



LE PIANTE

Oggi giorno le biotecnologie vegetali sono molto importanti in un mondo in cui si combatte l'uso di pesticidi nell'agricoltura, e i grassi animali sono stati riconosciuti come la causa di molteplici problemi di salute, dando molta importanza ad una dieta basata più sui vegetali che sulle proteine e grassi animali, il cui eccesso può causare numerose malattie.

Le piante sono molto importanti anche da un punto di vista ambientale: producono ossigeno (O_2), senza il quale non può formarsi ozono (O_3), costituente della barriera atmosferica che impedisce ai raggi UV di raggiungere la crosta terrestre. La diminuzione delle piante ha portato alla formazione del *buco dell'ozono* permettendo il passaggio dei raggi ultravioletti: questi arrecano grandi danni al Dna, che non possono essere efficacemente contrastati dai sistemi di riparazione presenti all'interno delle cellule colpite.

Le piante inoltre riciclano la CO_2 in eccesso prodotta dall'uomo, e la convertono in O_2 (tramite il processo della *fissazione dell'anidride carbonica*, alimento fondamentale delle piante) indispensabile alla sopravvivenza di numerosi organismi. L'innalzamento della quantità di anidride carbonica ha portato al cosiddetto *effetto serra*, con conseguente innalzamento della temperatura del globo (a lato). Va inoltre ricordato che le piante giocano un ruolo fondamentale nel riequilibrio dell'umidità atmosferica grazie al vapore acqueo prodotto per traspirazione.



Le piante hanno necessità molto semplici per completare il loro ciclo vitale, ossia hanno bisogno semplicemente di acqua e sali minerali (come fosfati, solfati, nitrati), a differenza di un organismo come *E.Coli* il quale necessita di molecole organiche ed elementi minimi indispensabili.

Gli organismi si dividono in due grandi gruppi in base alle richieste nutrizionali:

- **Autotrofi:** in grado di ricavare le sostanze organiche nutrizionali a partire da composti molto semplici attraverso l'utilizzo di una fonte energetica, che può essere l'energia solare (*fotoautotrofi*) o uno ione inorganico da ossidare (*chemioautotrofi*).
- **Eterotrofi:** necessitano di molecole organiche complesse da cui ricavare energia.



Entrambi i tipi di metabolismo si basano sui processi di ossidoriduzione.

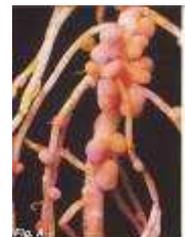
Sebbene le piante possano essere sia acquatiche sia terrestri, le esigenze sono le stesse: acqua, anidride carbonica e sali minerali. L'anidride carbonica nelle piante terrestri è recuperata dall'ambiente grazie agli *stomi* (a lato), aperture presenti sulla faccia inferiore della foglia che permettono all'aria di entrare e all'anidride carbonica raggiungere il mesofillo; nelle piante acquatiche invece è utilizzata l'anidride carbonica

disciolta in acqua, a volte difficile da reperire. Le piante nel passaggio dall'ambiente acquatico a quello terrestre hanno dovuto evolvere anche meccanismi che contrastassero la disidratazione e la gravità.

Le catene alimentari si basano su organismi produttori autotrofi (soprattutto piante) che trasformano sostanze inorganiche in sostanze organiche, che serviranno da nutrimento per i consumatori (erbivori, carnivori); il ciclo si conclude grazie ai batteri decompositori che trasformeranno la materia organica morta in inorganica, pronta per essere riutilizzata dai produttori.

Il ciclo del carbonio consiste nella produzione di anidride carbonica, a partire dall'ossigeno, da parte degli organismi consumatori attraverso la respirazione cellulare; la CO_2 verrà in seguito utilizzata dalle piante nella fotosintesi e ritrasformata in ossigeno, ricominciando ciclo. Gli scarti organici sono convertiti in nuovi nutrienti inorganici dai batteri decompositori del suolo.

Le piante non sono in grado di fissare l'azoto atmosferico, ma sono in grado di utilizzare nitrati e ammonio (a differenza degli animali) prodotti dai batteri azotofissatori tramite la fissazione dell'azoto in ammine o amminoacidi; l'utilizzo di queste sostanze da parte dei consumatori (che non sono in grado di organizzare l'azoto) porta ad un accumulo di ammonio dannoso, che viene escreto attraverso le vie urinarie per essere di nuovo utilizzato da altri organismi. Le piante (soprattutto leguminose) hanno evoluto strategie simbiotiche a livello delle radici (*noduli*, a lato) con molti batteri azotofissatori, donando loro nutrienti e ricevendo azoto sotto forma di sostanze utilizzabili.



In ogni organismo la crescita dipende dal bilancio tra i composti assunti e consumati, equilibrando reazioni *esoergoniche* (che producono energia) ed *endoergoniche* (che consumano energia); il loro accoppiamento è fondamentale in tutti i sistemi biologici, dato che l'energia prodotta dalle reazioni esoergoniche può essere utilizzata dalle reazioni endoergoniche; ad esempio nelle piante l'ossidazione di ATP e NADPH è l'unica ed indispensabile fonte energetica per altre reazioni accoppiate.

Le piante sono organismi che, come noi, respirano rilasciando anidride carbonica: nella prima parte della vita di una pianta la fotosintesi che avviene nelle foglie giovani non basta a soddisfare le necessità energetiche dell'individuo, e quindi la respirazione mitocondriale è indispensabile e costituisce la maggior fonte di energia; nella vita adulta la respirazione è attuata nelle parti non verdi (come le radici) della pianta, e di notte tutto l'organismo, in mancanza di luce necessaria per la fotosintesi, utilizza la respirazione mitocondriale.

Le piante quindi sono collettori solari che convertono l'energia solare in energia chimica (coenzimi ridotti e ATP) attraverso la fotosintesi, e sono impossibilitate a muoversi. La mancanza di movimento ha portato ad una diversità biologica del mondo vegetale basata soprattutto sulla competizione per la luce e per i nutrienti: abbiamo piante molto alte che necessitano di una grande quantità di luce, e piante che vivono alla loro ombra che in condizioni di luce eccessiva morirebbero a causa dell'ossidazione della clorofilla nelle loro foglie (che diventerebbero gialle) dettata dalla mancanza di schermatura solare attuata solitamente dai cloroplasti (fenomeno che avviene nelle piante abituate a vivere in condizioni di luce più intensa). L'adattamento a condizioni di luce diversa è attuata dal *fitocromo*, un recettore per la luce rossa presente negli organismi vegetali. Va aggiunto che le piante sono comunque in grado di piegarsi o crescere in direzione della luce (tropismo verso la luce). Oltre a tropismi verso la luce, abbiamo anche tropismi che riguardano la gravità.

Anche le radici sono a crescita continua, poiché c'è un continuo bisogno di nutrienti che inevitabilmente finiscono nella zona di terreno in cui le radici sono situate: la continua crescita permette di ricercare nuove zone ricche di nutrienti da inviare a tutto l'organismo.

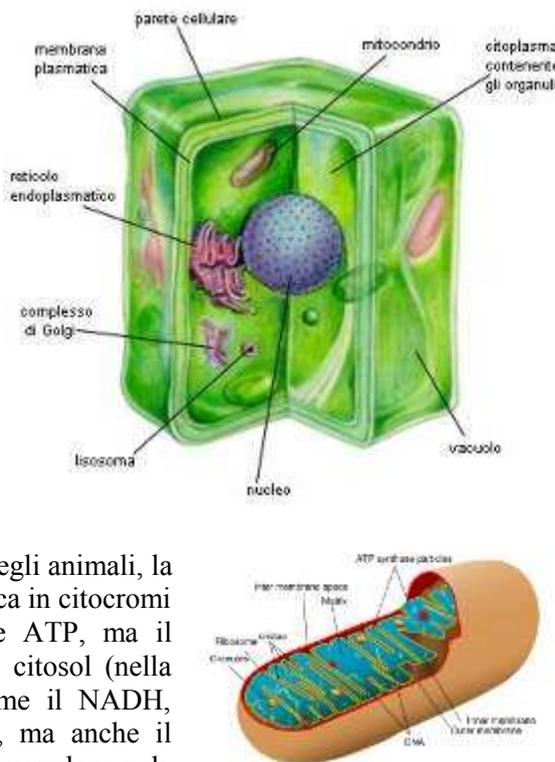
LA CELLULA VEGETALE

Nella cellula vegetale tipica abbiamo alcuni organelli unici, mentre alcuni organelli tipici della cellula animale risultano leggermente modificati.

MITOCONDRIO

Il mitocondrio è un organello circondato da una doppia membrana plasmatica che divide l'interno in due compartimenti: lo spazio intermembrana e la matrice. Numerosi ripiegamenti che si osservano sono necessari per aumentare la superficie della membrana interna, sede di importanti processi metabolici e quindi ricca in proteine uniche, codificate sia dai geni nucleari, sia dai geni presenti nel piccolo Dna mitocondriale (si pensa che il mitocondrio derivi da un processo di endosimbiosi). Come negli animali, la membrana interna (sede della fosforilazione ossidativa) è ricca in citocromi e ATP-sintasi, in grado di traslocare elettroni e formare ATP, ma il donatore di elettroni non è solo il NADH proveniente dal citosol (nella glicolisi il glucosio dona elettroni a coenzimi ridotti come il NADH, trasportati all'interno del mitocondrio da sistemi-navetta), ma anche il NADH mitocondriale può essere ossidato nello spazio intermembrana da enzimi presenti all'esterno della membrana interna. Il NADH mitocondriale è ossidato direttamente saltando la prima fase della fosforilazione ossidativa: ciò porta ad un accumulo di protoni nello spazio intermembrana che iperpolarizza la cellula (l'iperpolarizzazione necessita energia, la depolarizzazione ne fornisce). L'aumentata concentrazione di protoni H^+ è utilizzata dall'ATP-sintasi per formare ATP.

Il mitocondrio vegetale conferisce inoltre resistenza al cianuro, potente veleno delle cellule animali che inibisce la citocromo ossidasi. Questo enzima è deputato al trasferimento di elettroni dal citocromo all'ossigeno molecolare, con formazione di una molecola d'acqua (passaggio a valle della fosforilazione ossidativa). Le piante utilizzano una respirazione cianuro-resistente, in cui l'ubichinone cede elettroni alla



flavoproteina, la quale forma acqua a partire dall'ossigeno; il NADH non si accumula, poiché è riossidato, né si forma ATP. Nelle cellule animali il cianuro non permette la formazione dell'ATP.



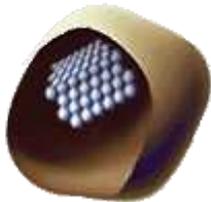
I mitocondri delle cellule vegetali che attuano la respirazione cianuro-resistente si scaldano, come avviene nelle *Aracee* (a lato). In questa famiglia la fioritura dura soltanto 24 ore, e quindi l'impollinazione entomofila deve avvenire molto rapidamente. Per attrarre gli insetti le *Aracee* liberano ammine volatili (che emanano un forte odore acre) riscaldando il fiore da 15°C a 25°C tramite la respirazione cianuro-resistente. Questa famiglia (ma anche altre piante in condizioni di stress) producono acido salicilico come molecola segnale: l'acido salicilico è in grado di bloccare la catalasi con conseguente aumento dell'acqua ossigenata (H₂O₂), innescando la trascrizione del gene della ossidasi alternativa

della respirazione cianuro-resistente.

