 280 nm (Asb_{260}/Abs_{280}) permette quindi di valutare la qualità dell'estrazione dell'RNA eseguita: il valore che si deve ottenere per giudicare un'estrazione come adeguata deve aggirarsi intorno a 2.

9.4 ELETTOFORESI SU GEL DI AGAROSIO DI RNA

La separazione dell'RNA mediante elettroforesi su gel di agarosio è una metodologia che consente di verificarne l'integrità dopo avere effettuato l'estrazione.

Il principio della separazione è basato, come anche nel caso del DNA, sulle dimensioni della molecola, e quindi sull'effetto setaccio creato dai pori che si creano nel gel stesso.

L'agarosio è un polisaccaride lineare costituito da unità base di agarobiosio ripetute, intercalate da unità alternate di galattosio e di 3,6-anidrogallattosio.

Il gel si forma sospendendo l'agarosio in polvere in un tampone acquoso, bollendo la miscela sino a che non diviene limpida e lasciando raffreddare a temperatura ambiente: durante il raffreddamento si formano legami a idrogeno sia inter- che intramolecolari tra le lunghe catene di agarosio che consentono alla masse di formare il gel (Wilson, Walker, 1995).

Come in altri gel utilizzati per tecniche elettroforetiche le dimensioni dei pori, e quindi la tipologia di separazione, dipende dalle concentrazione iniziale di agarosio.

Nel caso della separazione dell'RNA estratto dai coleottili di orzo è stato adoperato un gel di agarosio all'1%, costituito da 2 g di agarosio sospeso in 200 ml di Buffer TAE 1x e con l'aggiunta di Bromuro di Etidio in quantità pari a 25µg ogni 100 ml di buffer .

Il Bromuro di Etidio è un colorante fluorescente, costituito da una molecola ciclica planare, che si lega a legami idrogeno intramolecolari presenti all'interno della molecola di RNA consentendone la colorazione.

Al termine della corsa è quindi possibile visualizzare le bande formatesi sul gel con luce ultravioletta ad una lunghezza d'onda di 300 nm.

Il gel, completamente sommerso dal tampone, viene fatto correre in orizzontale; i pozzetti di caricamento vengono formati direttamente nel gel, senza il bisogno di un gel di impaccamento, in quanto le molecole presentano una mobilità elevata e si impilano in pochi minuti dal momento di applicazione della corrente.

Terminata la formazione del gel vengono preparati i campioni da caricare.

Nel caso dei campioni di orzo è stato caricato 1 µg di RNA per la corsa elettroforetica: ogni campione è stato diluito con 5 µl di H₂O DEPC e con un colorante di caricamento (Loading Dye, 6x) costituito da glicerolo, con la funzione di appesantire la soluzione, e da Blu di Bromofenolo, al fine di seguire il procedere della corsa elettroforetica.

Il gel è stato fatto correre per circa 1 ora e successivamente sono state acquisite le immagini del gel con l'ausilio di una fotocamera digitale montata su un supporto apposito.

9.5 RISULTATI

A seguito della corsa elettroforetica è stata acquisita l'immagine relativa all'RNA estratto dalle plantule di orzo in condizioni di basse temperature, del controllo a 23° C e dei relativi recovery.

L'immagine del gel è riportata di seguito (Fig. 9.1): sono evidenti due bande corrispondenti agli RNA ribosomali.

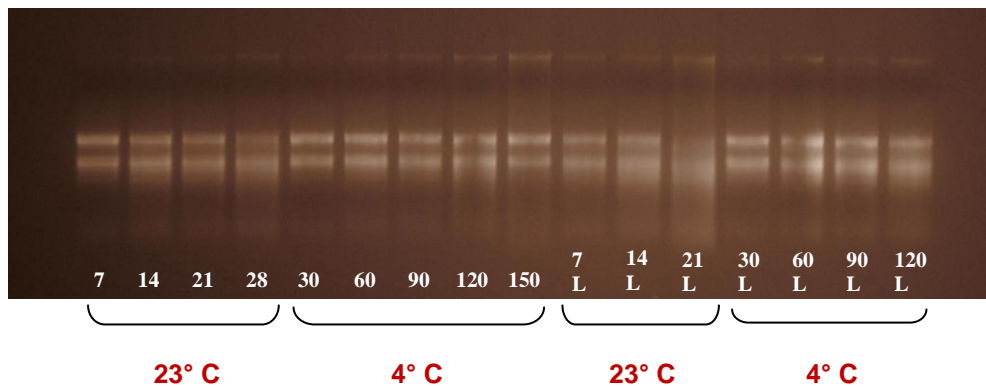


Figura 9.1 Immagine relativa all'elettroforesi su gel di agarosio dell'RNA estratto dai coleoptili di orzo derivati dalla semina a 4°C, dal controllo a 23°C e dai rispettivi recovery (L).

