

IL VACUOLO

Si presenta come una grossa vescicola delimitata da una singola membrana semipermeabile di natura lipoproteica, detta **tonoplasto**.

Nelle cellule vegetali adulte di norma si rinviene un unico grande vacuolo centrale, che può occupare anche più del 90% del volume cellulare.

Nelle cellule meristematiche, invece, si trovano piccoli e numerosi vacuoli che, poi, nelle cellule differenziate adulte confluiranno nel vacuolo unico.

I vacuoli prendono origine dal GERL (insieme di parti comuni al reticolo endoplasmatico e apparato del Golgi) e sono ripieni di un **succo vacuolare** acquoso, di composizione chimica molto varia.

FUNZIONI:

- Consente alla cellula di raggiungere notevoli dimensioni
- Evita la formazione di spazi vuoti
- Spinge il citoplasma verso l'esterno della cellula facilitando gli scambi metabolici
- Rappresenta un sistema di escrezione dei rifiuti
- Regola l'omeostasi, funzionando come osmometro, mediante variazioni di concentrazione del succo vacuolare
- Funziona da organulo di riserva (acqua e varie sostanze)
- Concorre alla colorazione di fiori, frutti e altre parti vegetali

CONTENUTO:

- **Acqua**
- **Glucidi:** monosaccaridi (glucosio, fruttosio), disaccaridi (saccarosio, maltosio), polisaccaridi (inulina)
- **Sali inorganici:** tipo e concentrazione dipendono dall'ambiente (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , fosfati, nitrati, ecc.)
- **Sali di acidi organici:** acido citrico (nei frutti immaturi), acido malico, acido succinico, acido ossalico, ecc., spesso in cristalli
- **Aminoacidi:** arginina, lisina
- **Flavonoidi:** pigmenti rossi e blu (antociani) o gialli (flavoni)
- **Alcaloidi:** sostanze basiche probabilmente con funzione di difesa (morfina, cocaina, nicotina, stricnina)
- **Altri metaboliti:** tannini, glucosidi, resine, gomme, oli essenziali, ecc

1. *Osservazione del vacuolo e del nucleo.* Tagliando un pezzetto di epidermide e colorandolo con una soluzione acquosa satura di rosso neutro, il vacuolo si colora di un rosso più o meno intenso a seconda del pH del succo vacuolare. Il rosso neutro è un colorante vitale che entra nel vacuolo, il cui pH è generalmente acido, o in altri compartimenti acidi (nucleo), grazie al meccanismo della trappola ionica: la molecola di colorante, solubile nella fase lipidica delle membrane in forma indissociata, una volta entrata nel comparto acido, si dissocia e rimane intrappolata nell'organello, colorandolo. Nelle cellule morte, nelle quali il tonoplasto non è più integro, il rosso neutro colora solo il nucleo, dove il pH è acido grazie alla presenza degli acidi nucleici. Il vacuolo viene osservato in una piccola porzione di catafillo più interno.

Per evidenziare il vacuolo può essere utilizzata anche una soluzione di acqua glicerinata

2. *Antociani.* Per osservare il viraggio di colore degli antociani presenti nel vacuolo in alcuni fiori, occorre intaccare un petalo (es. di camelia) con una lametta e versare sulla parte rotta una goccia di NaOH 1M; questo alcalinizza il pH del vacuolo nelle cellule in cui penetra e

gli antociani inizialmente rossi, diventano blu. L'osservazione si effettua al microscopio o ad occhio nudo. Si possono anche utilizzare altri petali colorati con antociani, aventi pH vacuolare basico (blu); in tal caso, il viraggio di colore si può indurre con l'HCl 1M.