Le piante a volte producono cianuro come meccanismo di difesa; tra le varie molecole difensive delle piante, ci sono alcuni metaboliti secondari (secondari non perché meno importanti, ma perché non indispensabili al metabolismo cellulare) come i *glucosidi cianogenici*, i quali sono segregati in compartimenti specializzati all'interno della cellula vegetale, mentre l'enzima *ossidasi* è situato in un compartimento diverso. Quando un predatore provoca un danno alla pianta, in quella zona l'ossidasi reagisce con il glucoside cianogenico liberando acido cianidrico, il quale provocherà seri danni al predatore, mentre la pianta sopravviverà in quanto attiverà la respirazione cianuro-resistente. Questo tipo di molecole difensive sono necessarie in un ambiente selvatico, ma sono dannose in agricoltura, quindi si sono selezionate le varietà di piante che non li producono, in modo da fornire un prodotto commestibile e commerciabile.

Il mitocondrio vegetale partecipa anche al processo definito *fotorespirazione*, che avviene in certe condizioni in certe piante, le quali invece di fissare l'anidride carbonica, utilizzano l'enzima Rubisco (un'ossigenasi) producendo fosfoglicolato (2 atomi di carbonio), il quale alla fine tornerà al cloroplasto sotto forma di 3-fosfoglicarato, che nel Ciclo di Calvin porterà alla formazione di uno zucchero a 6 atomi di carbonio.

PEROISSISOMI



I perossisomi sono organelli a membrana singola che contengono un o più enzimi che usano O₂ per rimuovere atomi di idrogeno da specifici substrati organici in una reazione ossidativa che produce H₂O₂; la catalasi (che rappresenta fino ad un quarto del contenuto dell'organello) scinde l'acqua ossigenata (tossica) in ossigeno molecolare e acqua; i perossisomi inoltre svolgono funzioni diverse secondo la loro localizzazione.

Le piante C₃ hanno perossisomi fogliari nelle cellule fotosintetiche, dove svolgono un ruolo importante nella fotospirazione; nei semi oleosi in germinazione prendono il nome di *gliossisomi* in quanto partecipano alla mobilitazione delle riserve lipidiche contenutevi, unica fonte energetica nei primi stadi di sviluppo della pianta. Nelle piante che formano simbiosi con i batteri azotofissatori i gliossisomi prendono il nome di *uricosomi* deputati al metabolismo delle sostanze azotate. Inoltre possono contenere glicolato ossidasi, urato ossidasi, ecc...

PLASTIDI

I *proplastidi* sono organelli indifferenziati, tipici delle cellule vegetali, a doppia membrana interna ed esterna, dotati di un genoma interno (come i mitocondri). I proplastidi possono differenziarsi in:

- **Amiloplasti**: organelli deputati all'accumulo di sostanze di riserva (a destra).



- **Cromoplasti**: non fotosintetici, aventi funzione vessillare, sono ricchi in pigmenti colorati (caroteni e xantofille) sotto forma di goccioline lipidiche o in corpi filamentosi o in cristalli. I carotenoidi conferiscono a determinate zone della pianta una particolare colorazione (a sinistra).



- **Cloroplasti**: si formano a partire dai proplastidi in condizioni di luce e sono deputati alla fotosintesi; la membrana interna si organizza in *tilacoidi* ("dischetti" ricchi in clorofilla), impilati in *grana*, nei quali si svolge la fotosintesi clorofilliana. Il genoma del cloroplasto produce subunità fondamentali per la funzione dell'organello: ad esempio il



genoma nucleare produce la subunità minore dell'enzima Rubisco (*Ribulosiodifosfato carbossilasi*, composto da 8 subunità minori e 8 maggiori), mentre il genoma cloroplasmatico produce la subunità maggiore; dopo la modificazione della subunità minore a seguito dell'entrata nel cloroplasto, le due subunità si uniscono formando l'enzima attivo. Gli enzimi di questo organello possono essere bloccati a livello della trascrizione e traduzione da numerosi inibitori.

VACUOLO

Una cellula vegetale può avere tanti piccoli vacuoli (cellula giovane) o un solo grande vacuolo derivato dalla fusione di questi ultimi (cellula adulta). Il vacuolo è un organello tipico delle cellule vegetali, delimitato da una membrana detta *tonoplasto* (caratterizzato da una bassa percentuale di fosfolipidi e predominanza di glicolipidi) che circonda il *succo vacuolare*, ed è deputato all'accumulo di acqua e soluti che altrimenti nel citosol causerebbero problemi a livello osmotico. Nelle cellule fotosintetiche essi costringono i cloroplasti a collocarsi verso la parete, in una posizione molto favorevole alla captazione della luce e della CO₂.

Grazie al vacuolo una cellula può aumentare notevolmente il suo volume assumendo acqua dall'ambiente extracellulare (un vacuolo può arrivare ad occupare il 95% del volume cellulare), richiamata dall'elevata concentrazione di soluti presente nel vacuolo, come ioni, nitrati, acidi organici, metaboliti secondari e sostanze di riserva. La crescita per distensione attuata dal vacuolo è vantaggiosa poiché riduce il costo dell'ampliamento della superficie plasmalemmatica (il succo vacuolare costa meno rispetto al citosol), ma è frenata dalla componente elastica della parete cellulare: la pressione osmotica (*pressione di turgore*) generata dal vacuolo permette alla pianta di mantenersi normalmente eretta. La pressione di turgore permette anche alle *cellule di guardia* degli stomi di aprirsi, e alle *cellule del turbino* di conferire limitata motilità ad alcune parti della pianta.

All'interno del vacuolo troviamo:

- **Alcaloidi**: sostanze organiche eterocicliche contenenti azoto. Alcuni funzionano da veleni ed inibitori della normale attività cellulare a dosi molto basse; ci sono alcaloidi che interferiscono con i microtubuli citoscheletrici (che fungono da ottimi antitumorali, come il taxolo), oppure la cumarina, che funge da disaccoppiante; il clamferolo è un inibitore della fosforilazione ossidativa, la diurrina (un glucoside cianogenico) produce acido cianidrico. Tra gli alcaloidi più comuni abbiamo la caffeina, la nicotina, la teobromina, la teofillina, la chinina, la morfina, la colchicina, tutti di importanza biotecnologica, dato che rende di più produrli direttamente nella pianta che tramite sintesi chimica.
- **Tannini**: composti organici derivanti dal fenolo, presenti in grandi quantità nei frutti acerbi, sono formati da unità fenoliche e flavonoidi, oppure da glucosio e acido gallico. I tannini si legano in modo più o meno stabile ai gruppi amminici delle proteine grazie ai legami a idrogeni dei loro gruppi fenolici, oppure grazie a legami covalenti formati da enzimi ossidanti come la polifenolo ossidasi; sono quindi composti poco digeribili e considerati antinutrizionali.
- **Cristalli di ossalato di calcio**: l'eccesso di acido glicolico è trasformato nel perossisoma in acido ossalico, potenzialmente dannoso, e quindi sequestrato all'interno del vacuolo nel quale precipita in seguito all'interazione con il calcio, divenendo inattivo e poco pericoloso. L'ossalato di calcio si accumula sotto forma di druse, sabbia cristallina, cristalli prismatici o rafidi. L'accumulo di ossalato di calcio in determinate piante che vivono in terreni particolarmente ricchi di calcio è svolto dalle *cellule ossalifere* delle parti aeree delle piante, deputate appunto all'accumulo di ossalato di calcio e alla sua inattivazione. Un modo per ridurre la quantità di ossalato di calcio consiste nel diminuire la quantità di acido ossalico prodotto, o vivere in ambienti poveri di calcio.
- **Flavonoidi**: sono composti polifenolici idrosolubili che fungono da pigmenti colorati e forniscono protezione dagli UV che potrebbero alterare l'attività biologica della clorofilla; particolare rilevanza hanno le *antocianine*, che donano un colore rosso se metilate, blu se idrossilate, e questa colorazione dipende anche dal pH, poiché un pH acido conferisce un colore rosso, un pH basico dona colore blu. Altre classi di flavonoidi sono i *flavonoli* e *flavoni*, che impartiscono una colorazione dal giallo al bianco avorio.
- **Sostanze di riserva**: soprattutto glucidi presenti sotto forma di monosaccaridi e, più raramente, di disaccaridi o di polisaccaridi idrosolubili.



- Enzimi digestivi: nelle cellule animali sono accumulati in lisosomi, ma nella cellula vegetale il vacuolo assume la funzione di digerire biomolecole utili alla cellula o le sostanze dannose da eliminare.

CORPI PROTEICI

Sono organelli a membrana singola, contenenti materiale proteico di riserva, ma anche potassio, magnesio, zolfo, oligoelementi; si originano dall'Apparato del Golgi o dal Reticolo Endoplasmatico ed occupano un volume anche considerevole. Sono localizzati principalmente nei semi.

Un'altra molecola contenuta al loro interno è l'acido fitico, derivante dal glucosio 6-fosfato, il quale è trasformato prima in mioinositolo fosfato e dopo in una molecola completamente fosforilata, l'acido fitico appunto. L'acido fitico è un antinutrizionale in quanto, come l'ossalato ed il glucosinolato, sequestra ioni importanti dal punto di vista alimentare; altri antinutrizionali sono i tannini, gli inibitori delle proteasi (che interferiscono con gli enzimi digestivi), gli alcaloidi, i glucosidi cianogenici, gli antivitaminici, le micotossine (prodotte da agenti patogeni delle piante e conservate nell'alimento), le mimosine, i fitoestrogeni, le saponine, gli agenti fotosensibilizzanti.

LA PARETE CELLULARE

La parete cellulare è una struttura che racchiude la cellula vegetale e svolge varie ed importanti funzioni:

- Mantenimento della forma cellulare: la forma della cellula (determinante per la funzione della stessa) dipende dall'orientamento delle microfibrille di cellulosa (componenti della parete primaria), sebbene una cellula possa modificare il loro orientamento nel corso della propria vita. Senza la parete cellulare una cellula vegetale sarebbe costretta ad assumere la classica forma sferica. Alcune forme riscontrate sono: *stella* (parenchima, per ottimizzare lo scambio di gas), *conica* (epidermide, permette il massimo assorbimento della luce e salva la clorofilla contenuta nei cloroplasti dall'eccessiva esposizione ai raggi solari, tramite la riflessione degli stessi), *tubulare* (tracheide), *filiforme* (tricoma).
- 
- Cellule epidermiche
- Sostegno meccanico: la parete cellulare è composta da strati; i nuovi si aggiungono progressivamente a livello plasmalemmatico (*parete secondaria*) spostando i più vecchi all'esterno (*parete primaria*), ma la parete si modifica nel tempo specializzandosi in determinate funzioni tramite l'aggiunta di particolari composti, come la cera e le cutine che vengono aggiunte sulle foglie per evitare l'eccessiva traspirazione, o la lignina, che consente di aumentare la rigidità e durezza della cellula e, quindi, la protezione dell'individuo.
 - Comunicazione: è possibile che in casi particolari (come l'attacco da parte di un patogeno) la parete cellulare perda alcuni frammenti che vadano ad attivare, tramite la trasduzione del segnale, la cascata di eventi in una cellula vicina, in modo che quest'ultima possa prontamente reagire e sia preparata alla successiva infezione tramite la sintesi di opportune proteine.
 - Protezione dagli agenti patogeni.
 - Stabilità osmotica: la parete cellulare mantiene una cellula vegetale stabile anche in un ambiente osmoticamente non compatibile. Una cellula animale (priva di parete) scoppierebbe in un ambiente ipotonico, ma la presenza della parete cellulare in una cellula vegetale contrasta il gradiente osmotico che altrimenti porterebbe alla lisi cellulare. Sperimentalmente è possibile rimuovere la parete cellulare tramite enzimi litici come pectinasi ed emicellulasi, ottenendo un *protoplasto* enorme, che per rimanere integro va tenuto in una soluzione contenente mannitolo o saccarina 0.4-0.5M.