I coleoptili, quindi, sia nella semina a 4° C, sia nel controllo a 23° C presentano la sintesi di RNA, così come anche nel caso dei recovery; non si sono riscontrate perciò, a livello di analisi elettroforetica, sostanziali differenze tra i campioni sottoposti a diverse condizioni ambientali.

Attraverso l'analisi spettrofotometrica è stato possibile quantificare l'RNA estratto dai campioni, i cui risultati sono riassunti nel grafico seguente.

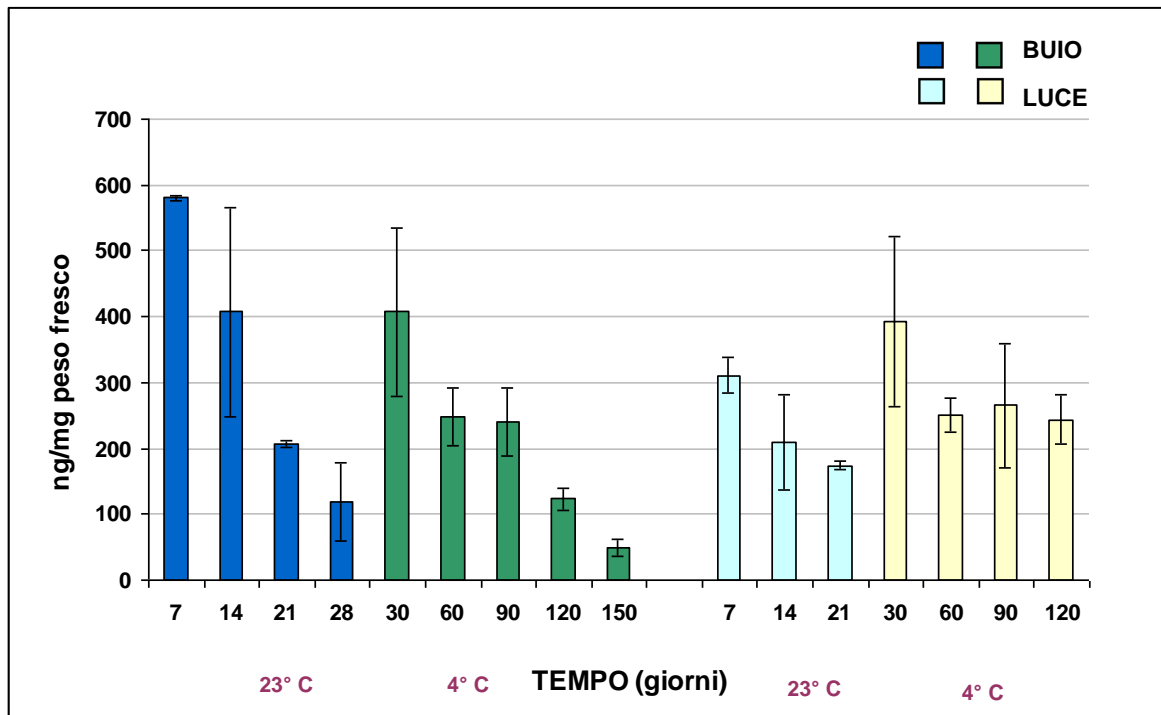


Figura 9.2 Concentrazione dell'RNA nei coleottili di orzo della semina a 4°C, del controllo a 23°C e dei rispettivi recovery (luce).

Anche l'analisi quantitativa conferma la presenza di RNA nei singoli campioni; sia nel controllo che nella semina a 4° C si presenta un andamento di tipo decrescente analogo: dopo un picco al momento del primo prelievo, la concentrazione decresce progressivamente con un andamento simile in entrambe le serie.

Anche in questo caso si presenta, quindi, un'analogia nell'andamento metabolico delle plantule delle due semine, con tempistiche correlate alle condizioni a cui sono sottoposte.

Si riscontra una certa presenza di RNA anche in quei campioni al buio (28 giorni per la semina a 23° C e 150 giorni per quella a 4° C), i cui recovery non sono stati in grado di riprendere la propria attività vegetativa.

Andamento leggermente differente presentano i recovery delle due serie: a 23°C la presenza di RNA tende a diminuire con il trascorrere dei giorni, a 4° C invece, dopo un picco al primo prelievo, si mostra tendenzialmente stabile.

Capitolo 10

10 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Durante la germinazione e lo sviluppo, i vegetali devono adattare i propri processi metabolici a seconda delle prevalenti condizioni ambientali (Holdsworth *et al.*, 1999), condizioni derivate da fattori di varia natura che influiscono in maniera, più o meno diretta, sugli organismi presenti in un determinato ambiente e che possono variare in maniera più o meno ampia.

Per sopravvivere ai cambiamenti che si verificano nell'ambiente in cui vivono, le piante hanno sviluppato meccanismi elaborati per percepire i segnali esterni e per indurre, di conseguenza, risposte adattive con variazioni appropriate a livello morfologico e fisiologico (Bohnert *et al.*, 1995).

