

LA CELLULA VEGETALE

II MICROSCOPIO OTTICO

L'origine del microscopio ottico è ancora materia di discussione.

La maggior parte degli studiosi, tuttavia, fanno risalire i primi microscopi ottici alla fine del 1500, primi del 1600 e ne attribuiscono la costruzione agli olandesi "Zacharias e Hans Janssen" e all'italiano Galileo Galilei.

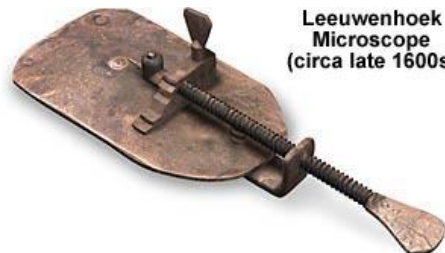
Tali microscopi erano costituiti da due o tre tubi, che potevano scorrere uno dentro l'altro, con lenti alle due estremità.

Questi microscopi permettevano di ingrandire il campione da tre a dieci volte.

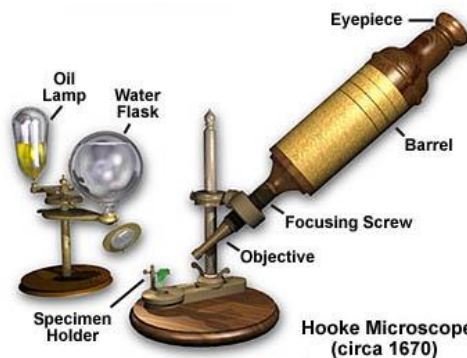
E' soprattutto durante la seconda metà del diciassettesimo secolo che furono costruiti numerosi altri modelli di microscopio ottico, cercando soprattutto di migliorarne i sistemi di lenti per l'ingrandimento dei campioni.



The First Compound Microscope (circa 1595)



Leeuwenhoek Microscope (circa late 1600s)



Hooke Microscope (circa 1670)

STRUTTURA del MICROSCOPIO OTTICO

I microscopi sono strumenti costruiti per produrre immagini ingrandite di oggetti molto piccoli.

Il microscopio deve svolgere tre funzioni principali:

- Ingrandire l'immagine del campione osservato
- Separare i dettagli dell'immagine
- Rendere visibili i dettagli all'occhio umano

Di base il microscopio ottico è costituito da due **unità ottiche di ingrandimento**:

- L'obiettivo (sistema di lenti posto vicino al campione)
- L'oculare (sistema di lenti posto vicino all'occhio dell'osservatore)

L'**ingrandimento** è dato dal sistema di lenti poste nell'obiettivo (1-100X), da altre poste nell'oculare (5-20X) e, se presenti da quello prodotto da lenti intermedie (poste tra oculare e obiettivo). E' possibile calcolare l'**ingrandimento totale (M)**:

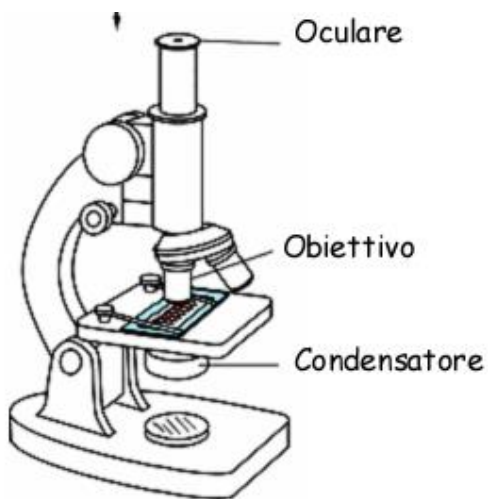
$$M = M_{ob.} \times M_{oc.} (\times M_{int.})$$

Con:

$M_{ob.}$ = ingrandimento obiettivo;

