



UNIVERSITÀ DI PISA

Facoltà di Agraria

Corso di Laurea Specialistica in
BIOTECNOLOGIE VEGETALI E MICROBICHE

Effetti delle basse temperature su
Arabidopsis thaliana

Relatore:

Dott. Lorenzo Guglielminetti

Candidato:

Stefano Ligato

Correlatrice:

Dott.ssa Lucia Guidi

Anno Accademico 2006/2007

Indice

1	Introduzione	1
1.1	Raffreddamento e congelamento	3
1.2	Danni da congelamento	7
1.3	Formazione del ghiaccio nelle cellule	13
1.4	Batteri e brina	16
1.5	Cambiamenti metabolici	17
1.6	Limitazione della formazione di ghiaccio extracellulare	19
1.6.1	Lipidi	19
1.6.2	Proteine antigelo	20
1.6.3	Zuccheri	21
1.6.4	Acido abscissico	22
1.7	Cascata del segnale	24
1.8	Ruolo del calcio	26
1.9	Trasduzione del segnale e acclimatazione	28
1.10	COR	30
1.11	CRT/DRE e CBF1	31
1.12	Identificazione di geni per la tolleranza al gelo con l'uso di mutanti	34
1.13	Proteomica	35
1.14	Spettrometria di massa	37
1.15	<i>Arabidopsis thaliana</i>	39
1.16	Scopo	42
2	Materiali e metodi	44
2.1	Analisi preliminari	44

2.1.1	Semina in vasetto e trattamenti preliminari	45
2.1.2	Valutazione della stabilità delle membrane	46
2.1.3	Determinazione del contenuto di pigmenti fogliari	47
2.1.4	Valutazione del tasso di sopravvivenza	48
2.2	Analisi proteomiche	49
2.2.1	Analisi degli zuccheri liberi	50
2.2.1.1	Estrazione dei metaboliti (acido-base)	50
2.2.1.2	Procedura per la determinazione enzimatica degli zuccheri liberi	51
2.2.2	Elettroforesi bidimensionale	53
2.2.2.1	Estrazione delle proteine	53
2.2.2.2	Quantificazione delle proteine	55
2.2.2.3	Prima dimensione	56
2.2.2.4	Seconda dimensione	58
2.2.2.5	Colorazione del gel	61
2.2.2.6	Individuazione degli spot proteici differenzialmente espressi	64
2.2.3	Spettrometria di massa mediante MALDI-TOF	64
2.2.3.1	Riduzione e alchilazione	64
2.2.3.2	Digestione <i>in-gel</i> con tripsina	65
2.2.3.3	Analisi MALDI del surnatante	66
3	Risultati e Discussione	67
3.1	Analisi preliminari	67
3.1.1	Tasso di sopravvivenza	67
3.1.2	Stabilità delle membrane	74
3.1.3	Contenuto di pigmenti fogliari	80
3.2	Analisi proteomiche e degli zuccheri liberi	87
3.2.1	Zuccheri	87
3.2.2	Elettroforesi bidimensionali	89
4	Conclusioni	102
	Bibliografia	104