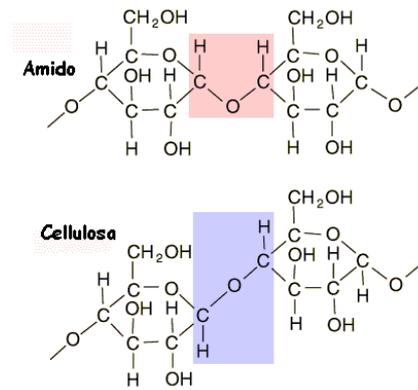
Nella mitosi di una cellula vegetale la prima parete cellulare che si forma è la *lamella mediana*, composta solamente da pectine, e solo in seguito verranno aggiunte la cellulosa e le altre componenti.

La parete cellulare è composta :

- Parte microfibrillare: è la *cellulosa*, omopolimero del glucosio, la cui unità fondamentale è un omodimero di glucosio chiamato *cellobiosio*. Anche l'amido è un omopolimero del glucosio, ma la differenza fondamentale consiste nella configurazione anomica del legame

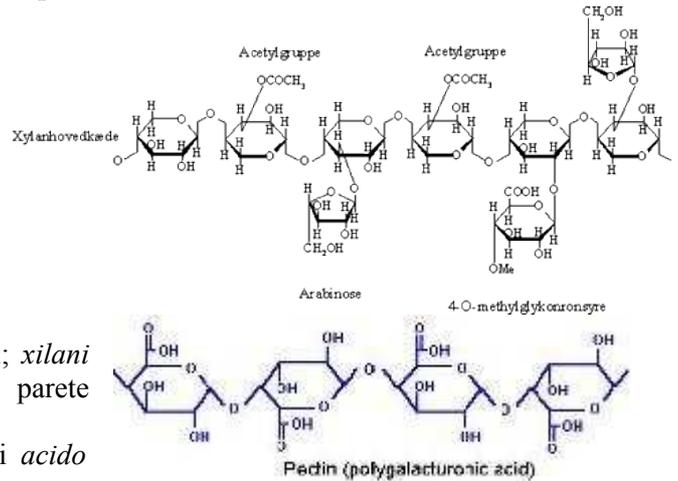


glucosidico. L'amido è formato da glucosio collegato da legami α 1-4, il che conferisce una struttura ad α -elica elicoidale. Il legame presente nella cellulosa invece è di tipo β 1-4, che consente a due unità adiacenti di glucosio di invertirsi di 180° l'uno rispetto all'altro, e alla molecola di cellulosa di avere una struttura planare compatta, che forma legami ad idrogeno (deboli singolarmente, ma forti se in grande quantità) sia intracatena sia intercatena grazie agli ossidrili liberi che sporgono lateralmente. Questa struttura conferisce alla parete cellulare grande stabilità e rigidità, necessarie per espletare le funzioni suddette.



- **Matrice:** formata da componenti fenoliche (nella parete secondaria), proteine, polisaccaridi come pectine ed emicellulose, aventi queste ultime un'importante funzione nella classificazione.

Le *emicellulose* sono formate da glucosio legato da legami β 1-4, e presentano ramificazioni che creano una struttura non fibrillare, ma un "graticcio" molecolare contenente anche proteine ed altre componenti. Al glucosio si collegano altri zuccheri caratteristici per ogni emicellulosa. Le emicellulose hanno il compito di unire le microfibrille di cellulosa. Esempi di emicellulose sono: gli *xiloglucani* (contenenti xilano collegato al glucosio) nelle dicotiledoni; *xilani* nelle monocotiledoni, *glucomannani* nella parete secondaria delle gimnosperme



Le *pectine* sono composte da unità ripetute di *acido galatturonico* (un glucosio modificato con un gruppo

carbossile al posto del CH_2OH in posizione 6) collegati da legami α 1-4; la differenza con l'amido è data dalla presenza di gruppi acidi esposti su ogni residuo di acido galatturonico, sebbene entrambe le biomolecole assumano la stessa conformazione elicoidale. Al carbonio 2 dell'acido galatturonico possono legarsi altri zuccheri, come ad esempio il ramnosio. Il gruppo carbossile dell'acido galatturonico forma legami ionici con cationi come il Magnesio e Calcio: un singolo ione può legare "a ponte" due catene di pectine, creando una struttura altamente collegata, intrecciata ed insolubile (dato che essendo altamente intricata ha meno punti di contatto con il solvente), donando consistenza gelatinosa alla massa di pectine collegate ionicamente. Questa situazione è comunemente presente nella parete cellulare, in cui la concentrazione di ioni calcio è molto elevata (10^{-3}). Se i gruppi carbossilici sono esterificati (metilati o acetilati) la struttura scompare (non possono formarsi i ponti ionici) e le pectine diventano solubili. L'esterificazione è essenziale quando la cellula attua la crescita per distensione: in presenza di una forte rete pectinica la crescita sarebbe bloccata, ma l'esterificazione dei gruppi carbossilici dell'acido galatturonico consente di diminuire la rigidità ed aumentare la plasticità della parete cellulare, ed opporre quindi meno resistenza alla crescita volumica; normalmente il processo viene attuato abbassando il calcio apoplastico o esterificando il gruppo carbossile dell'acido galatturonico. Anche il boro è molto importante nella vita di una cellula vegetale, poiché interagisce con alcuni enzimi, è necessario alle funzioni del cloroplasto e forma ponti molecolari tra le emicellulose, proprio come il calcio. Alcune pectine sono: *omogalatturani* (omopolimeri dell'acido galatturonico); *xilogalatturani* (lo xilosio forma catene laterali); *ramnogalatturani* (il ramnosio forma catene laterali). Grazie all'abilità delle pectine di creare il reticolo che sostiene le altre componenti, esse sono deputate anche al passaggio di sostanze attraverso la parete cellulare, sono infatti in grado di creare pori che permettono a molecole non più grandi di 10000 Da di giungere al plasmalemma o fuoriuscire nell'ambiente extracellulare.

Le *estensine* sono componenti proteiche della matrice che possono essere o meno glicosilate, e sono strettamente legate alle microfibrille di cellulosa e alle emicellulose. La glicosilazione è necessaria per mantenere la struttura bastoncennale tipica delle estensine. Le rappresentanti sono: *HGRP*, glicoproteina ricca in idrossiprolina (abbastanza glicosilata); *PRP*, glicoproteina ricca in prolina (poco glicosilata); *GRP*, glicoproteina ricca in glicina (praticamente quasi non ha glicosilazione); *AGP*, o arabinogalattano, ricca in idrossiprolina (95% glicosilata). Il tipo di estensina prodotta dalla

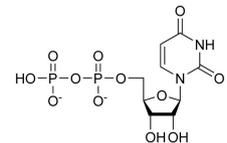
cellula dipende dalla funzione svolta e può variare nel tempo. Le AGP sono prodotte in unione a glicosilfosfatidilinositidi (GPI) e conservate in vescicole citoplasmatiche, che si fondono con il plasmalemma riversando all'esterno il proprio contenuto, compreso l'arabinogalattano, che si stacca dalla componente lipidica (la quale rimane nel plasmalemma) riversandosi nell'ambiente extracellulare. Le AGP fungono da segnali in processi di differenziamento ed embriogenesi vegetale; le piante hanno una grande capacità rigenerativa, poiché le cellule presenti nei *meristemi* (a lato) sono staminali embrionali totipotenti, ossia in grado di dare origine a qualsiasi tipo cellulare, e quindi anche ad un intero organismo. Proprio perché così importanti, le AGP sono strettamente controllate ed attive a basse quantità, ma possono fungere anche da chaperonine per polisaccaridi all'interno delle vescicole secretorie (conferendo al polisaccaride secreto un particolare ripiegamento che altrimenti non potrebbe avere), nonché hanno un ruolo importante nella crescita, nella nutrizione e nello sviluppo del tubo pollinico.



Le componenti della parete cellulare hanno origine diversa: la cellulosa-sintasi è inserita nel plasmalemma, così come la proteina che produce *callosio*, una gomma sintetizzata in seguito ad un danno meccanico che la pianta subisce. Il callosio si forma quando la pianta è oggetto di attacco da parte di un patogeno come ad esempio un fungo; se il floema, indispensabile sistema di trasporto dei nutrienti, subisce un danno, il callosio crea un "tappo" che non permette la fuoriuscita di sostanze nutritive.

Le pectine e le emicellulose sono prodotte nell'Apparato del Golgi; infine la componente proteica è prodotta nel Reticolo Endoplasmatico. Oltre alle proteine strutturali sono presenti anche enzimi che rafforzano o distruggono i legami tra le componenti della parete: pectinasi, esterasi, polisaccaridesintetasi, ecc...

L'orientamento delle microfibrille di cellulosa, che conferisce la forma particolare da un dato tipo di cellula per svolgere la propria funzione, può modificarsi nel corso del tempo, per esempio in base ad un processo di differenziamento. Questa particolare caratteristica dipende dall'enzima che produce la cellulosa, la *cellulosa-sintasi*, una proteina transmembrana, avente una struttura quaternaria (composta quindi da più subunità) a rosetta, collegata perpendicolarmente ai microtubuli citoscheletrici nel versante citoplasmatico. I microtubuli permettono il movimento dell'enzima attraverso il plasmalemma, modificando quindi anche l'orientamento delle microfibrille di cellulosa in crescita, che nella parte terminale sono collegate alla cellulosa-sintasi che si sposta, permettendo la formazione di un'architettura ben definita ed ordinata che segue la direzione del movimento stesso dell'enzima. Il glucosio da aggiungere alla microfibrilla di cellulosa in crescita è inizialmente legato covalentemente ad un nucleotide chiamato *uridindifosfato* o UDP (estere dell'acido pirofosforico con il nucleoside uridina, a lato) sul carbonio 1; l'UDP-glicoside è quindi unito alla catena di microfibrilla di cellulosa in crescita tramite la rimozione dell'UDP e la formazione del legame β 1-4 tra l'ultimo glucosio della microfibrilla di cellulosa e il glucosio che deve essere aggiunto per allungarla. La scissione del legame formato dall'UDP fornisce l'energia per la formazione del nuovo legame glicosidico.



Le pectine ed emicellulose prodotte nel Golgi sono secrete nella parete cellulare e possono in parte autoassemblarsi (spontaneamente) in strutture organizzate, ma richiedono anche l'aiuto di enzimi particolari che ottimizzano le interazioni tra le componenti della parete.

Il ruolo delle *espansine* nella crescita per distensione è dimostrato da evidenze sperimentali. Quando un seme inizia a germogliare, le risorse nutrizionali dell'endosperma permettono la formazione di una prima radichetta che inizia ad assorbire acqua e sali minerali, e di una parte chiamata *mesocotile* che si accresce verso l'alto fino a emergere dal terreno, così facendo l'organismo potrà compiere la fotosintesi e non dipendere più dall'endosperma. Questo allungamento del mesocotile dipende dalla crescita per distensione (aumento del volume cellulare grazie al vacuolo) e non dalla mitosi, ed è stato osservato sperimentalmente che acidificando il terreno si induce questo tipo di crescita (chiamata appunto *crescita acida*). In un altro esperimento il tessuto del mesocotile, dopo essere stato congelato, era inattivato tramite il calore che denaturava le proteine della parete vegetale, inibendo la crescita acida, ma, aggiungendo in seguito delle *espansine* nuove, la crescita acida era ristabilita e iniziava la crescita per distensione. Questo esperimento dimostra il ruolo delle *espansine* nella crescita per distensione.