$M_{oc.}$ = ingrandimento oculare

$M_{int.}$ = ingrandimento lenti intermedie

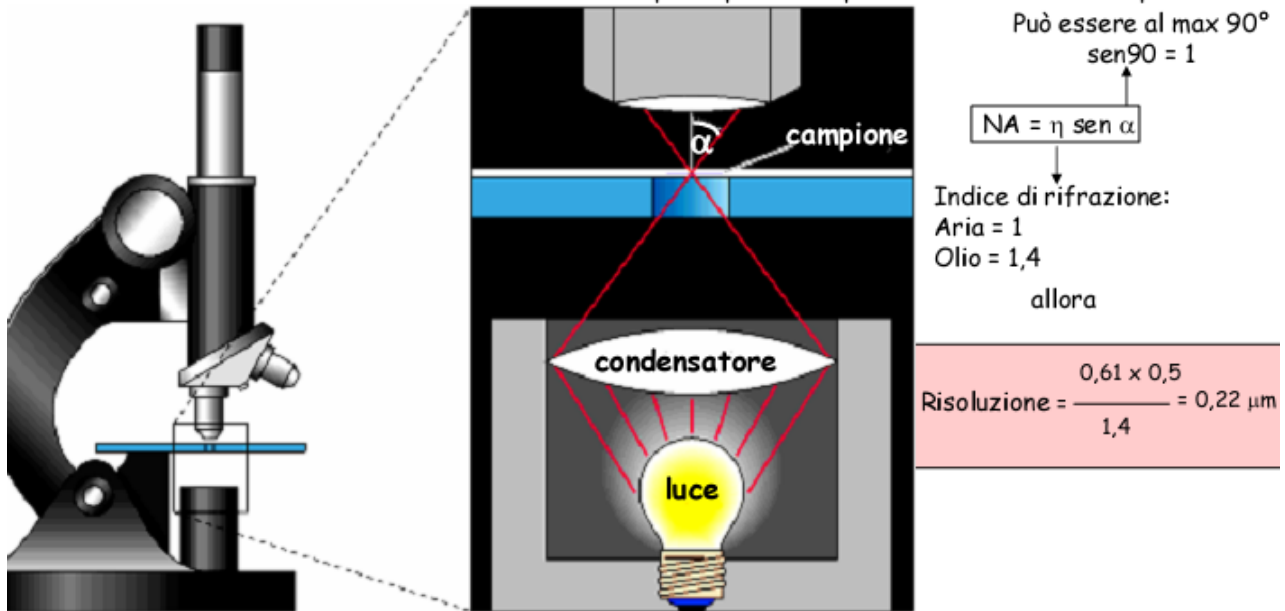


Microscopia ottica

Il limite di risoluzione del M.O. è di circa $0,2 \mu\text{m}$. Significa che due oggetti separati da una distanza minore di $0,2 \mu\text{m}$ non sono distinguibili.

$0,61 \lambda$ → lunghezza d'onda luce visibile = $0,5 \mu\text{m}$

Risoluzione = $\frac{0,61 \lambda}{NA}$ → apertura numerica: può essere immaginata come le dimensioni del cono di luce che entra nella lente del microscopio dopo essere passata attraverso il campione

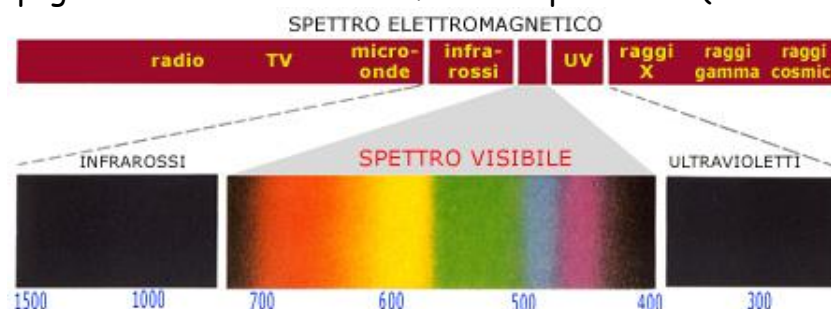


N.B. Per aumentare il **potere di risoluzione** occorre agire sulla **lunghezza d'onda** oppure sull'**apertura numerica dell'obiettivo**.