3. *Inclusi vacuolari*. Nelle foglie esterne del bulbo di cipolla è possibile osservare i cristalli di ossalato di calcio che si formano per precipitazione di questo sale, in seguito alla disidratazione. Tagliando una piccola porzione di un catafillo (sottile) esterno e montandola in acqua, tali cristalli appaiono come tavolette traslucide. L'ossalato di calcio può cristallizzare con una sola molecola di acqua o con tre. I cristalli monoidrati hanno forme allungatissime, appuntite alle due estremità, e sono chiamati cristalli di rafidio o rafidii; i cristalli triidrati sono di forma bipiramidale, su ogni faccia della piramide si depositano tanti cristallini piramidali per cui la figura diventa assai irregolare, con tante punte e viene chiamata drusa o macle; vi sono anche cristalli prismatici.



Figura 1: cristalli prismatici



Figura 2: rafidii

La cristallizzazione nella forma mono o triidrata dipende dalle condizioni dell'ambiente cellulare, la prima è la forma stabile anche ad elevata temperatura, l'altra è metastabile, si ottiene solo a temperature comprese fra 0° e 30°C e tende a trasformarsi nella forma stabile.

Nei catafilli del bulbo di *Allium cepa* sono presenti i cristalli prismatici e i rafidii.

Qual è il motivo che fa sì che all'interno delle piante si possono trovare simili formazioni? Esistono varie teorie a giustificazione della presenza di questi cristalli inclusi all'interno delle cellule. Si ritiene ad esempio che le piante, quando si trovino di fronte ad un eccesso di acido ossalico, possano ovviare al problema facendolo precipitare come sale di calcio insolubile. Altri ritengono, invece, che questo fenomeno sia un meccanismo di difesa posto in essere dalle piante per proteggersi da un eccesso di ioni calcio liberi. In particolare le cellule epidermiche ma anche quelle del mesofillo si comporterebbero come una sorta di filtro a tutela della funzionalità di stomi e cellule di guardia. In sostanza, l'immobilizzazione del calcio nei cristalli sarebbe un modo per regolare l'equilibrio di questo importante ione.



Figura 3: *Lemna minor*

preventivamente deposta una goccia d'acqua distillata.

L'osservazione degli inclusi vacuolari può essere effettuata anche utilizzando piante da acquario. Piante quali quelle appartenenti ai generi *Anubias*, *Cryptocoryne* o *Lemna*, per citarne solo alcune, sono certamente tra le più consigliabili per effettuare le ricerche.

Nel caso non si abbia a disposizione un microtomo, si può semplicemente lasciare le foglie a decomporsi per qualche giorno in un piccolo contenitore con un po' d'acqua dell'acquario da cui le foglie provengono. In questo modo, non sarà difficile individuare i cristalli nel tessuto in disfacimento.

La sezione così ottenuta deve essere appoggiata per mezzo di un pennellino umido su un vetrino portaoggetti dove sia stata

I CLOROPLASTI

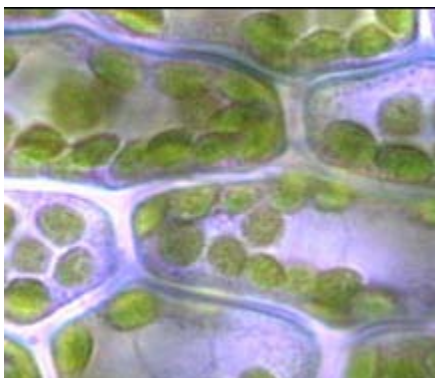


Figura 4: cloroplasti

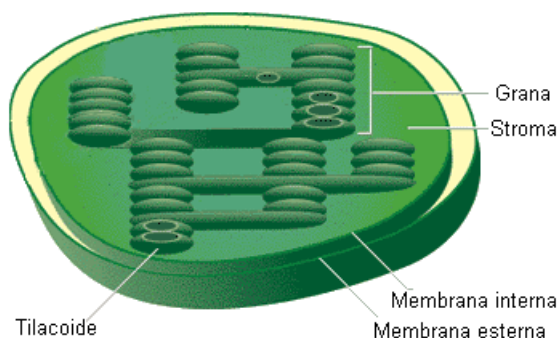
I cloroplasti sono organuli cellulari tipici delle cellule delle piante e dei protisti fotosintetici (alghe). Il loro numero all'interno delle cellule è variabile, alcune alghe ne possono avere solo 1 o 2 di forme molto varie, nelle piante superiori ogni cellula delle parti verdi contiene diverse decine di cloroplasti di forma irregolarmente ovale.