Le *espansine* sono posizionate in posti chiave per permettere alla parete di espandersi, tra le microfibrille di cellulosa e gli xiloglucani (leganti due microfibrille tra loro), rompendo le interazioni steriche tra cellulosa e cross-linking dei glucani (anche il loro allentamento permette l'espansione della parete). Il ruolo

fondamentale è comunque svolto dalle *xiloglucantransglicolasi* (XET), enzimi che idrolizzano un glicano sul carbonio anomero (C1) e lo “riattaccano” su un’estremità non riducente di un altro glicano, generando una molecola più lunga che permette l’allontanamento di due microfibrille di cellulosa, ampliando il “graticcio” molecolare. I complessi meccanismi alla base di questi fenomeni sono controllati ormonalmente.

La parete secondaria è la zona più interna della parete cellulare delle cellule vegetali più mature, e si differenzia dalla parete primaria (esterna) per la natura dei componenti, le caratteristiche chimico-fisiche e la composizione quali-quantitativa: la quantità di pectine ed acqua diminuiscono, mentre aumenta sia la percentuale della cellulosa, sia il suo grado di polimerizzazione (microfibrille più grandi); anche le emicellulose aumentano in percentuale. La parete secondaria affianca queste caratteristiche con l’aggiunta di componenti peculiari che variano da cellula a cellula, in base alla funzione svolta:

- Lignina: tipica della parete secondaria delle cellule xilematiche (nelle quali formano strutture variabili ad anelli, reticoli, spirali, ecc...), le quali nel corso del processo di differenziamento muoiono sostituendo la parte cellulare con parete secondaria; questo processo conferisce rigidità e sostegno al tessuto xilematico. La lignina è formata dalla polimerizzazione di tre componenti diverse derivate dal fenilpropano: *alcol cumarilico*, *alcol coniferilico*, *alcol sinapilico*, differenti per il numero di gruppi metossidi legati all’anello aromatico (rispettivamente: 0, 1, 2). Questi tre alcoli sono polimerizzati in strutture complicate che creano la lignina, che non forma un reticolo a parte nella parete cellulare, ma anzi si insinua nel “graticcio” già esistente e crea una complicata struttura, impermeabile all’acqua, che si potrebbe quasi definire unica.

I fenoli vegetali sono biosintetizzati in svariati modi. Nelle piante superiori la maggior parte dei fenoli deriva almeno in parte dalla fenilalanina, un prodotto della *via dell’acido scichimico*; da questa via deriva anche la lignina, ma anche tannini idrolizzabili, tannini condensati e flavonoidi (queste ultime due classi possono essere sintetizzati anche nella *via dell’acido malonico*).

- Cere e Cutine: difendono dall’evaporazione soprattutto le cellule delle foglie, ma non conferiscono rigidità alla parete secondaria. Le *cere* sono composte da acidi grassi e alcoli alifatici uniti da legami esteri ripetuti, mentre i legami esteri delle *cutine* (a lato) interessano acidi grassi ed idrossiacidi, in entrambi i casi la struttura risultante è un reticolo tridimensionale impermeabile all’acqua poiché i gruppi polari sono impiegati nei legami esteri, e la parte idrofobica apolare rimane libera di impedire il passaggio dell’acqua.
- Suberina: svolge nel tronco la stessa funzione delle cere e delle cutine.



LA TERMODINAMICA

- Prima legge della termodinamica: la conservazione dell'energia. L'energia non si crea né si distrugge, ma si trasforma da una forma in un'altra. La foglia attua la fotosintesi per catturare l'energia solare e trasformarla in energia chimica, ma è un processo altamente inefficiente che consente di utilizzare solo il 3% dell'energia catturata, mentre il resto è dissipato nell'ambiente sotto forma di calore. Questa legge non ci dice la direzione in cui l'energia si sposta, ma riguarda solo la conservazione dell'energia, non ci spiega perché le specie chimiche reagiscono tra loro.
 ΔU (energia immessa nel sistema) = ΔQ (calore assorbito) + ΔW (lavoro fatto dal sistema)
- Seconda legge della termodinamica: l'entropia di un sistema aumenta sempre. L'entropia misura la probabilità che un dato evento possa accadere, quindi indica la direzione di un evento; per definizione un sistema ordinato ha entropia bassa, un sistema caotico ha un'alta entropia. Mantenere uno stato ordinato richiede energia, perché normalmente un sistema tende ad aumentare la sua quantità di entropia, quindi a divenire disordinato. Un sistema privo di energia non ha più ordine.
 ΔS (energia non disponibile isotericamente) = Q/T . Se il sistema cede energia abbassa la sua temperatura, se aumenta la temperatura aumenta anche l'energia.

In un processo spontaneo la probabilità termodinamica si esaurisce andando verso l'equilibrio; quando un sistema è lontano dall'equilibrio la sua capacità a cambiare è grande, e quindi devo fornire energia per mantenere il sistema in questo stato. Una proteina ripiegata nella sua conformazione nativa è una molecola altamente ordinata (bassa entropia), ma la proteina tende sempre verso uno stato ad alta entropia. L'entropia quindi aumenta se la proteina è degradata in amminoacidi.

In chimica le trasformazioni avvengono attraverso cambiamenti sia di ΔS che dell'energia interna ΔU . Per esprimere quantitativamente il lavoro che una reazione chimica può fare si usa l'energia libera ΔG .

$\Delta G = \Delta U - T\Delta S$. In tutti i processi spontanei ΔG è negativo.

In una reazione chimica $A \leftrightarrow B$, $\Delta G = \Delta G_0 + 2,3RT \lg([B]/[A])$. All'equilibrio $\Delta G = 0$, e $\Delta G_0 = -2,3RT \lg[B]/[A]$. Se la reazione è spostata a destra il $\Delta G < 0$, e quindi il rapporto $[B]/[A] > 1$: la reazione è spontanea. Se invece $\Delta G > 0$, il rapporto $[B]/[A] < 1$, e la reazione non avverrà a meno che non fornisca energia o un catalizzatore che mi abbassi l'energia di attivazione.

In una membrana il lavoro dello spostamento di un soluto da un compartimento C_1 a un compartimento C_2 è $\Delta G = 2,3RT \lg([C_1]/[C_2])$. $\Delta G < 0$ se la concentrazione di C_1 è minore della concentrazione di C_2 , mentre invece occorre lavoro per spostarlo nella direzione inversa, poiché $\Delta G > 0$.

Il soluto tende quindi a spostarsi dal compartimento a concentrazione maggiore verso il compartimento a concentrazione minore (secondo gradiente di concentrazione) fino al raggiungimento dell'equilibrio chimico, ma se il soluto è carico, va considerato il potenziale elettrico di membrana ΔE (o V), che corrisponde al lavoro necessario per muovere una carica da un lato all'altro della membrana. Il lavoro per muovere uno ione carico contro un potenziale ΔE diventa: $\Delta G = z$ (carica dello ione) F (costante di Faraday) ΔE . All'equilibrio entrambi i ΔG (dell'entrata e uscita dello ione) sono uguali a 0, ma ciò non significa che il passaggio dello ione si sia fermato, ma semplicemente che la quantità di ione proveniente dal primo compartimento è pari alla quantità di ione proveniente dal secondo compartimento.

Da questi concetti espressi precedentemente si deduce l'equazione di Nernst:

- se uno ione passa una membrana la variazione di energia libera è: $\Delta G = -RT \lg[C_o]/[C_i]$.
- per il suo carattere ionico la variazione di energia libera è: $\Delta G = zF\Delta E$

All'equilibrio $\Delta G_{conc} + \Delta G_{volt} = 0$, da cui $zFV - RT \lg([C_o]/[C_i]) = 0$

V (o ΔE) = $2,3(RT/zF) \lg_{10}([C_o]/[C_i])$. Questa equazione mette in relazione lo spostamento di un soluto carico attraverso una membrana sia a causa del suo carattere ionico, sia a causa della sua concentrazione. Il potenziale di membrana funge anche da segnale per la crescita per distensione nelle piante.

Il lavoro di uno ione attraverso la membrana è conosciuto come potenziale elettrochimico (natura sia chimica che elettrica) sia per la sua concentrazione e sia per la sua carica. La distribuzione dello ione (carico) all'equilibrio è determinata dall'equazione di Nernst precedente.

Il concetto di potenziale di membrana può essere spiegato con due esempi, in entrambi i quali sono presenti due compartimenti A e B separati da una membrana. Nel primo esempio la membrana è permeabile al cloruro di potassio (KCl), ma lascia passare più facilmente il potassio rispetto al cloro; il potassio quindi raggiungerà l'equilibrio prima del cloro, generando una differenza di carica a livello della membrana (detta *potenziale di membrana*) in quanto il compartimento di partenza è più negativo rispetto al compartimento di arrivo. Il potenziale comunque si annullerà quando entrambe le specie ioniche raggiungeranno l'equilibrio.

Nel secondo esempio nel compartimento A di partenza è presente solfato di potassio (il compartimento di partenza è quindi privo di carica in quanto cariche positive e negative si bilanciano), ma la membrana è permeabile solo al potassio, che quindi inizierà a migrare nel compartimento B per raggiungere l'equilibrio, guidato dalla forza del gradiente di concentrazione. Il potassio sarà comunque impossibilitato a raggiungere una eguale distribuzione in ambo i compartimenti, in quanto il compartimento A si caricherà negativamente mano a mano che le cariche positive del potassio lasceranno il compartimento stesso: il risultato è la formazione di una carica negativa a cavallo della membrana rivolta verso il compartimento A, la quale richiamerà gli ioni potassio (positivi) dal compartimento B. L'equilibrio che il potassio raggiungerà sarà quindi un "compromesso" tra la forza del gradiente di concentrazione (che lo spinge verso il compartimento B) e la forza del gradiente elettrico (che lo spinge a tornare nel compartimento A). L'equilibrio che verrà raggiunto si definisce *equilibrio elettrochimico*, e genera un potenziale di diffusione detto *potenziale Donnan*. Nei sistemi biologici questa situazione è comune, in quanto molti ioni non passano attraverso il plasmalemma, e gli altri che permeano determinano invece il potenziale elettrico in base alla loro distribuzione.

Per spostare uno ione contro il suo gradiente elettrochimico è necessario fornire l'energia ΔG equivalente alla differenza di potenziale elettrochimico corrispondente; viceversa, uno ione che si sposta secondo il proprio potenziale elettrochimico fornirà energia corrispondente alla differenza di potenziale elettrochimico necessario per raggiungere il proprio equilibrio. Il movimento di uno ione secondo il proprio gradiente elettrochimico è alla base del *trasporto passivo*.

Il potenziale di membrana può essere misurato tramite due metodi, il primo dei quali (il più obsoleto) utilizzava una coppia di elettrodi (micropipette) inserito l'uno nella soluzione di riferimento e l'altra nella cellula, entrambe le quali collegate al voltmetro. Il problema di questo metodo consiste nella grande percentuale di volume (90%) occupata dal vacuolo, che inevitabilmente impedisce la misura dei potenziali dei compartimenti degli organelli membranosi. Attualmente è utilizzata la tecnica del *patch clamp*.

La membrana plasmatica delle cellule è permeabile a pochi ioni, come cloro, sodio e potassio, e ogni ione ha un fattore di permeabilità diverso, che determina la velocità con cui lo ione tende a raggiungere il proprio equilibrio elettrochimico. L'equazione di Nernst tiene conto solo di uno ione, ma non può essere applicata contemporaneamente a tutti gli ioni che sono in grado di attraversare la membrana e, quindi, a determinare il potenziale della cellula stessa; si ricorre perciò all'equazione di Goldman:

$$V_m = 61 \log \left(\frac{P_K[K^+]_{fuori} + P_{Na}[Na^+]_{fuori} + P_{Cl}[Cl^-]_{dentro}}{P_K[K^+]_{dentro} + P_{Na}[Na^+]_{dentro} + P_{Cl}[Cl^-]_{fuori}} \right)$$

Questa equazione permette di calcolare la concentrazione degli ioni all'equilibrio conoscendo il potenziale di membrana e la permeabilità di ciascun ione, ma nei sistemi biologici i risultati sono molto distanti da quelli previsti: il motivo risiede nei trasporti attivi della membrana. L'equazione di Goldman quindi non tiene conto del trasporto attivo attraverso il plasmalemma.