Quindi, durante l'evoluzione le piante hanno saputo sviluppare meccanismi di adattamento per resistere alle condizioni ambientali più avverse (Marè *et al.*, 2002); in particolare le specie appartenenti alla tribù delle Triticaceae presentano una diffusione geografica molto ampia e ciò suggerisce che il loro genoma possiede caratteri per una ampia adattabilità ambientale e una buona resistenza agli stress (Marè *et al.*, 2002).

Studi a proposito di tali specie hanno dimostrato che esse presentano un'ampia gamma di risposte alle basse temperature, come la produzione di specifiche proteine con funzione antigelo (Griffith *et al.*, 2005), il ritardo del passaggio dalla fase vegetativa a quella riproduttiva (Fowler *et al.*, 2001), l'accumulo di soluti al fine di minimizzare i danni derivati dal gelo (Gusta *et al.*, 2004), ed infine l'induzione di numerosi geni specifici per la tolleranza alle basse temperature (Vagujfalvi *et al.*, 2005; Gray *et al.*, 1997; Fu *et al.*, 2000; Fowler *et al.*, 2001), nonché variazioni sostanziali a livello trascrizionale (Herman *et al.*, 2006; Svensson *et al.*, 2006).

In questo studio è stata analizzata la fisiologia della germinazione di orzo var. *Nure* alla temperatura di 4°C, in totale assenza di luce e di nutrienti.

Il confronto è stato eseguito con i risultati derivati da un controllo in condizioni analoghe per quanto riguarda luce e nutrienti, ma alla temperatura di 23°C, e con alcuni risultati ottenuti in un lavoro analogo su *Festuca arundinacea* (Damiani, 2005).

I risultati hanno evidenziato come l'orzo, sottoposto a basse temperature, sia in grado di germinare e di sviluppare plantule che si presentano morfologicamente simili a quelle del controllo, ma secondo tempistiche molto più lunghe: infatti, le plantule a 4°C

impiegano 30 giorni a raggiungere uno sviluppo analogo a quello raggiunto dal controllo in 7 giorni.

Quindi, tutto il processo di sviluppo subisce un rallentamento, indotto probabilmente dalle limitazioni derivate dal regime termico a cui l'orzo viene sottoposto; in questo comportamento si riscontra un'analogia oltre che con *Festuca*, anche con altri studi condotti sul grano (Hurry *et al.*, 1995).

I risultati ottenuti dalle analisi concordano con questo allungamento del ciclo indotto dalle basse temperature: infatti, in generale, è stato evidenziato un andamento simile sia per quanto riguarda il contenuto in amido che per quello in zuccheri liberi.

Interessante risulta comunque il dato relativo all'amido che, nella semina a 4°C, termina completamente entro i primi 30 giorni dalla semina: ciò significa che le plantule sono in grado di mantenersi vitali, senza alcun tipo di rifornimento da parte dell'endosperma, sino a 120 giorni.

Andamento simile è registrato anche nel caso di *Festuca*, ma orzo differisce per quanto riguarda il tempo di esaurimento dell'amido, che nel primo caso risulta molto più lungo.

Stesso comportamento è stato rilevato nel caso degli zuccheri liberi che, mobilitati e sintetizzati a livello dell'endosperma, vengono trasferiti alle plantule, e la cui concentrazione diminuisce, sempre con la stessa relazione temporale causata dal regime termico, con il trascorrere dei giorni.

Non si registrano invece notevoli differenze di concentrazione degli zuccheri tra semina a basse temperature e controllo, come avviene invece nel caso di *Festuca arundinacea*.

Quindi, sebbene nelle plantule al freddo gli zuccheri siano presenti in quantità sempre più elevata rispetto al controllo, la differenza riscontrata non è generalmente così spiccata come in *Festuca*.

E', comunque sia, ipotizzabile che la maggiore concentrazione e il decremento più graduale degli zuccheri liberi nella semina al freddo, possa avere una relazione con lo stress derivato da basse temperature, così come riscontrato in altri studi (Lerbogne *et al.*, 1995; Travert *et al.*, 1997; Damiani, 2005).

I risultati relativi alla concentrazione di clorofille e carotenoidi, mostrano nuovamente il rallentamento nel ciclo di sviluppo delle piante che avviene a basse temperature e, l'andamento decrescente della neosintesi di pigmenti nei recovery,

evidenzia la progressiva difficoltà da parte di queste a riprendere i processi fotosintetici, con il trascorrere del tempo.

Non sono state rilevate differenze significative a livello del pattern derivato dall'elettroforesi su gel di agarosio dell'RNA; occorre comunque dire che si evidenzia la presenza di RNA anche in quei campioni i cui rispettivi recovery non sono state in grado di riprendere i processi vegetativi.

Dal punto di vista quantitativo l'RNA mostra, nei campioni al buio, lo stesso trend registrato nel caso degli altri metaboliti; nel caso dei recovery, invece, il suo contenuto pare più stabile nel caso dei campioni derivati dalla semina a 4°C.