Il materiale migliore in cui osservare i cloroplasti delle piante superiori è costituito dalle foglie di alcune piante acquatiche come l'*Helodea Canadensis* comunemente detta "peste d'acqua", una pianta comunissima sul fondo di stagni e fossi d'acqua abbastanza pulita, viene impiegata anche come pianta da acquario.

La scelta di questo tipo di pianta è dovuta al fatto che le foglie, molto sottili, fanno passare bene la luce, è quindi possibile osservare le cellule ed i cloroplasti mettendo semplicemente una foglia su un vetrino portaoggetti e coprendola con un coprioggetti e poi osservare in trasparenza. Adottando questa semplice tecnica si vedrà un'immagine come quella riprodotta nella foto a sinistra (100X), i corpi verdi sono appunto i cloroplasti. Continuando l'osservazione per qualche minuto si potranno vedere questi organuli muoversi lentamente trascinati dal movimento del citoplasma, questo fenomeno prende il nome di **ciclosi**. Il fenomeno è dovuto alla presenza di proteine contrattili nel citoplasma che, per effetto del calore, diviene più fluido.

I cloroplasti sono verdi perchè contengono la clorofilla il pigmento di colore verde che cattura l'energia luminosa e la utilizza, attraverso una complessa serie di reazioni chimiche (ciclo di Calvin) per produrre glucosio partendo da acqua ed anidride carbonica.

Al microscopio elettronico la struttura interna del cloroplasto risulta molto complessa (disegno a fianco). Da osservare che questi organuli, come del resto i mitocondri possiedono un proprio DNA distinto da quello della cellula in cui sono ospitati, questo ha portato a sviluppare la teoria dell'origine simbiotica, in origine i cloroplasti sarebbero stati dei cianobatteri ed i mitocondri dei batteri che hanno cominciato a vivere in stretta simbiosi con delle cellule, sino a che la simbiosi è diventata un vero e proprio incorporamento e quelli che prima erano organismi indipendenti sono diventati parte integrante della cellula.



I cloroplasti sono specializzati per la fotosintesi; forma, dimensioni e numero sono molto variabili a seconda del gruppo sistematico. Le alghe verdi ne hanno pochi o addirittura uno solo per cellula, il tessuto a palizzata delle piante superiori anche un centinaio. Nei vegetali inferiori, quando il cloroplasto è unico, esso è particolarmente grande (100 µm); nelle piante superiori la media è 2 -3 x 4-6 µm. Forma e dimensioni sono pressoché costanti ed ereditarie. Il numero dei cloroplasti in una pianta è notevole; per esempio è stato calcolato che in una foglia di ricino sono presenti circa 400.000 cloroplasti per mm³. La forma dei cloroplasti nelle alghe può variare da quella a stella, a coppa, a spirale, a nastro, a reticolo, ecc.; nelle piante superiori è a disco o lenticolare.

La localizzazione all'interno della cellula non è casuale: sono per lo più addossati alla parete nei punti dove vi sono spazi intercellulari che facilitano scambi gassosi; correnti citoplasmatiche movimentano i cloroplasti che possono essere orientati rispetto alla fonte di luce, grazie al citoscheletro.