Il calcio, ad esempio, è uno degli ioni più lontani dal proprio equilibrio elettrochimico, in quanto la sua concentrazione intracellulare è nell'ordine di 10^{-7} : questo poichè il calcio funge da segnale intracellulare, e quindi necessita di una bassa concentrazione per innescare il segnale opportuno anche con un piccolo aumento; per questo motivo il calcio, dopo aver innescato il segnale, è velocemente rimosso, ma anche perchè causa la precipitazione del fosfato inorganico, essenziale al metabolismo cellulare. Il calcio può essere rimosso o attraverso l'espulsione nel mezzo extracellulare, o attraverso il suo sequestro nel vacuolo dove forma un complesso con l'ossalato di calcio (la concentrazione di calcio nel vacuolo è quindi alta).

Un metodo per dimostrare l'essenzialità del trasporto attivo nella determinazione del potenziale consiste nell'aggiungere cianuro nel mezzo in cui è presente la cellula: il cianuro impedisce la formazione dell'ATP, energia indispensabile per i trasportatori attivi che mantengono costante la differenza di potenziale di membrana a riposo; il cianuro causa quindi depolarizzazione cellulare (la differenza di potenziale di membrana diminuisce, avvicinandosi a valori positivi), mentre la sua rimozione ristabilisce il potenziale di membrana, portando ad una ripolarizzazione cellulare (la differenza di potenziale cresce).

Non è comunque detto che i trasportatori attivi producano una differenza di carica a cavallo del plasmalemma, in quanto, ad esempio, la pompa sodio-potassio non crea un grande squilibrio di carica (3 ioni sodio espulsi per 2 ioni potassio internati).

TRASPORTATORI

I trasportatori sono proteine transmembrana (che attraversano completamente il doppio strato fosfolipidico).

TRASPORTO PASSIVO

Il trasporto passivo sposta le molecole secondo il loro gradiente di concentrazione senza utilizzo di ATP, si basa sul principio della *diffusione semplice* (canali) o *diffusione facilitata* (carrier). Le principali categorie di proteine sono:

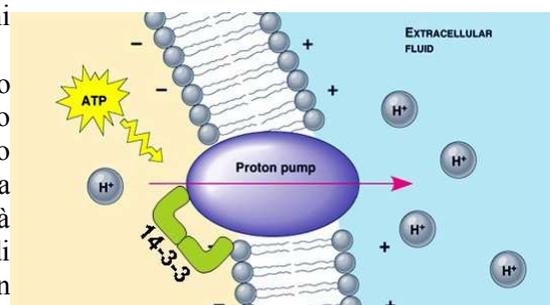
- **Canale:** la proteina transmembrana forma un canale aperto che mette in comunicazione due compartimenti e permette il transito di molecole ad elevata velocità senza interagire direttamente con loro. Non è presente il fenomeno della saturabilità, quindi il passaggio di molecole è direttamente proporzionale al numero di molecole presenti nei due compartimenti, e naturalmente al numero dei canali inseriti nella membrana; il canale è comunque una proteina specifica per un ligando o una famiglia di ligandi. Un esempio di canale è il canale per il potassio voltaggio-dipendente: è formato da 4 subunità transmembrana che hanno le estremità amminoterminale e carbossiterminale libere nel citoplasma, portando alla formazione di un canale che cambia lo stato di apertura in base al voltaggio del plasmalemma.
In base al comportamento si distinguono canali *inward rectifying* (si aprono all'interno a potenziali più negativi) e *outward rectifying* (si aprono verso l'esterno a potenziali più positivi). Alcuni domini sono coinvolti nell'apertura del canale, mentre altri domini hanno la funzione di percepire il voltaggio della cellula. Le *acquaporine* sono canali per l'acqua che aumentano il flusso idrico attraverso il plasmalemma, il quale normalmente avviene per diffusione.
- **Carrier:** è una proteina che non mette mai in comunicazione i due compartimenti, ma presenta due cancelli che non sono mai aperti contemporaneamente: la traslocazione prevede l'interazione del carrier con il ligando ed il suo rilascio nell'altro compartimento in seguito ad un cambiamento conformazionale del carrier stesso; il ligando immobilizzato ha un'energia libera nettamente inferiore, consentendo il passaggio attraverso la membrana. Il trasporto mediato da carrier è molto più lento di quello mediato da canali, e presenta specificità, saturabilità (il numero di molecole trasportate dipende dal numero dei carrier) e competizione.

Un sistema per distinguere un canale da un carrier consiste nel disegnare un grafico che metta in relazione la quantità di molecola presente nel mezzo con la quantità di molecola trasportata (velocità o cinetica di trasporto): in un canale il grafico risultante è una linea retta, mentre in un carrier il grafico raggiunge un plateau, determinato a sua volta dalla quantità di carrier inseriti nel plasmalemma. A volte nei carrier è possibile ottenere un grafico che sia la somma di due curve attaccate: in questo caso è evidente la presenza di un cambiamento di affinità (da alta a bassa) determinato da un cambiamento di concentrazione del ligando (da bassa ad alta).

TRASPORTO ATTIVO PRIMARIO

I trasportatori attivi sono proteine transmembrana in grado di trasportare le molecole contro il proprio gradiente di concentrazione sfruttando l'energia chimica immagazzinata nell'ATP, idrolizzandolo: sono quindi dette ATPasi. Una classe di trasportatori primari ATPasi sono le H^+ -ATPasi, estremamente importanti in vari processi fisiologici come la crescita ed il differenziamento della cellula vegetale; nei mitocondri e nei cloroplasti questa pompa sfrutta il movimento secondo gradiente di concentrazione dello ione H^+ (ΔG negativo) per sintetizzare ATP: sono quindi dette ATP-sintasi. L'energia per sintetizzare l'ATP deriva dalla depolarizzazione della membrana interna causata dal passaggio degli ioni da una zona a concentrazione maggiore verso una zona a concentrazione minore; la differenza di gradiente a sua volta è mantenuta dal flusso di elettroni che fornisce l'energia per traslocare gli ioni H^+ contro gradiente di concentrazione.

Con il termine *chemiosmosi* si definisce questo accoppiamento tra gradienti elettrochimici di protoni e lavoro cellulare. Viene quindi sfruttata la forza elettromotrice dello ione, ossia la differenza di potenziale elettrochimico tra l'interno e l'esterno della cellula, che genera una certa quantità di lavoro e che non coincide con la differenza di concentrazione. Grazie alla chemiosmosi tramite un



potenziale di -120mV è generato quasi il doppio di energia ($\Delta p = -238\text{mV}$) poiché è utilizzata anche la differenza di pH tra i due compartimenti, molto incisiva. Respirazione e fotosintesi si basano su questo principio: gli operatori di queste trasformazioni (depolarizzazione e abbassamento di pH) sono proprio le ATPasi.

TRASPORTO ATTIVO SECONDARIO

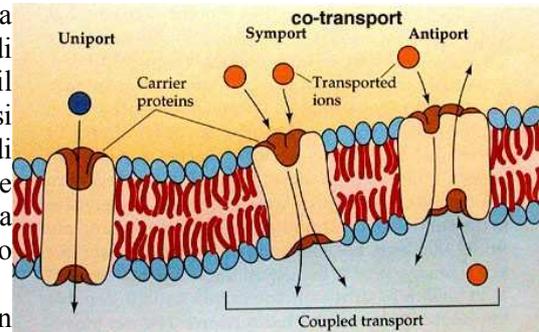
Il trasporto attivo secondario associa il trasporto di una molecola (quasi sempre H^+) secondo gradiente di concentrazione, con il trasporto di un'altra molecola contro il proprio gradiente; al posto dell'energia liberata dall'idrolisi dell'ATP è quindi utilizzata la differenza di gradiente di concentrazione di una molecola, mantenuta a sua volta costante dai trasportatori attivi primari. Se i trasporti avvengono nella stessa direzione si parla di *simporto*, se le molecole sono trasportate in direzioni opposte si parla di *antiporto*.

E' possibile dimostrare sperimentalmente la presenza di un simporto in un cellula con un semplice esperimento.

Con il trasporto attivo secondario il saccarosio è introdotto nelle cellule floematiche tramite un simporto con i protoni H^+ ; in un ambiente monitorato, l'assunzione di saccarosio da parte della cellula (ad esempio da parte dell'alga *Lemna*) utilizzando questo simporto provoca un innalzamento del pH esterno da 5.7 a 6.3, e la depolarizzazione della membrana da -250mV a -150mV , causata dall'entrata di ioni idrogeno positivi nel citoplasma, che hanno parzialmente annullato la carica negativa interna. Il gradiente di H^+ è a sua volta generato da un trasporto attivo primario. Successivamente pH e potenziale verranno ristabiliti da apposite pompe.

L'uptake di glucosio sarà invece misurato attraverso glucosio marcato con C_{14} , il quale dovrà mostrare la stessa cinetica ottenuta dai precedenti esperimenti. Il controllo sarà svolto con il monitoraggio di ligandi che non sono simportati nel plasmalemma.

E' possibile misurare anche l'attività delle H^+ -ATPasi in vescicole artificiali, tramite la marcatura di ioni calcio: in condizioni normali l'antiporto H^+ -Ca è utilizzato per espellere il calcio in eccesso utilizzando il gradiente di protoni e l'idrolisi dell'ATP. Senza ATP il calcio non può essere espulso. L'aggiunta di uno ionoforo (molecola che forma pori attraverso i quali passano gli ioni) abbatte il gradiente di concentrazione del calcio, portando ad un riequilibrio sui due lati della membrana.



ATPasi a protone: CLASSIFICAZIONE

ATPasi di tipo F: utilizzano il gradiente di protoni per sintetizzare ATP, ma possono anche idrolizzarlo; sono presenti nella membrana plasmatica, mitocondriale e del cloroplasto e sono sensibili all'oligomicina e all'azide. Sono caratterizzate da una struttura quaternaria con grande Mr, composta da subunità transmembrana o periferiche (F0, F1).

ATPasi di tipo P: inibita dal vanadato, è presente nelle piante ma anche nei procarioti, produce aspartilfosfato durante l'attività catalitica, la cui produzione consente di traslocare H^+ attraverso la membrana. Hanno una specificità meno stretta rispetto alla precedente data la loro capacità di traslocare anche ioni calcio, sodio e potassio. L'enzima può funzionare come unica subunità di circa 200KDa, oppure può formare dimeri e multimeri.

ATPasi di tipo V: inibita dal nitrato, è presente nel vacuolo come enzima di circa 500 Kda.

ATPasi DI PLASMALEMMA

Le H^+ -ATPasi di plasmalemma sono pompe protoniche della membrana plasmatica che estrudono protoni utilizzando ATP; sono presenti in piante, funghi, alghe ed archeobatteri. E' presente in numerose isoforme (11 in *Arabidopsis*) composte da un'unica catena di circa 1000 amminoacidi e 100 KDa., la quale attraversa il plasmalemma 10 volte e circa il 70% della proteina è rivolta nel lato citoplasmatico. Il dominio C-terminale funge da inibitore dell'attività enzimatica: proteine prive di questa coda, o la cui coda è stata scissa, sono costitutivamente attivate. Normalmente la funzione di attivazione è svolta da specifiche proteine chiamate *proteine 14:3:3*, le quali spostano la coda dalla condizione in cui normalmente si trova.

