

Analisi Proteomica e Morfocitologica in popolazioni di *Posidonia oceanica* in relazione al Disturbo Ambientale

S. Mazzuca¹, A. Spadafora¹, M. Bracale², M. Marsoni², R. Cozza¹, F. Rende¹, A. Chiappetta¹, A.M. Innocenti¹

¹ Laboratorio di Citofisiologia Vegetale, Dipartimento di Ecologia, Università della Calabria 87030 Rende, ² Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università dell'Insubria, Varese

LA PROBLEMATICATA- La regressione delle praterie di *Posidonia oceanica* nell'area del Mediterraneo è da tempo associata al progressivo degrado degli ecosistemi marini costieri. La struttura genetica poco variabile, dovuta all'attitudine alla propagazione stolonica, fanno infatti di questa fanerogama marina un elemento fragile alle pressioni ambientali. Allo scopo di verificare se e quali strategie di recupero e di difesa la pianta adotti in condizione di stress ambientale sono stati intrapresi studi ecologici, fenologici e citofisiologici su piante provenienti da due praterie, lungo il litorale tirrenico calabrese, sottoposte a diverse condizioni di disturbo ambientale e riferite come M3 e M4. La prateria M3 è indicata, dai parametri considerati, come conservata, mentre M4 è considerata disturbata. L'insieme dei dati rilevati indicano chiare correlazioni fra la macrostruttura e fenologia delle praterie e significative variazioni citofisiologiche legate allo stress, quali contenuto in fenoli e livelli di citochinine endogene. Nel lavoro che presentiamo, ci siamo posti l'obiettivo di verificare nelle due popolazioni l'esistenza di ulteriori variazioni a livello morfocitologico, con particolare riguardo ai caratteri morfometrici nucleari; abbiamo inoltre ampliato la nostra indagine con un tentativo di approccio proteomico funzionale al fine di identificare marcatori di stress ambientale a livello di proteina.

Come parametro morfometrico nucleare è stata stimata l'area nucleare media nelle cellule dell'apice vegetativo e delle foglie di piante provenienti dai siti M3 e M4 (Fig 1) in due diversi momenti dell'anno (Fig 2). Si sono riscontrate significative differenze di tale parametro in relazione alle diverse condizioni di impatto ambientale. Nei campioni provenienti dal sito M4 si registra, infatti, quale che sia il momento stagionale, un notevole aumento dell'area nucleare sia nell'apice che nelle bozze fogliari e nelle foglie, rispetto ai valori riscontrati nei campioni del sito M3. Tale aumento si accompagna ad un'inversione delle variazioni stagionali del valore dell'area nucleare, che nel sito M3 è massimo nel mese di novembre, mentre nel sito M4 i valori maggiori si registrano in marzo. L'insieme di questi dati suggerisce l'instaurarsi nel meristema apicale e nelle giovani foglie di *P. oceanica* di mutate condizioni metaboliche nucleari, non solo in relazione alla stagionalità, ma anche a condizioni di disturbo ambientale, analogamente a quanto accade nelle piante terrestri.

ESTRAZIONE DELLA PROTEINE E ANALISI SDS-PAGE

I METODI- Il protocollo estrattivo per la separazione mono- e bidimensionale delle proteine totali da foglia adulta si basa essenzialmente sulla precipitazione proteica in ambiente acido (20% TCA) e successiva purificazione in fase fenolica. Per l'analisi 1D è stato utilizzato un gel di poliacrilammide al 12%; per l'analisi 2D, la separazione IEF è stata effettuata su IPG strip pH 3-10, 7 cm. L'analisi 1D-SDS-PAGE ha evidenziato oltre 60 bande polipeptidiche di peso molecolare compreso fra 10-200 kDa con la tipica banda prominente di 55 kDa corrispondente alla subunità maggiore della Rubisco. L'analisi 2D-SDS-PAGE ha rilevato circa 150 spots con una maggioranza di peptidi nel range di pI 4.5-6.5.

I RISULTATI- In entrambi i siti analizzati è stata riscontrata una variazione nel contenuto proteico nei tessuti fogliari in funzione del periodo di prelievo con una elevata omogeneità intrapopolazione; il contenuto proteico risulta infatti maggiore nel periodo autunnale rispetto a quello primaverile; comparativamente nei tessuti fogliari della popolazione del sito M4 si è riscontrata un minor contenuto in proteine rispetto al sito M3 in entrambi i periodi analizzati (Tab1).

La nostra ipotesi è che l'efficacia del metodo estrattivo vari in funzione della presenza nei tessuti di *P. oceanica* di fenoli i cui livelli di sintesi e accumulo nelle cellule subiscono notevoli fluttuazioni durante l'anno e aumentano significativamente nelle piante sottoposte a disturbo ambientale [Cozza et al, *Chemistry and Ecology*, 2004, 20: 215-223]. Questi composti sono notoriamente agenti interferenti nell'estrazione e purificazione delle frazioni proteiche. In questo contesto le variazioni nel contenuto proteico possono essere messe in relazione allo stadio di sviluppo della pianta e alle condizioni di adattamento allo stress.