La struttura dei cloroplasti è complessa: la duplice membrana, che forma uno spazio intermembrana di circa 3 nm, circonda lo stroma particolarmente ricco d'enzimi, nel quale si evidenzia un sistema

lamellare costituito da membrane, chiamate tilacoidi. La membrana esterna ha una componente lipidica maggiore ed è relativamente permeabile, mentre quella interna svolge un particolare ruolo selettivo e presenta proteine di trasporto; le due membrane sono tra le più ricche di lipidi in assoluto ed in particolare abbondano di glicolipidi. Questo involucro esterno dei cloroplasti presenta anche enzimi, come la nitrato reduttasi che partecipa al metabolismo dell'azoto.

Lo stroma ha aspetto granulare, con granuli di amido primario, plastoglobuli (goccioline lipidiche), enzimi deputati allo svolgimento della fase oscura della fotosintesi (ma anche per la sintesi di acidi grassi, acidi nucleici, riduzione del solfato, ecc.), DNA, RNA, ribosomi 70S.

Il sistema lamellare è probabilmente derivato dalla membrana interna per invaginazioni che hanno dato origine a sacculi o cisterne chiuse appiattite, i tilacoidi, in parte impilate le une sulle altre; le pile di cisterne o sacculi sono definite *grana* (ogni pila è un *granum*), sono formate da tilacoidi granari e collegate fra loro da tilacoidi intergrana o stromatici. Ogni granum è costituito da 2 a 200 tilacoidi impilati ed ha un diametro di 0,3-1 μm , ma si tratta di un sistema dinamico con variazioni continue di formazione e disaggregazione dei grana. Le membrane tilacoidali amplificano enormemente la superficie di scambio e delimitano uno spazio interno, il lumen tilacoidale o spazio intratilacoidale. Esse partecipano alla fase luminosa e sono fortemente specializzate, con il 50% di lipidi (per la maggior parte glicolipidi insaturi) e 50% di proteine. Le membrane tilacoidali sono configurate in un modo peculiare: le porzioni intergrana presentano ATPasi che esporta H^+ dal lumen (con pH 5) allo stroma (con pH 8), pigmenti accessori, il complesso proteico del fotosistema I con clorofilla a e la catena di trasporto del citocromo b6f, mentre sulle porzioni granari sono localizzati pigmenti accessori e il complesso proteico del fotosistema II con clorofilla a. La disposizione delle molecole proteiche e dei pigmenti sulle membrane è visibile con tecniche di criodecappaggio. I pigmenti sono rappresentati prevalentemente da clorofilla a (75%), clorofilla b (25%), carotenoidi e derivati (xantofille, luteina); nelle alghe rosse i rodoplasti (corrispondenti dei cloroplasti) hanno clorofilla a, clorofilla d, carotenoidi e ficoeritrina; nelle alghe brune i fenoplasti contengono clorofilla a, clorofilla c e fucoxantina.

I cloroplasti sono dotati di un proprio DNA e sono in grado di replicarsi in maniera autonoma all'interno della cellula che li ospita, indipendentemente dalla duplicazione della cellula stessa.

Tuttavia, per la loro sopravvivenza, dipendono molto strettamente dal DNA nucleare, che fornisce l'informazione per sintetizzare molte proteine. Una di queste è la ribuloso-difosfato-carbossilasi, l'enzima fissatore della CO_2 , indispensabile per la sintesi degli zuccheri. La sua molecola è formata da 16 sub-unità delle quali 8 sono codificate dal DNA del cloroplasto e 8 sono codificate dal DNA nucleare.

È necessaria quindi una coordinazione tra il genoma nucleare e quello del cloroplasto.

Questo è solo un esempio; molte proteine del cloroplasto vengono codificate dal nucleo. Penso quindi che, isolati dal resto della cellula, i cloroplasti possano funzionare solo per brevissimo tempo e anche la loro sopravvivenza è limitata.

I CROMOPLASTI

I cloroplasti, organuli cellulari di colore verde nei quali avviene la fotosintesi, in alcune parti delle piante, vanno incontro a delle trasformazioni: perdono la clorofilla e quindi il colore verde e la capacità di effettuare la fotosintesi ma contengono invece dei pigmenti liposolubili detti carotenoidi e xantofille.