Quando l'enzima deve attivarsi, una chinasi specifica fosforila una treonina sulla coda C-terminale, che viene riconosciuta dalle proteine dimeriche 14:3:3 ed è spostata per aumentare l'attività ATPasica dell'enzima di

membrana. La defosforilazione del sito permette il ripristino della normale condizione fisiologica (attività spenta), sebbene alcune tossine inducano l'enzima in una forma costitutivamente attiva.

La calcio ATPasi (di tipo P) è presente anche negli animali con cui ha una certa omologia di sequenza. Ha un'unica subunità con molti domini transmembrana, ed una grande parte rivolta nel citoplasma. A differenza della precedente, in questa ATPasi è il dominio N-terminale a regolare l'attività enzimatica attraverso l'interazione con la calmodulina.

L' H^+ -ATPasi vacuolare (tipo V) trasloca 2 H^+ (per ATP idrolizzato) dal citosol nel vacuolo, e le subunità polipeptidiche si associano in una struttura complessa: la parte proteica V_0 si può facilmente dissociare dalla parte integrale V_1 durante la reazione di idrolisi di ATP, quando la subunità D di V_1 ruota insieme alle 6 subunità c, iniziando l'attivazione della subunità A la quale consente lo spostamento di protoni (meccanismo simile alla centrifuga e al rotore). Nel vacuolo è presente anche un'altra ATPasi (singolo polipeptide di 80KDa) che è una *pirofosfatasi* traslocante protoni, la quale scinde il pirofosfato in due gruppi fosfati ricavando energia, e lavorando in parallelo con la pompa descritta sopra. Questa H^+ -pirofosfatasi trasporta un H^+ per pirofosfato idrolizzato, quindi l'energia necessaria per trasportare un H^+ è identica alla precedente; inoltre ha un ruolo regolativo in situazioni di stress come basse temperatura e ipossia, in cui la disponibilità di ATP è limitata. Le radici in particolare sono i tessuti che risentono maggiormente dell'ipossia: trovandosi sotto terra e non potendo usufruire dell'ossigeno atmosferico, devono utilizzare quello sciolto in acqua; in mancanza di ossigeno le radici subiscono gravi danni, ma questo succede anche quando c'è un eccesso di acqua, la quale è in grado di otturare gli stretti passaggi normalmente utilizzati dall'ossigeno atmosferico per sciogliersi nell'acqua a livello radicale.

La presenza di queste ATPasi vacuolari rende i vacuoli di alcune piante estremamente acidi, come nel limone o nel lime, e le foglie di alcune specie possono avere vacuoli iperacidificanti.

Il gradiente di H^+ formato da entrambe le pompe è utilizzato in trasporti attivi secondari, e crea un potenziale negativo a livello citosolico, e positivo a livello vacuolare.

Gli ABC trasportatori sono ATPasi che idrolizzano ATP per trasportare particolari sostanze come antocianine, plastocianine, metaboliti secondari vari, e sono stati individuati nel vacuolo, ma anche nel plasmalemma come pompe *inward/ outward rectifying*.

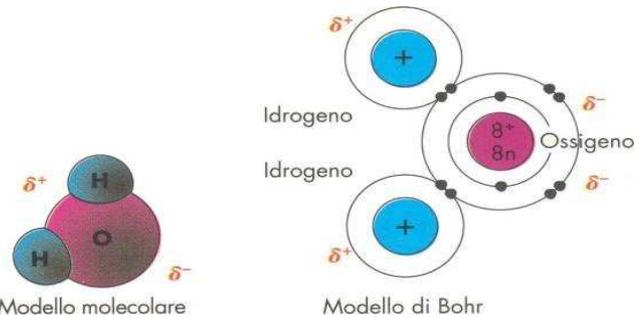
PATCH CLAMP

Il *patch clamp* è una tecnica che ha permesso di misurare l'attività dei singoli canali e con una certa precisione anche i potenziali di membrana. La tecnica consiste nell'utilizzare una pipetta che si attacca al protoplasto (quindi un cellula priva di parete cellulare), la quale aspirando può rimanere adesa al plasmalemma o può direttamente staccare il frammento di membrana sul quale è appoggiata. Nella prima situazione è possibile misurare la somma di tutte le cariche elettriche che derivano da flussi attivi e passivi nella cellula intera, mentre la seconda situazione è ottima per misurazioni di apertura e chiusura riguardanti un singolo o pochi canali, influenzati dal potenziale che il ricercatore può imporre per studiarne il comportamento.



L'ACQUA NELLE CELULE VEGETALI ED IL SUO TRASPORTO NELLA PIANTA

L'acqua è una molecola molto particolare. Ha un angolo di legame tra gli idrogeni di 105° ed una configurazione elettronica $2s^2 2p^4$ con una tendenza all'ibridazione sp^3 . L'ossigeno è più elettronegativo dell'acqua, e questo lo porta ad avere una maggiore tendenza nel trattenere gli elettroni condivisi di legame, causando una parziale carica positiva sui due idrogeni. Questa parziale redistribuzione di cariche è alla base della formazione del legame ad idrogeno, un



legame debole (anche se ha un'alta energia per la sua categoria, ossia 4,5 kCal/mol) che si può formare solo con azoto o ossigeno, gli unici due atomi che presentano un'adeguata elettronegatività. La formazione dei legami a idrogeno tra molecole d'acqua è alla base dello stato ordinato riscontrabile nel ghiaccio e nell'acqua liquida. La formazione dei legami ad idrogeno è anche alla base delle proprietà dell'acqua:

- **Forza di coesione:** attrazione esercitata tra molecole d'acqua adiacenti.
- **Forza d'adesione:** esercitata da molecole d'acqua su particelle in fase solida.
- **Tensione superficiale:** dipendente dalle prime, le molecole d'acqua a contatto con l'aria tendono ad occupare la minor superficie a contatto con l'aria dato che sono maggiormente attratte da altre molecole d'acqua che dalle molecole in fase gassosa; questo fenomeno è alla base della forma sferica di una goccia.

Queste tre proprietà sono alla base della *capillarità*, ossia il movimento ascensionale che tende a far risalire l'acqua in un tubo sottile: la forza di adesione permette l'adesione delle molecole d'acqua sulla superficie del tubo, mentre la forza di coesione tende a far diminuire la superficie di contatto esposta all'aria; sulla superficie di contatto si formano delle cavità (*menischi*) a causa delle forze di coesione, che non sempre sono concave, ma per altre sostanze possono essere anche convesse: l'angolo dipende dalle forze di adesione. Queste tre forze sono contrastate, durante la risalita dell'acqua, dalla forza di gravità (il peso della colonna d'acqua), la quale porta ad un punto in cui equivale alle altre tre forze ed il movimento ascensionale si ferma; più piccolo il raggio, maggiore sarà la risalita all'interno del vaso floematico.

La forza di coesione è responsabile della forza di tensione dell'acqua (capacità di resistere alla trazione), conseguenza dei legami ad idrogeno.

IL MOVIMENTO DELL'ACQUA

L'*energia libera* è l'energia disponibile per compiere lavoro (joule). L'*energia libera per mole* di una data sostanza è indicata come *potenziale elettrochimico* (joule/ mole). Il potenziale elettrochimico è dato dalla somma di varie componenti ed è indicato con:

$$\mu = \mu_0 + R \ln a + PV + zEF + mgh$$

μ_0 = potenziale in condizioni standard

R = costante dei gas

T = T assoluta in °K

a = attività (per soluzioni diluite corrisponde alla concentrazione)

P = pressione idrostatica

V = volume parziale molare della sostanza

z = carica elettrica della sostanza

E = potenziale elettrico

F = costante di Faraday

m = massa della sostanza

g = accelerazione di gravità

h = altezza alla quale si trova la sostanza

Questa formula definisce il potenziale elettrochimico di una data sostanza carica, ma essendo l'acqua polare ma non carica, la formula precedente elimina la componente zEF , e si parla di *potenziale chimico* (la componente elettrica non c'è). Per definizione l'acqua pura ha attività pari a 1, ed il volume occupato da una mole d'acqua è pari a $18 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{mol}$; la massa dell'acqua è 18. L'attività è definita da: γFr (frazione molare: numero di moli della sostanza/ numero di moli totali).

Nel caso dell'acqua si preferisce parlare di *potenziale idrico* (piuttosto che chimico): potenziale chimico/volume parziale occupato da una mole di acqua. Il potenziale idrico rappresenta l'energia per unità di volume necessaria per trasportare l'acqua da un punto del sistema ad un punto di riferimento (misurato in joule/ m³, anche se normalmente si utilizza il MPa dato che i valori normali si aggirano sui 10⁶ Pa); è un sistema per valutare il contenuto di energia libera dell'acqua rispetto a quella dell'acqua pura, ossia la capacità di compiere lavoro di una mole d'acqua. Il potenziale idrico serve per stabilire il direzione del flusso idrico attraverso le membrane cellulari, i tessuti e gli organi di una pianta, ossia capire se la pianta è adattata al nuovo stato di idratazione oppure se non è adeguato (valuta quindi lo stato idrico).

$$\frac{\mu - \mu_o}{\bar{V}} = \frac{RT \ln a}{\bar{V}} + \frac{P\bar{V}}{\bar{V}} + \frac{mgh}{\bar{V}} = \Psi_w$$

Il potenziale idrico è formato da 3 componenti (o potenziali):

- **Concentrazione** (RTlna/V): prende il nome di *potenziale di soluto* o *potenziale osmotico*; rappresenta l'effetto dei soluti che sono disciolti nell'acqua. La componente del potenziale di soluto dà sempre un contributo negativo al potenziale idrico, al massimo può essere pari a 0 quando l'acqua è pura; questo poiché la presenza di soluti rende il rapporto: soluti di acqua/ soluti totali, minore di 1. Ciò deriva dal fatto che il numero totali di moli, ossia moli d'acqua + moli di soluto, sarà sempre maggiore del numero di moli dell'acqua (per definizione compresi nel primo termine). Il potenziale di soluto tiene conto della concentrazione del soluto, molto più facile da analizzare rispetto alla concentrazione dell'acqua, e l'aggiunta del soluto abbassa l'attività dell'acqua (analizzabile dal punto di vista energetico dell'energia libera $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Aggiungendo soluto nell'acqua aumentano le interazioni tra soluto e acqua, quindi il disordine del sistema e l'entropia aumentano, l'energia libera diminuisce e anche il potenziale idrico. La pressione causata dal potenziale di soluto si chiama *pressione osmotica*; l'equazione di Vant'off permette di correlare il potenziale idrico alla pressione osmotica, pari al potenziale di soluto cambiato di segno, quindi è sempre maggiore di 0 (o pari a 0 per l'acqua pura). La pressione osmotica è una proprietà colligativa, ossia dipende dal numero di particelle in soluzione: rappresenta la pressione da esercitare sulla superficie di un liquido iperosmotico per evitare che sia diluito da un liquido ipoosmotico (per impedire quindi la diluizione). Il movimento osmotico avviene spontaneamente, quindi tenderebbe ad abbassare l'energia libera della soluzione; questo è in accordo con il fatto che si deve compiere un lavoro (ossia esercitare la pressione) per evitare il raggiungimento di uno stato a minore energia libera (equilibrio).