Il **potere di risoluzione** è indipendente dall'ingrandimento dell'obiettivo

La MICROSCOPIA a FLUORESCENZA

La luce visibile è una piccola porzione dello spettro elettromagnetico (tra 400nm e 700nm) e si propaga come un'onda e sotto forma di particelle (FOTONI).



La *microscopia a fluorescenza* sfrutta le lunghezze d'onda più corte dello spettro (verso l'ultravioletto) per eccitare delle particolari molecole che quando vengono irradiate riemettono luce nello spettro del visibile (**fluorocromi**), oppure sfrutta la fluorescenza naturale del preparato (**autofluorescenza**).

Il termine FLUORESCENZA è stato coniato intorno alla metà del 19° secolo, quando **Stokes** vide che un minerale diventava fluorescente se illuminato con luce ultravioletta.

I primi microscopi a fluorescenza sono stati costruiti agli inizi del 20° secolo.

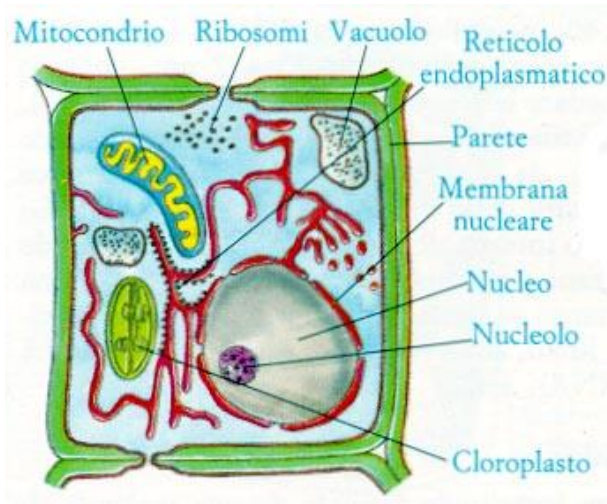
Gli studi effettuati con tali microscopi hanno permesso di capire che molte sostanze (cristalli, resine, clorofilla, vitamine...) sono in grado di emettere luce fluorescente se irradiate a determinate lunghezze d'onda (**fluorescenza primaria o autofluorescenza**).

Intorno agli anni 30 sono state, messe a punto tecniche che utilizzano i **fluorocromi**, per rendere fluorescenti campioni che, normalmente, non lo sono (**fluorescenza secondaria**).

Inoltre, intorno agli anni 50, Coons e Kaplan utilizzarono anticorpi marcati con la fluoresceina per localizzare antigeni specifici nei diversi tessuti tessuti (**immunofluorescenza**).

<i>Fluorocromo</i>	<i>assorbimento</i>	<i>emissione</i>
<i>FITC</i>	<i>495nm</i>	<i>519nm</i>
<i>Rodamina</i>	<i>570nm</i>	<i>576nm</i>
<i>DAPI</i>	<i>345nm</i>	<i>455nm</i>
<i>Calcofluorwhite</i>	<i>350nm</i>	<i>440nm</i>

LA CELLULA VEGETALE



E' caratterizzata dalla presenza:

- di una **parete primaria** costituita principalmente da cellulosa e talvolta (in alcuni tessuti) da una secondaria
- di organelli, i **Plastidi**, con diverse importanti funzioni
- del **Vacuolo**, organello molto importante nel mantenimento del turgore cellulare (piccoli e numerosi che si fondono in un unico grande vacuolo in cellule adulte).

Esperienza nr. 1

I Plastidi (i **Cloroplasti**)

Obiettivi:

Osservazione di alcuni tipi di Plastidi nei tessuti vegetali.

Materiale occorrente:

- materiale vegetale (es. parti verdi di piante diverse)
- acqua distillata, bisturi o lametta, pipetta, pinzetta, vetrini porta e coprioggetto, carta assorbente.