ANALISI MORFOCITOLOGICA

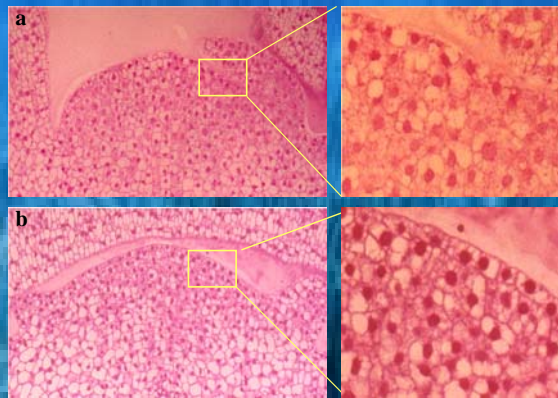
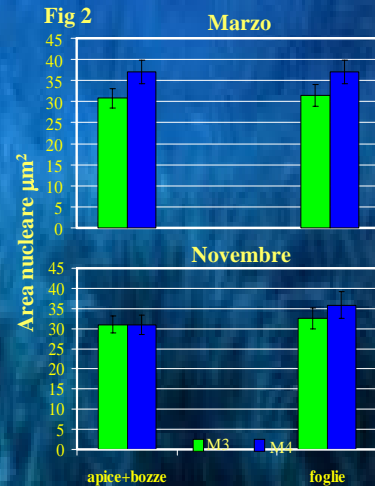


Fig 1. Microfotografie dell'apice vegetativo di piante del sito M3 (a) e del sito M4 (b) nelle quali si osserva la variazione delle dimensioni nucleari



ESTRAZIONE DELLA PROTEINE E ANALISI SDS-PAGE

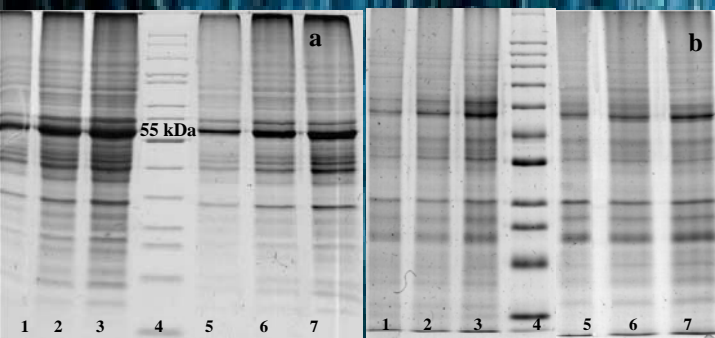


Fig 3. Linee 1,2,3 = sito M3 10, 15, 20 µg proteina; Linee 5,6,7 = sito M4 10, 15, 20 µg proteina; Linea 4 = Sigma Markers 200-10 kD

Tab 1. Variazione del contenuto in proteine totali in tessuti fogliari nelle popolazioni M3 e M4 in due diversi momenti dell'anno. I valori sono la media di estrazioni indipendenti in 10 individui per ciascun sito e prelievo.

Periodo di prelievo	Sito M3	Sito M4
	µg/g peso fresco	µg/g peso fresco
Novembre 2003	286 (25)	200 (18)
Marzo 2004	251 (32)	193 (25)

Il dato di maggior rilievo che emerge dall'analisi dei pattern polipeptidici degli estratti proteici ottenuti da foglie adulte in entrambi i siti, è che in autunno (A) vi è una maggiore espressione (a parità di proteina caricata) della subunità di 55 kD della Rubisco rispetto agli estratti di primavera (B). Dall'analisi comparativa dei due siti si riscontra che i livelli di espressione della subunità di 55 kD della Rubisco sono significativamente minori nelle piante del sito M4. L'analisi 2D ha confermato la diminuzione della subunità della Rubisco negli estratti del sito M4 (Fig 4 b, vedi freccia) e di molte altre classi polipeptidiche (Fig 4 b, cerchi rossi), altre risultano non variate (Fig 4, cerchi verdi) e non sono presenti alcune classi polipeptidiche presenti invece nel sito M3 (Fig 4, cerchio blu).

CONCLUSIONI - In risposta a condizioni di disturbo ambientale *P. oceanica* manifesta adattamenti metabolici a livello dell'attività gluconeogenica dipendente dal processo fotosintetico cui si accompagnano variazioni a livello di parametri indiretti del metabolismo nucleare. Tali variazioni, come risposte di adattamento allo stress, si intersecano con le variazioni stagionali cui tali parametri vanno incontro.

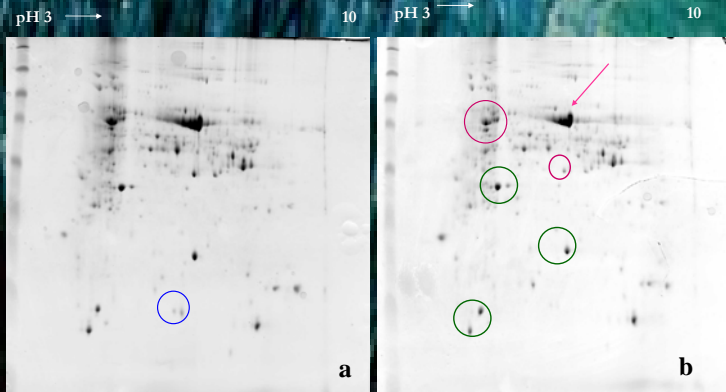


Fig 4. Separazione bidimensionale (2D) degli estratti proteici dei siti M3 (a) e M4 (b) di foglie prelevate in autunno