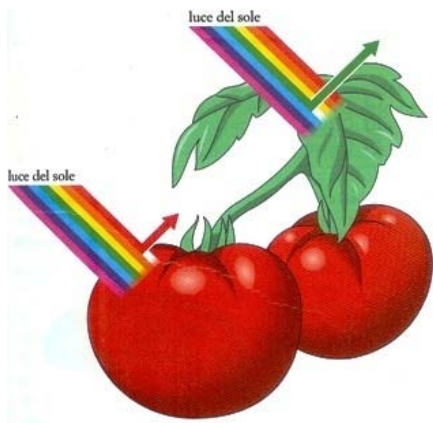


Figura 5: i colori che percepiamo corrispondono alle lunghezze d'onda della luce che vengono riflesse, per esempio un pomodoro maturo risulta di colore rosso in quanto riflette la banda rossa dello spettro, mentre altre bande vengono assorbite.

Questo avviene ad esempio nei pomodori e nei peperoni i cui frutti, inizialmente verdi, finiscono, a conclusione del processo di maturazione, col divenire rossi, o gialli o arancioni.

I carotenoidi sono un gruppo di circa 50 sostanze che conferiscono alla parte di pianta in cui sono presenti una colorazione gialla, arancione o rossa.

I carotenoidi sono pigmenti dotati di un'ampia diffusione, presenti sia nelle piante che negli animali. Il più conosciuto è il carotene, così chiamato perché dà il colore alle carote, mentre il pomodoro è colorato da un altro carotenoide, il licopene. I carotenoidi sono presenti anche nelle foglie verdi, ma non sono visibili finché l'autunno non fa scomparire la clorofilla.

L'osservazione dei cromoplasti è molto semplice, basta staccare con attenzione uno strato sottile (praticamente unicellulare) dell'epidermide di un pomodoro o di un peperone maturo, mettere il pezzetto di epidermide su un vetrino coprioggetto con una goccia d'acqua o di glicerina, coprire il tutto con un vetrino coprioggetto ed osservare al microscopio.

La foto riprodotta di lato è stata ottenuta con questa tecnica e mostra una cellula di epidermide di peperone rosso ingrandita 400 volte. I numerosi corpi di colore rosso aranciato sono appunto i cromoplasti.

I cromoplasti sono presenti nei petali (viola del pensiero), nella buccia di vari frutti (pomodoro), a volte nelle radici di alcune piante (carota o barbabietola rossa); hanno funzione vessillare cioè rendono vistosa la parte delle piante in cui si trovano (es. nei fiori attirano gli insetti per l'impollinazione)

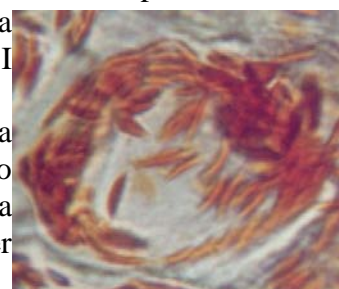


Figura 6: cromoplasti

Carotenoidi

I carotenoidi sono pigmenti di colore giallo o arancione la cui molecola ha due anelli esagonali (aperti o chiusi) collegati fra loro da una lunga catena isoprenica con doppi legami coniugati. Sono idrofobi, essendo generalmente costituiti esclusivamente da C ed H.

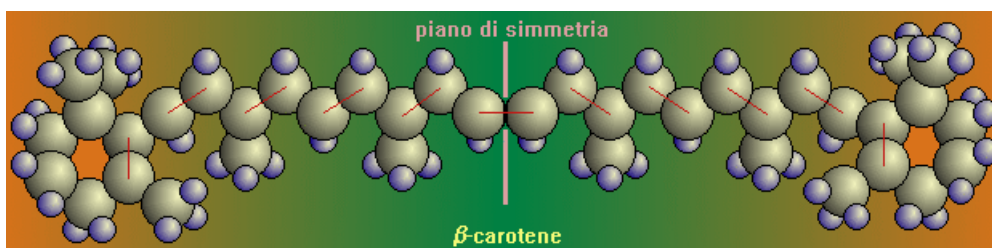


Figura 7: carotenoidi. I tratti rossi indicano la posizione dei doppi legami.