In base all'equazione di van't Hoff

$$\pi = RTC_s = -\frac{RT \ln a_w}{\bar{V}_w} \Rightarrow$$

$$-RTC_s = \frac{RT \ln a_w}{\bar{V}_w} = -\pi = \Psi_s$$

$$\pi = RTC_s$$

pressione osmotica

$$\Psi_s = -RTC_s$$

R = costante dei gas

T = temperatura assoluta

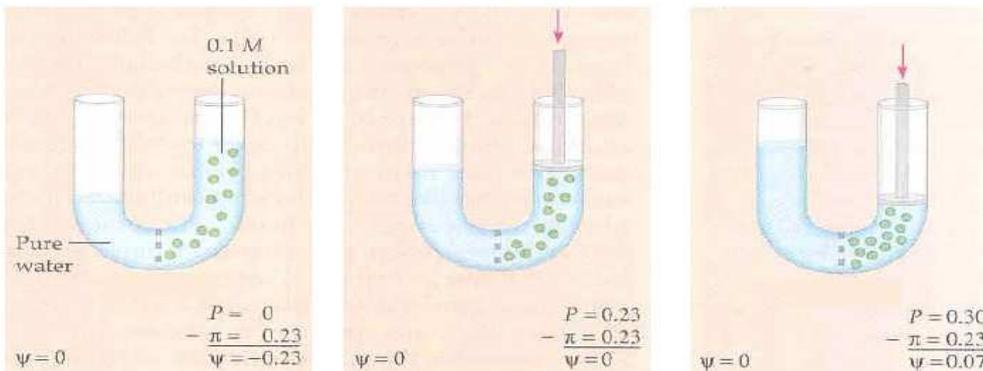
C_s = concentrazione di soluti espressa come osmolalità
(moli di soluti totali disciolti in 1 L di acqua)

- **Pressione** (PV/V): Il potenziale di pressione non è altro che la pressione per volume parziale molare, che nel caso del potenziale idrico si divide per il volume parziale molare, e prende il nome di pressione idrostatica, ossia: Pressione assoluta – Pressione atmosferica, questo valore può essere negativo o positivo a seconda di quale delle due sia più grande; a pressione ambientale l'acqua ha una pressione pari a 0. All'interno delle cellule è presente una pressione idrostatica positiva detta

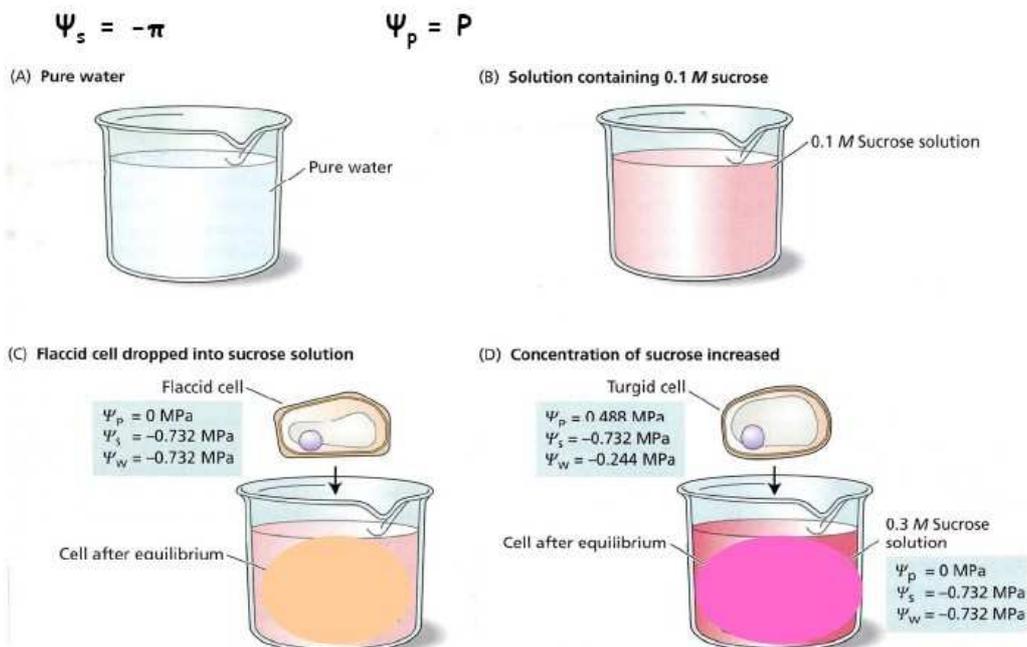
pressione di turgore, i cui valori normalmente sono compresi tra 0.5 e 1M, ma si definisce invece *tensione* la pressione negativa, come nello xilema o quando l'acqua è presente nel sottosuolo.

- **Gravità:** si definisce tramite la formula: $(mgh/ \text{Volume parziale molare dell'acqua})$, ossia ρgh . La componente del potenziale idrico in funzione della gravità dipende dalla densità dell'acqua, dall'accelerazione di gravità e dall'altezza dell'acqua rispetto allo stato di riferimento. E' un prodotto costante pari a 0.01 MPa per metro. Variando questa componente in base all'altezza, per altezze inferiori a 10 metri può essere trascurabile, però per alberi alti come le sequoie americane questo valore assume una grande importanza. Questa espressione può comunque essere vista in un altro modo: considerando che la pressione di soluto è uguale alla pressione osmotica cambiata di segno, il potenziale idrico può essere descritto come: $\text{pressione osmotica} - \text{pressione idrostatica} + \rho gh$ (questo per altezze elevate).

L'acqua, come tutte le sostanze, si muove per abbassare la propria energia libera e quindi da una zona a potenziale idrico maggiore verso una zona potenziale idrico minore, ossia secondo gradiente e senza bisogno di energia.



Immaginiamo di avere un classico tubo ad U (sopra) separato da una membrana semipermeabile, in cui nella metà di destra è sciolto un soluto per una concentrazione 1M, e nella metà di sinistra è presente acqua pura. In quest'ultima metà la pressione è 0 (non sempre, solo quando è in equilibrio), mentre nell'altro lato la pressione osmotica raggiunge livelli di 0.23 MPa: quindi l'acqua si muove per diminuire la pressione secondo il gradiente di potenziale idrico, da sinistra a destra. Esercitando una pressione pari a quella osmotica sul compartimento con il soluto, l'acqua non si muoverà, dato che il potenziale idrico sarà in entrambi 0. Esercitando una pressione ancora maggiore l'acqua si muoverà verso la soluzione di acqua pura (in questo caso il potenziale idrico della soluzione con soluto è positivo). Quindi il potenziale idrico solitamente ha valori negativi, ma la componente di pressione può portarlo a valori sopra lo 0. Si può fare un altro esempio.



Si hanno due recipienti (sopra), il primo contenente acqua pura, il secondo contenente saccarosio 0.1 M in cui il potenziale idrico sarà negativo (-244 MPa). Per sottolineare il significato della proprietà colligativa del potenziale di soluto, è importante sottolineare che se al posto del saccarosio fosse stato presente cloruro di sodio, per mantenere lo stesso potenziale idrico sarebbe stato necessario la metà di concentrazione molare, dato che il cloruro di sodio si dissocia completamente in 2 particelle. Una cellula ha un potenziale di soluto di -0.732 MPa pari al proprio potenziale idrico. Se la cellula flaccida la ponessimo nella soluzione precedente, l'acqua tenderebbe ad entrare nella cellula per portare il potenziale idrico all'equilibrio, ma basta pochissima acqua per raggiungerlo, quindi sostanzialmente il volume della soluzione non cambia (a causa del minimo cambiamento di acqua). Nella cellula invece si sviluppa subito una pressione idrostatica bilanciata dalla pressione di turgore positiva; l'equilibrio è raggiunto molto velocemente. Il poco cambiamento di volume non provoca una grande diluizione che influenzi profondamente il potenziale di soluto, ma invece basta molto poco per aumentare la pressione idrostatica interna alla cellula, a causa della parete cellulare che oppone resistenza all'eccessivo aumento del volume intracellulare. La pressione di turgore che si raggiunge è di quasi -0.5 MPa.

Quindi la cellula ha aumentato la pressione idrostatica (o pressione di turgore) diventando *turgida*. Se la stessa cellula successivamente è introdotta in un recipiente contenente una soluzione 0.3 M di saccarosio, il potenziale idrico del recipiente sarà di -0.732 MPa, e la pressione di turgore scenderà a 0 a causa della fuoriuscita di acqua: la cellula è ritornata flaccida.

Quindi riassumendo: l'acqua si muove da potenziali idrici maggiori a potenziali idrici minori, ed il potenziale idrico è la somma di potenziale di soluto (negativo) e pressione di turgore.

La *plasmolisi* è il fenomeno attraverso il quale una cellula posta in ambiente iperosmotico raggrinzisce, poiché il plasmalemma si stacca dalla parete cellulare dato che l'acqua fuoriesce dalla cellula. Nel caso invece in cui una cellula vegetale sia immersa in un ambiente iposmotico, la parete cellulare genera una pressione di turgore che contrasta l'entrata dell'acqua che potrebbe portare alla lisi cellulare se eccessiva.



Bastano poche variazioni di volume per determinare grandi variazioni della pressione di turgore.

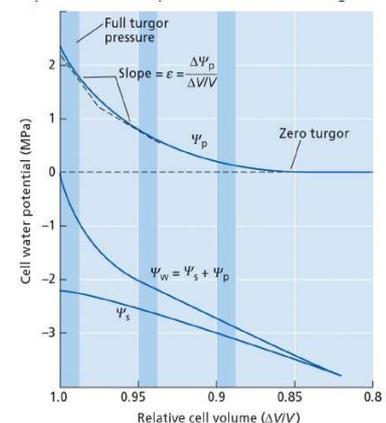
Diminuendo il volume cellulare di solo il 5%, il potenziale idrico diminuisce ma solo per la diminuzione della pressione di turgore, dato che il potenziale di soluto varia pochissimo. Per grandi variazioni di volume la componente della pressione di turgore cambia molto velocemente (il suo contributo si esaurisce subito), dopo la quale entra in gioco la pressione di soluto che per cambiamenti superiori al 15-20% ha un ruolo molto importante.

Il termine ϵ è il *modulo di elasticità volumetrico*, una misura della rigidità della parete: tanto più rigida sarà la parete, tanto più ripida sarà la curva del cambiamento, tanto più piccole variazioni di volume innescano l'instaurarsi di pressioni di turgore elevate.

Ammettendo che la parete si rilassi, e che quindi la tensione esercitata dalla parete diminuisca, diminuisce anche la pressione di turgore, a ciò è collegata una diminuzione del potenziale idrico interno alla cellula.

Tutto questo processo determina l'entrata di acqua all'interno della cellula, seguito dall'aumento delle dimensioni cellulari. Il rilassamento è indotto dalla molecola segnale *auxina*, la quale innesca l'acidificazione della parete cellulare attivando una classe di proteine chiamate *espansine*, le quali interferiscono con la formazione dei legami ad idrogeno tra la cellulosa, consentendo il rilassamento della parete cellulare.

Le tracheidi durante il differenziamento aumentano di 10000 volte il proprio volume cellulare grazie ad un rilassamento della parete cellulare. La crescita per distensione non è più attuabile dopo la deposizione della parete secondaria, rigida e non elastica a causa della maggiore presenza di lignina e cellulosa: semplicemente l'acqua non può più entrare nel citoplasma a causa della impossibilità di espansione parietale.