Le maggiori differenze sono state registrate a livello del pattern proteico riguardante l'attività amilolitica, dove è stata rilevata una differente espressione degli enzimi tra il controllo a 23°C e i campioni a 4°C.

Infatti, si evidenzia la presenza di una specifica β -amilasi nel controllo (totalmente assente nei campioni sottoposti a basse temperature) e di due bande di α -amilasi espresse in modo differenziale nella semina a 4°C, differenze derivate probabilmente dall'influenza del diverso regime termico a cui sono sottoposte le plantule di orzo.

In conclusione, quindi, i risultati evidenziano come l'orzo posto a germinare in condizioni di basse temperature presenti la capacità di sopravvivere in tali condizioni di stress, ma con una tolleranza comunque minore rispetto a quella riscontrata in *Festuca arundinacea* nelle medesime condizioni.

BIBLIOGRAFIA

- Allen, D. J. and Ort, D. R.** (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends Plant Science*, **6**: 36–42.
- Alpi A., Pupillo P., Rigano C.**, Fisiologia delle piante, Napoli, Edises, 2004.
- Bonciarelli F., Bonciarelli U.**, Coltivazioni erbacee, Bologna, Calderini Edagricole, 2001.
- Bethke, P. C.; Schuurink, R. and Jones, R. L.** (1997). Hormonal signalling in cereal aleurone. *Journal Experimental of Botany*, **48**: 1337–1356.
- Bohnert, H. J. and Sheveleva, E.** (1998). Plant stress adaptations: making metabolism move. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **1**: 267-274.
- Bohnert, H. J.; Nelson, D. E. and Jensen, R. G.** (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell*, **7**: 1099–1111.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248–254.
- Bush, D. S. and Jones, R. L.** (1988). Cytoplasmic calcium and α -amylase secretion from barley aleurone protoplasts. *Eur. J. Cell Biol.*, **46**: 466–469.
- Baum, G.; Long, J. C.; Jenkins, G. I. and Trewavas, A. J.** (1999). Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **96**: 13554–13559.

- Christov N. K., Yoneyama S., Shimamoto Y., Imai R.**, Differential Expression of Wheat Genes during Cold Acclimation, in *Citology and Genetics*, 41, 2007, 142-150.
- Catalá, R.; Santos, E.; Alonso, J. M.; Ecker, J. R.; Martínez-Zapater, J. M. and Salinas, J.** (2003). Mutations in the $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Transporter CAX1 Increase *CBF/DREB1* Expression and the Cold-Acclimation Response in Arabidopsis. *Plant Cell*, 15 (12): 2940–2951.
- Chrispeels, M. and Varner, J.** (1966). Inhibition of gibberellic acid induced formation of alpha-amylase by abscisin II. *Nature*, 212: 1066–1067.
- Cozzi R., Protti P., Ruaro T.**, *Analisi chimica e strumentale (Vol.A, metodi elettrochimici)*, Milano, Zanichelli, 2001.
- Crowe, J. H.; Hoekstra, F. A. and Crowe, L. M.** (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 54: 570–599.
- Damiani C. R.**, *Carbohydrates metabolism in Festuca arundinacea*, (Tesi di dottorato), Università degli Studi di Pisa, 2005.
- Dunn G.**, A model for starch break down in higher plants, in *Phytochemistry*, 13, 1974, 1341-1346.
- Eagles, C. F.; Williams, J. and Louis, D. V.** (1993). Recovery after freezing in *Avena sativa* L. *Lolium perenne* L. and *L. multiflorum* Lam. *New Phytologist*, 123: 477–483.
- Farrel A. D., Ougham H. J., Tomos A. D.**, The effect of gibberellic acid on the response of leaf extension to low temperature, in *Plant, Cell & Environment*, Volume 29, Issue 7, 2007, 1329-1337.

- Fowler, D.B., G. Breton, A.E. Limin, S. Mahfoozi, and F. Sarhan.** 2001. Photoperiod and temperature interactions regulate lowtemperature-induced gene expression in barley. *Plant Physiol.* 127:1676–1681.
- Fowler, D.B., A.E. Limin, and J.T. Ritchie,** Low-temperature tolerance in cereals: Model and genetic interpretation, in *Crop Science*, 1999,39:626–633.
- Frohnmeier, H.; Bowler, C.; Zhu, J-K.; Yamagata, H.; Schäfer, E. and Chua, N.-H.** (1998). Different roles for calcium and calmodulin in phytochrome and UV-regulated expression of chalcone synthase. *Plant Journal*, **13**: 763–772.
- Fu, P., R.W. Wilen, G.-H. Wu, A.J. Robertson, and L.V. Gusta.** 2000. Dehydrin gene expression and leaf water potential differs between spring and winter cereals during cold acclimation. *J. Plant Physiol.* 156:394–400.
- Giardini L., Baldoni R.,** *Coltivazioni erbacee: cereali e proteaginose*, Bologna, Ed. Patron, 2002.
- Gilmour, S. J.; Sebolt, A. M., Salazar, M. P.; Everard, J. D. and Thomashow, M. F.** (2000). Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiology*, **124**: 1854–1865.
- Gilmour, S. J.; Zarka, D. G.; Stockinger, E. J.; Salazar, M. P.; Houghton, J. M. and Thomashow, M.F.** (1998). Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant Journal*, **16**: 433–442.
- Gómez-Cadenas, A., Verhey, S. D.; Holappa, L. D.; Shen, Q.; Ho, T.-H.D., and Walker-Simmons, M. K.** (1999). An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **96**: 1767–1772.