Oltre a quella di pigmenti accessori i carotenoidi hanno un'altra importante funzione: proteggono la clorofilla dalla fotoossidazione, una reazione tra clorofilla e ossigeno atmosferico, attivata dalla luce.

Un particolare interessante: le donne hanno un contenuto sottocutaneo in carotenoidi che è superiore a quello dei maschi.

I carotenoidi sono sostanze costituite solo da carbonio e idrogeno, con una banda d'assorbimento della luce visibile molto ampia che presenta 3 picchi in corrispondenza del verde-violetto. Il picco massimo d'assorbimento dipende dalla costituzione chimica: ogni doppio legame tra gli atomi di carbonio in più sposta il picco massimo verso il rosso di circa 0,02 nm quando il pigmento è disciolto in carbonio disolfuro. L'aggiunta di ossigeno dà luogo a xantofilla. I carotenoidi cristallizzano facilmente; inoltre, quando sono in soluzione, e specialmente in presenza di luce, vanno incontro a ossidazione e si trasformano in composti incolori. Sono invece molto stabili quando la pressione d'ossigeno è bassa, al buio e a basse temperature.

Il colore dei carotenoidi varia dal giallo all'arancio, dal rosso al violetto; la spiegazione sta nel numero di doppi legami tra gli atomi di carbonio C=C. Sono insolubili in acqua, solubili nei grassi, in etere e acetone. Un tempo i carotenoidi degli animali erano detti lipocromi, poiché erano stati scoperti disciolti nei grassi, o lipidi.

Il carotenoide giallo delle piume del Canarino e di altri uccelli è contenuto nella cheratina, la proteina principale della piume. Dapprima il pigmento si trova sotto forma di goccioline lipidiche disposte tra le cellule dei rudimenti delle piume, ma quando inizia la cheratinizzazione passa nella cheratina. I carotenoidi sono responsabili della colorazione gialla di molte piume, anche se alcune sono gialle a causa di feomelanina giallastra o di un tricocromo. Nei Parrocchetti esistono pigmenti gialli di natura tuttora sconosciuta.

Un carotenoide può apparire giallo, arancio o rosso in rapporto alla sua concentrazione, come accade in punti diversi nel mantello del Cardellino. I carotenoidi formano lo schermo giallo trasparente che fa virare il blu strutturale in verde. Il giallo del tuorlo è dovuto a carotenoidi: si tratta della miscela di luteina o xantofilla e zeaxantina. L'astaxantina colora in rosso i bargigli del Fagiano. Il blu, il violetto e il rosso delle barbule di certi piccioni orientali, particolarmente del genere *Ptilinopus*, sono dovuti a rodoxantina, presente anche nelle piante.

Gli animali non sono in grado di sintetizzare i carotenoidi come fanno invece i vegetali, trovandoli già pronti nell'alimentazione. Proprio dal tipo d'alimentazione dipende l'intensità del giallo nel burro e nel tuorlo. Anche la colorazione dei Fenicotteri dipende dal tipo d'alimentazione, naturale oppure artificiale, come può accadere in uno zoo. Xantofilla è presente nelle piume degli uccelli; il becco e la pelle possono contenere miscele di carotene e xantofilla; il carotene è presente nel tuorlo in aggiunta al prevalente contenuto in xantofilla e zeaxantina.

È stato dimostrato che Canarini bianchi, perché tenuti a dieta povera di xantofilla, sono incapaci di assorbire carotene dalla razione. Le piume bianche diventano nuovamente gialle quando xantofilla o un suo derivato sono aggiunti alla dieta. Si possono ottenere piume rosse nutrendo i Canarini con paprika che contiene capsantina; un rosso più profondo è ottenuto con rodoxantina.