Procedimento:

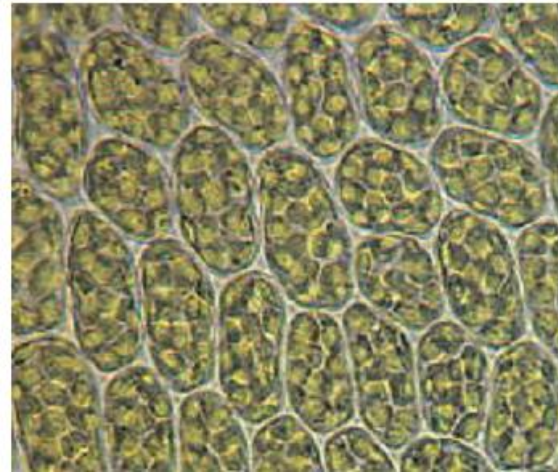
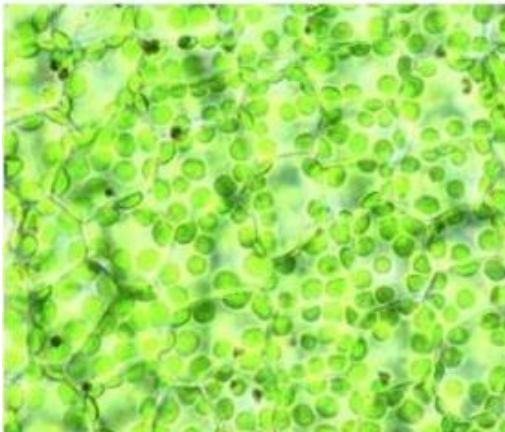
Preparare un vetrino portaoggetto per ciascun campione contenente:
una goccia di acqua distillata

Effettuare una spellatura delle parti verdi della pianta con l'ausilio del bisturi o con la lametta per cercare di ottenere un unico strato di cellule.

Porre i campioni sui vetrini portaoggetto dove è stata precedentemente messa una goccia di acqua distillata e coprire delicatamente con un vetrino coprioggetto.

Osservare i preparati al microscopio.

Risultati:



Cellule contenenti cloroplasti ricchi di clorofilla
Cloroplasti nelle foglioline di muschio

Conclusioni:

Il colore verde di molti organi vegetali è dovuto alla presenza, all'interno delle cellule, di specifici pigmenti, le **clorofille**. Questi pigmenti sono contenuti all'interno di particolari plastidi, detti **CLOROPLASTI**, importanti perché sede del processo della fotosintesi clorofilliana.

Esperienza nr. 2

I Plastidi (i Cromoplasti)

Obiettivi:

Osservazione di alcuni tipi di Plastidi nei tessuti vegetali.

Materiale occorrente:

- materiale vegetale (es. Carota, pomodoro)
- acqua distillata, bisturi o lametta, pipetta, pinzetta, vetrini porta e coprioggetti, carta assorbente.

Procedimento:

Preparare un vetrino portaoggetto per ciascun campione contenente:
una goccia di acqua distillata

Togliere dalla carota lo strato superficiale e raschiare un po' di materiale con la punta del bisturi o con la lametta oppure effettuare una sezione sottile della carota.

Prelevare una piccola quantità di polpa di pomodoro, eseguendo il prelievo al di sotto della buccia dove la polpa è ancora compatta.

Porre i campioni su un vetrino portaoggetto dove è stata precedentemente messa una goccia di acqua distillata e coprire delicatamente con un vetrino coprioggetto.

Osservare i preparati al microscopio.

Risultati:

Nella carota, all'interno delle cellule, si possono osservare numerose strutture rettangolari o aghiformi di colore arancione che rappresentano il carotene (pigmento arancione).

La polpa del pomodoro è costituita da cellule piuttosto grosse e rotondeggianti con all'interno corpuscoli sferoidali o strutture aghiformi di colore rosso. Le grosse cellule della polpa di pomodoro contengono il pigmento del pomodoro che è il licopene che, cristallizzando, forma i piccoli aghi visibili al microscopio.

Conclusioni:

Il colore rosso, arancione o giallo di molti organi vegetali è spesso dovuto alla presenza, all'interno delle cellule, di specifici pigmenti che talvolta cristallizzano. Questi pigmenti, a loro volta, sono contenuti all'interno di particolari plastidi, detti **CROMOPLASTI**.

Esperienza nr. 3

L'amido secondario (gli Amiloplasti)

Obiettivi:

Osservazione di alcuni tipi di Plastidi nei tessuti vegetali.