- Gómez-Cadenas, A.; Zentella, R.; Walker-Simmons, M.K. and Ho, T.-H.D.** (2001). Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: Site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell*, **13**: 667–679.
- Gong, M.; Van der Liut, A. H.; Knight, M. R. and Trewavas, A. J.** (1998). Heat-shock-induced changes in intracellular Ca^{2+} level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. *Plant Physiology*, **116**: 429–437.
- Gray, G.R., L.-P. Chauvin, F. Sarhan, and N.P.A. Huner.** 1997. Cold acclimation and freezing tolerance. *Plant Physiol.* 114:467–474.
- Griffith, M., C. Lumb, S.B. Wiseman, M. Wisniewski, R.W. Johnson, and A.G. Marangoni.** 2005. Antifreeze proteins modify the freezing process in plants. *Plant Physiol.* 138:330–340.
- Guglielminetti L., Busilacchi H. A., Alpi A.,** Effect of anoxia on α -amylase induction in maize caryopsis, in “*Journal of Plant Research*”, 113, 2000, 185-192.
- Guglielminetti L., Perata P., Alpi A.,** Effect of anoxia on carbohydrate metabolism in rice seedlings. in “*Plant Physiology*”, 108, 1995, 735-741.
- Guglielminetti L., Yamaguchi J., Perata P., Alpi A.,** Amilolytic activities in cereal seeds under aerobic and anoxic conditions, in “*Plant Physiology*”, 109, 1995, 1069-1076.
- Guglielminetti, L.; Busilacchi, H. A. and Alpi, A.** (2000). Effect of Anoxia on α -Amylase Induction in Maize Caryopsis. *J. Plant Res.*, **113**: 185-192.
- Guglielminetti, L.; Perata, P. and Alpi, A.** (1995a). Effect of Anoxia on Carbohydrate metabolism in Rice Seedlings. *Plant Physiology*, **108**: 735-741.

- Guglielminetti, L.; Yamaguchi, J.; Perata, P. and Alpi, A.** (1995b). Amylolytic Activities in Cereal Seeds under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Plant Physiology*, **109**: 1069-1076.
- Gusta, L.V., M. Wisniewski, N.T. Nesbitt, and M.L. Gusta.** 2004. The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves. *Plant Physiol.* 135:1642–1653.
- Gusta et al.** (1996). Low temperature stress tolerance: the role of abscissic acid, sugars, and heat stable protein. *Hort. Sci.*, **31**: 39-46.
- Guy, C. L.** (1990). Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant molecular Biology*, **41**: 187–223.
- Guy, C. L.; Niemi, K. J. and Brambi, R.** (1985) Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **82**: 3673–3677.
- Haliloglu K., Tosun M., Yildirim T. , Aydin M.,** The novel approach towards estimation of frost tolerance in barley, in *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23, 2009. Disponibile all'indirizzo:
www.diagnosisp.com/dp/iournals/view_pdf.php?journal_id=1&archive=1&issue_id=21&article_id=578
- Heino, P.; Sandman, G. Lang, V.; Nordin, K. and Palva, E. T.** (1990) Abscisic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Theor. Appl. Genet.*, **79**: 801-806.
- Herman, E.M., K. Rotter, R. Premakumar, G. Elwinger, R. Bae, L. Ehler-King, S. Chen, and D.P. Livingston, III.** 2006. Additional freeze hardiness in wheat acquired by exposure to -3°C is associated with extensive physiological, morphological, and molecular changes. *J. Exp. Bot.* 57:3601–3618.

- Hoekstra, F. A.; Golovina, E. A. and Buitink, J.** (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.*, **6**: 431-438.
- Holdsworth, M.; Kurup, S. and McKibbin, R.** (1999). Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. *Trends Plant Science*, **4**: 275-280.
- Hurry V, Strand A, Furbank R, Stitt M** (2000) The role of inorganic phosphate in the development of freezing tolerance and the acclimatization of photosynthesis to low temperature is revealed by the *pho* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **24**: 383–396.
- Iba, K. (2002).** Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review Plant Biol.*, **53**: 225-45.
- Ingram, J. and Bartels, D.** (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**: 377-403.
- Jacobsen, J.V.; Gubler, F. and Chandler, P. M.** (1995). Gibberellin action in germinated cereal grains. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology*, P.J. Davies, ed (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers).
- Janskà A., Mars'ík P., Zelenková S., Ovesná J.,** Cold stress and acclimation – what is important for metabolic adjustment?, in *Plant Biology*, 12, Vol. 3, 2010, 395-405.
- Jones, R. L. and Warner, J. E.** (1967). The Bioassay of Gibberellins. *Planta*, **72**: 155-161.
- Karimzadeh G., Darvishzadeh R., Jalali-Javaran M., Dehghani H.,** Cold-induced accumulation of protein in the leaves of spring and winter barley cultivars, in *Acta Biologica Hungarica*, Volume 56, Numbers 1-2, 2005, 83-96.