La luce favorisce la deposizione dei carotenoidi nei tessuti animali: il gamberetto d'acqua dolce, tenuto al buio, si scolorisce; granchi, aragoste e attinie si colorano in proporzione alla luce che ricevono. Se tenuti in soluzione, i carotenoidi vengono scoloriti dall'ossigeno e dalla luce.

I carotenoidi gialli o rossi vengono affievoliti esponendo le piume alla luce, ma solo dal lato rivolto alla luce solare; al buio non cambiano d'intensità. Nel corvo *Cissa chinensis*, del Sudest Asiatico, il piumaggio è verde e diventa blu se esposto alla luce del sole: si determina un'attenuazione del filtro giallo posseduto dalle piume; lo stesso accade a quegli uccelli che vivono nel folto della foresta, che rimangono verdi finché non frequentano gli spazi aperti, dove la luce del sole, alterando la pellicola di carotenoidi, li colora in blu.

Anche la temperatura influenza lo sviluppo dei carotenoidi: una prova è fornita dal Pesce rosso, *Carassius auratus*, che inizia la vita con un abito marrone da melanina e assume il colore arancio man mano che cresce, però solo a temperature superiori a 18°C; pertanto si pensa che i cromatofori contenenti astaxantina riescano a svilupparsi e a funzionare solo a certe temperature.

Anche gli ormoni sessuali influenzano la deposizione di carotenoidi, come accade per le melanine. Ambedue i sessi dello Stornello, *Sturnus vulgaris*, hanno il becco nero da melanina fuori dal

periodo degli amori; in quello riproduttivo diventa giallo arancio brillante; la castrazione provoca un becco nero sia nel maschio che nella femmina; diventa giallo con gli androgeni ma non con gli estrogeni.

La vitamina A, importante per la sintesi dei pigmenti visivi, proviene da alcuni carotenoidi. Non esiste nelle piante, in quanto deriva da un processo di trasformazione che si svolge negli animali partendo dalla molecola di β -carotene dei vegetali. Altro precursore è l' α -carotene o criptoxantina, presente in molte piante e nel tuorlo.

Xantofilla: letteralmente, in greco, significa foglia gialla. È un composto della serie dei carotenoidi, di formula bruta $C_{40}H_{56}O_2$, che presenta la struttura di un diidrossiderivato dell' α -carotene.

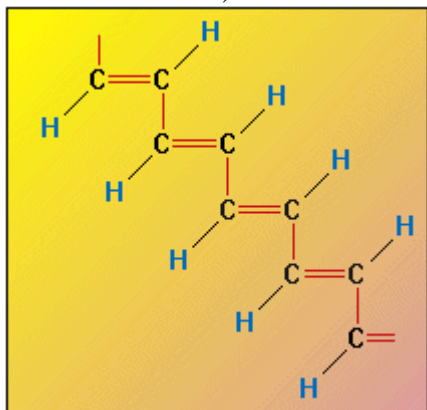
Particolarmente ricca in xantofilla è l'erba medica, impiegata per preparare mangimi con elevato potere pigmentante.

Doppi legami coniugati

In molte molecole organiche di interesse biologico, particolarmente quelle addette alla cattura di radiazioni luminose nella zona visibile dello spettro, sono presenti sequenze più o meno lunghe di atomi di carbonio legati alternativamente con legame singolo e con legame doppio.

Questa struttura permette il facile trasferimento degli elettroni, relativamente mobili, dei legami doppi.

Quanto più è lunga la catena, tanto più le radiazioni assorbite si avvicinano al colore rosso (una catena di legami singoli assorbe solo radiazioni ultraviolette, cioè ad alta energia e invisibili all'occhio umano).



Alcuni H possono essere sostituiti da gruppi organici (detti cromofori) che possono contribuire a spostare la zona di assorbimento delle radiazioni.