Materiale occorrente:

- materiale vegetale (es. patata, banana, fagiolo)
- soluzione di Lugol (2g di ioduro di potassio in 100ml di acqua distillata, aggiungere 0.2g di iodio)
- acqua distillata, bisturi o lametta, pipetta, pinzetta, vetrini porta e coprioggetto, carta assorbente.

Procedimento:

Preparare un vetrino portaoggetto per ogni campione contenente:
una goccia di soluzione di Lugol

Prelevare, con la punta del bisturi o con la lametta, una piccola quantità delle parti interne di ogni vegetale in esame oppure effettuarne una sezione sottile.

Porre il campione sul vetrino portaoggetto precedentemente preparato, attendere 10-20 sec. e coprirlo con un vetrino coprioggetto.

Osservare i preparati al microscopio.

Risultati:

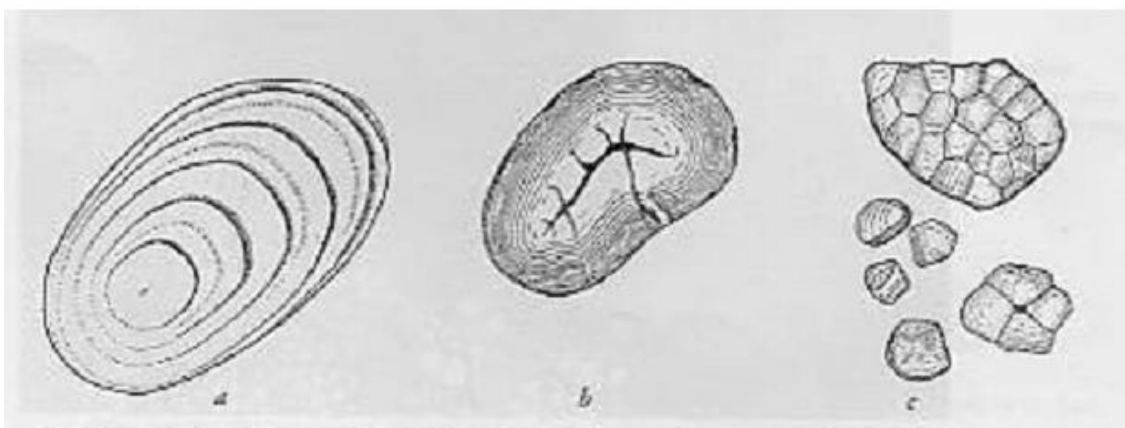
Al microscopio sono visibili molti granuli dall'aspetto caratteristico, la cui forma varia nei diversi preparati. La soluzione di Lugol, colora i granuli di amido di blu-violetto.

Conclusioni:

Le strutture colorate osservate al microscopio sono, pertanto, i granuli di amido contenuti nei plastidi delle cellule dei campioni in esame. Poiché i campioni esaminati appartengono a parti non fotosintetizzanti della pianta (non sono verdi, non c'è clorofilla), è possibile affermare che i plastidi osservati sono **AMILOPLASTI**. In essi l'amido si forma a partire da glucosio che è stato sintetizzato a livello di zone fotosintetizzanti e trasportato fino agli organi in esame sotto forma di saccarosio per essere, in queste sedi, nuovamente convertito in glucosio e quindi in amido. Si tratta pertanto di **AMIDO SECONDARIO**, depositato nella pianta in zone adibite all'accumulo di riserve energetiche.

I granuli di amido possono assumere forme diverse nelle varie specie (vedi figura). Nei tessuti della patata, per esempio, rivelano una struttura a cerchi concentrici; questi si originano in quanto l'amido viene via, via depositato nell'amiloplasto intorno ad un nucleo centrale (*ilo*) secondo anelli concentrici di diametro sempre crescente.

La forma complessa dei granuli d'amido nel riso è dovuta, invece, alla sua deposizione intorno a più *ili* contemporaneamente.



GRANULI DI AMIDO DI DIVERSE FORME .a. Patata. b. Fagiolo. c. Riso. Ciascun granulo si forma, negli amiloplasti, in seguito alla deposizione di amido.