- Kennedy R. A. ... [*et al.*],** Genetic and biochemical analysis of anaerobically-induced enzymes during seed germination of *Echinochloa crus-galli* varieties tolerant and intolerant of anoxia, in “Journal of Experimental Botany”, 54, 386, 2003, 1421-1429.
- Kim, K-N.; Cheong, Y. H.; Grant, J. J.; Pandey, G. K. and Luan, S.** (2003). *CIPK3*, a Calcium Sensor–Associated Protein Kinase That Regulates Abscisic Acid and Cold Signal Transduction in Arabidopsis. *Plant Cell*, **15** (2): 411–423.
- Knight, H.; Trewavas, A. J. and Knight, M. R.** (1997). Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant Journal*, **12**: 1067–1078.
- Knight, M. R.; Campbell, A. K.; Smith, S. M. and Trewavas, A. J.** (1991). Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, **352**: 524–526.
- Koo B.C., Bushman B.S., Mott I.W.,** Transcripts Associated with Non-Acclimated Freezing Response in Two Barley Cultivars, in *The Plant Genome*, 1, 2008, 21-32.
- Koornneef, M., Jorna, M. L.; Brinkhorst-van der Swan, D. L. C. and Karssen, C. M.** (1982). The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. *Theor. Appl. Genet.*, **61**: 385–393.
- Lang V, Mantyla E, Welin B, Sundberg B, Palva ET.** (1994). Alterations in Water Status, Endogenous Abscisic Acid Content, and Expression of rab18 Gene during the Development of Freezing Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, **104** (4): 1341-1349.
- Leborgne, N.; Teulieres, C.; Travert, S.; Rols, M. P.; Teissie, J. and Baudet, A. M.** (1995). Introduction of specific carbohydrates into *Eucalyptus gunnii* cells increases their freezing tolerance. *European Journal of Biochemistry*, **229**: 710–717.

- Lee, S. H.; Singh, A. P.; Chung, G. C.; Kim, Y. S. and Kong, I. B.** (2002) Chilling root temperature causes rapid ultrastructural changes in cortical cells of cucumber (*Cucumis sativus* L.) root tips. *Journal of Experimental Botany*, **53** (378): 2225-2237.
- Levitt J.** (1980), Responses of plants to environmental stresses, Vol. 1. New York: Academic Press.
- Liming Xiong, Manabu Ishitani,** Stress signal transduction: components, pathways and network integration, in *Abiotic stress tolerance in plants*, 1, 2006, 3-29.
- Liu, Q., Kasuga, M.; Sakuma, Y.; Abe, H.; Miura, S.; Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**: 1391–1406.
- Livingston III, D. P. and Henson, C. A.** (1998). Apoplastic Sugars, Fructans, Fructan Exohydrolase, and Invertase in Winter Oat: Responses to Second-Phase Cold Hardening. *Plant Physiology*, **116**: 403-408.
- Livingston III, D. P.; Olien, C. R. and Premakumar, R.** (2000). Thermal Effect of CO₂ on Apoplastic Ice in Rye and Oat during Freezing. *Plant Physiology*, **122** (3): 861–866.
- Marco Maccaferri, Maria Corinna Sanguineti, Silvia Giuliani, Roberto Tuberosa,** Genomics of Tolerance to Abiotic Stress in the Triticeae, in *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, Volume 7, Part 3, 2009, 481-558.
- Marè C., Crosatti C., Cattivelli L., Mazzucotelli E., Rizza F., Stanca A. M.,** Analisi fisiologico-molecolare della relazione tra fase fenologica e capacità della pianta di orzo di rispondere alle basse temperature, in *Atti del convegno: Phenagri- fenologia per l'agricoltura*, 2002, 27-35.

- Mare`C., Mazzucotelli E., Crosatti C., Francia E., Stanca A. M., Cattivelli L., Hv-WRKY38:** a new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley, in *Plant Molecular Biology*, Volume 55, Number 3, 2004, 399-416.
- McAinsh, M. R. and Hetherington, A. M.** (1998). Encoding specificity in Ca²⁺ signaling systems. *Trends Plant Sci.*, **3**: 32–36.
- Mitsunaga, S-I.; Kawakami, O.; Numata, T.; Yamaguchi, J.; Fukuy, K. and Mitsui, T.** (2001). Polymorphism in Rice Amylases at an Early Stage of Seed Germination. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65** (3): 602-605.
- Nelson David L., Cox Michael M.**, I principi di biochimica di Lehninger, Bologna, Zanichelli, 2006.
- Nese Sreenivasulu, Rajeev Varshney, Polavarpu Kavi Kishor and Winfriede Weschke,** Functional Genomics for Tolerance to Abiotic Stress in Cereals, in *Cereal genomics*, 2005, 483-514.
- Ninfa J. Alexander, Ballou David P.**, Metodologie di base per la biochimica e la biotecnologia, Bologna, Zanichelli, 2004.
- Nogueira, F. T. S.; De Rosa, V. E. Jr.; Menossi, M.; Ulian, E. C. and Arruda, P.** (2003) RNA Expression Profiles and Data Mining of Sugarcane Response to Low Temperature. *Plant Physiology*, **132**: 1811-1824.
- Olaf Barth, Wiebke Zschiesche, Sylvia Siersleben, Klaus Humbeck,** Isolation of a novel barley cDNA encoding a nuclear protein involved in stress response and leaf senescence, in *Physiologia Plantarum*, Volume 121, Issue 2, 2004, 282–293.
- Olien, C. R.** (1984). An adaptive response of rye to freezing. *Crop Science*, **24**: 51-54.
- Pearce, R. S.** (1999) Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regulation*, **29**: 47–76.

- Perata P., Guglielminetti L., Alpi A.,** Anaerobic carbohydrate metabolism in wheat and barley, two anoxia-intolerant cereal seeds, in “Journal of Experimental Botany”, 47, 301, 1996, 999-1006.
- Perata P., Guglielminetti L., Alpi A.,** Mobilization of endosperm reserves in cereal seeds under anoxia, in “Annals of Botany” , 79 (supplement A), 1997, 46-56.
- Perata Pierdomenico ... [et. al.],** Carbohydrate metabolism and anoxia tolerance in cereal grains, in “Acta Botanica”, 47, 1998, 269-283.
- Perata, P.; Geshi, N.; Yamaguchi, J. and Akazawa, T.** (1993). Effect of Anoxia on the Induction of α -Amylase in Cereal Seeds. *Planta*, **191**: 402-408.
- Perata, P.; Pozueta-Romero, J.; Akazawa, T. and Yamaguchi, J.** (1992). Effect of Anoxia on Starch Breakdown in Rice and Wheat Seeds. *Planta*, **188**: 611-618.
- Philipps Gabriele, Drzewiecki Corinna, Bartha Olaf, Zschieschea Wiebke, Humbeck Klaus,** Light-dependent expression of the cold-regulated gene HvMC1 in barley (*Hordeum vulgare* l.), in *Journal of Thermal Biology*, 31, 6, 2006, 473-482.
- Piaggese, A.; Picciarelli, P.; Lorenzi, R. and Alpi, A.** (1989). Gibberellins in Embryo-Suspensor of *Phaseolus coccineus* Seeds at the Heart Stage of Embryo Development. *Plant Physiology*, **91**: 362-366.
- Ristic, Z. and Ashworth, E. N.** (1994) Response of Xylem Ray Parenchyma Cells of Red Osier Dogwood (*Cornus serices* L.) to Freezing Stress. *Plant Physiology*, **104**: 737-746.
- Ritchie, S. and Gilroy, S.** (1998). Tansley Review No. 100. Gibberellins: Regulating genes and germination. *New Phytol.*, **140**: 363–383.
- Ritika Das, Girdhar K. Pandey,** Expressional Analysis and Role of Calcium Regulated Kinases in Abiotic Stress Signaling, in *Current Genomics*, 11, 2010, 2-13.

- Ron Mittler**, Abiotic stress, the field environment and stress combination, in Trends in Plant Science, Volume 11, Issue 1, January 2006, Pages 15-19.
- Rudd, J. J. and Franklin-Tong, V. E.** (2001). Unraveling response-specificity in Ca²⁺ signaling pathways in plant cells. *New Phytol.*, **151**: 7–33.
- Sabehat, A.; Lurie, S. and Weiss. D.** (1998). Expression of Small Heat-Shock Proteins at Low Temperatures: A Possible Role in Protecting against Chilling Injuries. *Plant Physiology*, **117** (2): 651–658.
- Sanders, D.; Brownlee, C. and Harper, J. F.** (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell*, **11**: 691–706.
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K.** (2001). Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell*, **13**: 61–72.
- Shacklock, P. S., Read, N. D. and Trewavas, A.J.** (1992). Cytosolic free calcium mediates red light induced photomorphogenesis. *Nature*, **358**: 153–155.
- Sheen, J.** (1996). Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science*, **274**: 1900–1902.
- Skoog, West, Holler**, *Chimica analitica, una introduzione*, Napoli, Edises, 2000.
- Stefanowska, M.; Kuras, M. and Kacperska, A.** (2002) Low temperature-induced Modifications in Cell Ultrastructure and Localization of Phenolics in Winter Oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* L.) Leaves. *Annals of Botany*, **90**: 637-645.
- Stefanowska, M.; Kuras, M.; Kubacka-Zebalska, M. and Kacperska, A.** (1999) Low temperature Affects Pattern of Leaf Growth and Structure of Cell Walls in Winter Oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* L.). *Annals of Botany*, **84**: 313-319.

Strauss, G. and Hauser, H. (1986). Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **83**: 2422–2426.

Sun Z., Henson C. A., A quantitative assessment of the importance of barley seed α -amylase, debranching enzyme, and α -glucosidase in starch degradation, in *Biochem. Bioph.*, 284, 1991, 298-305.

Svensson Jan T., Crosatti Cristina, Campoli Chiara, Bassi Roberto, Stanca Antonio Michele Close Timothy J., Cattivelli Luigi, Transcriptome Analysis of Cold Acclimation in Barley Albina and Xantha Mutants, in *Plant Physiology*, 141, 2006, 257-270.

Svensson, J.T., C. Crosatti, C. Campoli, R. Bassi, A.M. Stanca, T.J. Close, and L. Cattivelli. 2006. Transcriptome analysis of cold acclimation in barley *Albina* and *Xantha* mutants. *Plant Physiol.* 141:257–270.

Tabaei-Aghdaei, S. R.; Pearce, R. S. and Harrison, P. (2003). Sugars regulate cold-induced gene expression and freezing-tolerance in barley cell cultures. *Journal of Experimental Botany*, **54** (387): 1565-1575.

Taiz Lincoln, *Fisiologia vegetale*, Padova, Ed. Piccin, 2002.

Tamminen, I.; Makela, P.; Heino, P. and Palva, E. T. (2001) Ectopic expression of ABI3 gene enhances freezing tolerance in response to abscisic acid and low temperature in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **25**: 1–8.

Thomashow, M. F. (1998) Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiology*, **118**: 1-7.

Thomashow, M. F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, **50**: 571-599.

- Tobias, R. B.; Boyer, C. D. and Shannon, J. C.** (1992). Alterations in Carbohydrate Intermediates in the Endosperm of Starch-Deficient Maize (*Zea mays* L.) Genotypes. *Plant Physiology*, **99**: 146-152.
- Tondelli A., Francia E., Barabaschi D., Aprile A., Skinner J. S., Stockinger E. J., Stanca A. M., Pecchioni N.**, Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance in barley, in TAG Theoretical and Applied Genetics, Volume 112, Number 3, 2006, 445-454.
- Travert, S. Valerio, L., Fouraste, I.; Boudet, M. and Teulieres, C.** (1997). Enrichment in specific soluble sugars of two *Eucalyptus* cell-suspension cultures by various treatments enhances their frost tolerance via a non-colligative mechanism. *Plant Physiology*, **114**: 1433–1442.
- Trunova T. I.** (1982). Mechanisms of winter wheat hardening at low temperature. In: Li PH, Sakai A, ed. *Plant cold hardiness and freezing stress*, New York: Academic Press, **2**: 41–54.
- Vagujfalvi, A., A. Aprile, A. Miller, J. Dubcovsky, G. Delugu, G. Galiba, and L. Cattivelli.** 2005. The expression of several Cbf genes at the Fr-A2 locus is linked to frost resistance in wheat. *Mol. Genet. Gen.* 274:506–514.
- Vierling, E.** (1991). The role of heat shock proteins in plants. *Annual Review Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42**: 579-620.
- Viswanathan, C. and Zhu, Jian-Kang** (2002). Molecular genetic analysis of cold-regulated gene transcription. The Royal Society.
- Wang, W-X.; Pelah, D.; Alergand, T.; Shoseyov, O. and Altman, A.** (2002). Characterization of SP1, a Stress-Responsive, Boiling-Soluble, Homo-Oligomeric Protein from Aspen. *Plant Physiology*, **130** (2): 865–875.

- Wilson K., Walker J. M.,** Metodologia biochimica, Milano, Raffaello Cortina Editore, 1995.
- Xin, Z. and Browse, J.** (2000) Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ.*, **23**: 893–902.
- Xin, Z. and Browse, J.** (1998). *eskimo1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95** (13): 7799–7804.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (1994). A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, **6**: 251–264.
- Yang, Y.; Shah, J. and Klessig, D. F.** (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.*, **11**: 1621–1639.
- Yoshida, R.; Kanno, A.; Sato, T. and Kameya, T.** (1996) Cool-Temperature-Induced Chlorosis in Rice Plants. *Plant Physiology*, **110**: 997-1005.
- Zhang, J., Kirkham, M. B.** (1996) Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytol* 132 (3), 361-373.
- Zentella, R.; Yamauchi, D. and Ho, T. H. D.** (2002). Molecular Dissection of the Gibberellin/Abscisic Acid Signaling Pathways by Transiently Expressed RNA Interference in Barley Aleurone Cells. *Plant Cell*, **14** (9): 2289–2301.