VELOCITA' DELL'ACQUA

La velocità dell'acqua dipende dalle forze guida e dalle caratteristiche del mezzo. Il movimento spontaneo dell'acqua può avvenire per:

- **Diffusione molecolare:** avviene in risposta al gradiente di concentrazione. La diffusione è un meccanismo delle molecole dovuto all'agitazione termica, ossia all'energia cinetica, che le spinge ad

occupare tutto il volume disponibile del solvente. La diffusione determina lo spostamento di molecole da regioni ad alta concentrazione verso regioni a bassa concentrazione, spontaneamente. La velocità con cui avviene la diffusione è descritta dalla *Legge di Fick*:

$$J_s = -D_s (dc/dx)$$

Il segno negativo indica il movimento verso regioni a bassa concentrazione. Il coefficiente di diffusione D_s misura quanto facilmente una sostanza si muove attraverso un mezzo. Dalla legge di Fick si ricava il tempo necessario ad una sostanza s per raggiungere un punto situato ad una distanza d dal punto di partenza tale che la concentrazione sia metà di quella iniziale:

$$T_{c=1/2} = (d^2/D_s)K, \text{ dove } K=1$$

Questa relazione spiega perché una sostanza con un coefficiente di diffusione alto presenta un tempo di diffusione minore; il glucosio ad esempio ha valori molto bassi, che si aggirano intorno ai 10^{-9} ; questo valore molto basso (impiega 30 anni per compiere un millimetro tramite diffusione), in unione al fatto che il tempo dipende dal quadrato della distanza, fanno della diffusione un mezzo per spostamenti su brevi distanze, ma non contribuisce assolutamente allo spostamento su grandi distanze.

- **Flusso di massa:** avviene in risposta al gradiente di pressione (correnti di convezione, flusso di un fiume, caduta della pioggia). E' determinata dall'*Equazione di Poiseuille*:

$$\text{Velocità di flusso: } (\pi r^4/8\eta)(dP/dx)$$

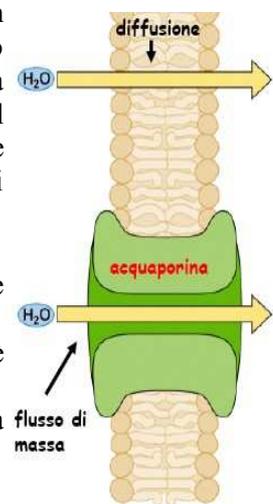
dove r = raggio tubatura, e η = viscosità del liquido e (dP/dx) = gradiente di pressione. Quindi il flusso di massa è adatto al trasporto su grande distanza, e dipende molto dal raggio del tubo in cui scorre il liquido.

- **Osmosi:** è il movimento del solvente attraverso la membrana che avviene in risposta al gradiente di potenziale idrico. Le membrane cellulari sono selettivamente permeabili, e l'osmosi avviene in risposta ad una forza motrice, alla quale contribuiscono sia il gradiente di concentrazione sia il gradiente di pressione che determinano la direzione e la velocità di flusso. Le acquaporine possono notevolmente aumentare il flusso idrico creando pori nel plasmalemma che favoriscono il passaggio delle molecole d'acqua.

La velocità di trasporto dipende dalla forza motrice (gradiente di Ψ) e dalle caratteristiche fisiche del mezzo.

Velocità di flusso = forza motrice / resistenza; la resistenza (del mezzo) è l'inverso della conduttanza.

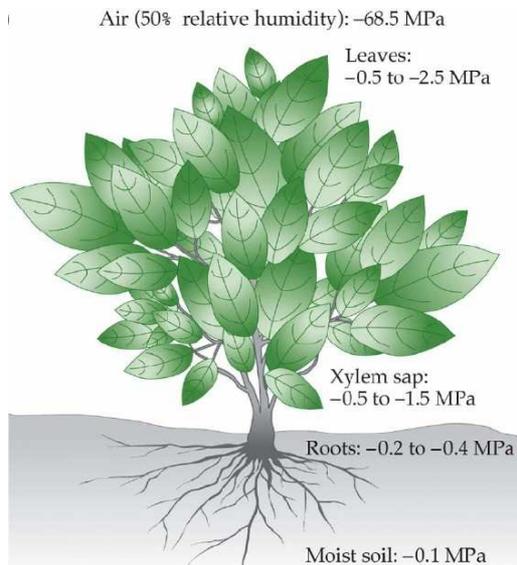
Velocità di flusso del volume = $A L_p(\Delta\Psi) = L(\Delta\Psi)$, dove L_p = conduttività idraulica, A = area della membrana, $A L_p = L$ conduttanza idraulica totale



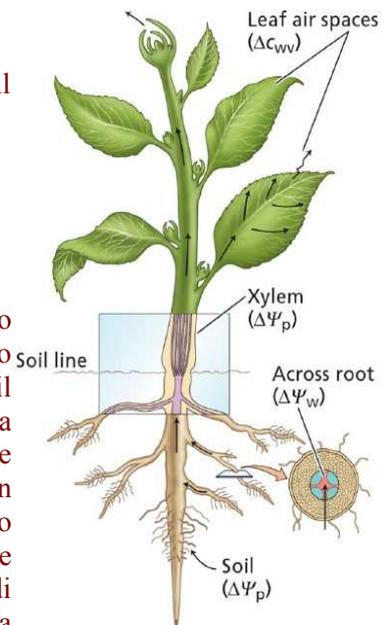
TRASPORTO DELL'ACQUA NELLA PIANTA

All'interno della pianta i meccanismi e le forze motrici che consentono il trasporto dell'acqua dalle radici alle foglie sono:

- gradiente di pressione nel suolo
- gradiente di potenziale idrico nella radice
- gradiente di pressione nel trasporto a lunga distanza nello xilema
- gradiente di concentrazione del vapor d'acqua nella traspirazione



Il potenziale idrico diminuisce dalle radici verso le foglie, consentendo il movimento dell'acqua secondo gradiente; se le radici presentano un potenziale idrico troppo alto l'acqua non può essere assorbita (per i livelli di potenziale idrico guardare la figura a sinistra).



POTENZIALE IDRICO NEL SUOLO

Il potenziale idrico del suolo dipende dalla concentrazione di soluti presente e in particolare dalla pressione idrostatica.

Il potenziale di soluto o pressione osmotica è bassa, circa 0.01 MPa, ma in suoli salini arriva anche a valori intorno ai

0.2 MPa. Al contrario la pressione idrostatica è sempre minore di 0, in suoli aridi raggiunge anche i -3 MPa. L'espressione che definisce il valore della pressione idrostatica è:

$$P = \frac{-2\tau}{r}$$

τ tensione superficiale
 (7.28×10^{-8} MPa m)

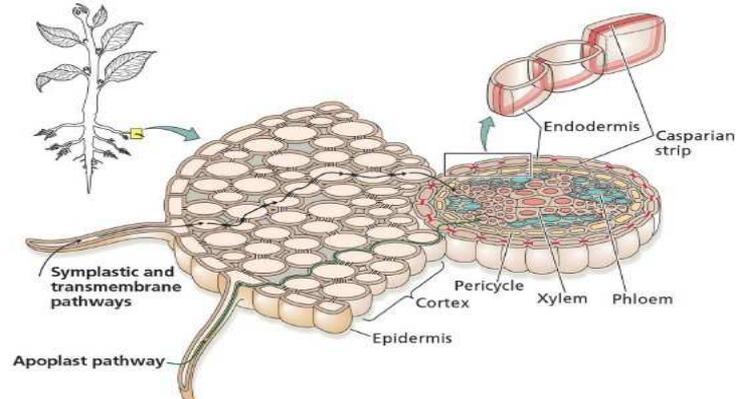
La pressione idrostatica è negativa perchè dipende dalla tensione superficiale, e dalla curvatura dei menischi che si creano nelle zone d'acqua a contatto con le particelle di terreno (proprietà di adesione). L'acqua mano a mano che è assorbita dalle radici lascia menischi con un raggio sempre più piccolo, che diminuiscono la pressione idrostatica nel suolo (si genera un gradiente di pressione).

Il livello di idratazione del suolo è fondamentale per generare il gradiente di pressione che consente l'assorbimento dell'acqua da parte delle radici, alcune piante presentano un potenziale idrico molto negativo, e questo consente loro di competere efficacemente con le altre piante quando entrambe vivono in un ambiente arido: la pianta con un potenziale idrico minore riesce ad assorbire l'acqua dal suolo anche se questo si inaridisce (naturalmente c'è un limite a tutto). Alcune piante sono in grado di effettuare questo aggiustamento osmotico quando ve ne è bisogno, aumentando la quantità di soluto presente nel citoplasma, il quale abbassa il potenziale idrico delle cellule radicali e permette un maggior assorbimento: queste sostanze sono chiamate *osmoliti compatibili*, possono essere accumulati in gran quantità poiché non interferiscono con l'attività enzimatica cellulare dato che a pH citoplasmatico (7.2) sono in forma zwitterionica, ossia priva di carica netta. Gli osmoliti compatibili non possono essere sostituiti con ioni provenienti dall'ambiente extracellulare, dato che la loro carica interferirebbe troppo con l'attività cellulare e alla fine provocherebbe seri danni osmotici, anche se gli ioni fossero internati nel vacuolo (infatti richiamerebbero troppa acqua dal citoplasma). Tra questi osmoliti compatibili abbiamo la prolina (pI 7) e la *betaina glicina*, sintetizzata dall'enzima *betainaaldeidodeidrogenasi*, enzima che possiedono soltanto le piante che effettuano l'aggiustamento osmotico ed espresso solo quando ve ne è bisogno.

LIVELLO RADICALE

A livello radicale esistono tre meccanismi che consentono all'acqua di essere assorbita:

- via apoplastica, attraverso lo spazio extracellulare
- via transmembrana, attraverso le cellule
- via simplastica, attraverso i plasmodesmi



$$\text{Conduttanza idraulica radicale } L_{\text{root}} = \frac{J_v}{\Delta\Psi}$$

$\Delta\Psi$ è la differenza di potenziale idrico attraverso la radice

La legge di Fick descrive il movimento secondo un gradiente di concentrazione; la legge di Poiseuille descrive il movimento secondo un gradiente di pressione, l'osmosi è proporzionale al gradiente di potenziale idrico, diviso l'area della sezione attraversata. Il prodotto della conduttanza per Area prende il nome di Conduttanza totale, questo termine semplifica la descrizione del movimento dell'acqua nella radici (i peli radicali aumentano enormemente la superficie di assorbimento), che tiene conto di tutta la resistenza offerta dalla radice.

A livello radicale si osserva l'instaurarsi di una pressione sempre positiva, che arriva fino a valori di 0.5 MPa, questa si forma nello xilema alla base della radice e prende il nome di *pressione radicale*. Questa è la conseguenza dell'assorbimento dei soluti da parte delle radici, che abbassano il potenziale di soluto e quindi anche il potenziale idrico, aumentando l'assorbimento di acqua da parte delle radici. A causa di un aumento della *pressione idrostatica* o *pressione di turgore*. Questa pressione positiva si osserva anche nelle foglie quando è presente il fenomeno detto *gluttazione*, ossia la fuoriuscita di flusso xilematico dalle foglie, in particolare da strutture dette *idatodi*; questo fenomeno si osserva principalmente la mattina quando non è presente la traspirazione nelle foglie (vedi dopo).

LIVELLO XILEMATICO

Lo xilema è responsabile del trasporto di acqua e soluti dalle radici alle foglie (movimento unidirezionale); il floema è responsabile del trasporto di acqua e vari composti in tutta la pianta (bidirezionale).

Lo xilema è il più efficiente sistema di trasporto che una pianta può possedere; è composto da:

- Tracheidi: presenti nelle Gimnosperme e Angiosperme. Sono di forma allungata e presentano una parete secondaria molto resistente e lignificata; si affiancano nel tessuto xilematico sovrapponendo le piccole aperture non lignificate presenti nella loro parete, consentendo il passaggio dell'acqua da una tracheide all'altra.
- Elementi vasali: presenti nelle Angiosperme. Hanno una forma più schiacciata rispetto ai tracheidi, e le aperture sono presenti solo nelle zone di contatto fra elementi vasali, ma sono aperture completamente allargate che quindi permettono la creazione di un unico grande vaso derivante da più elementi vasali uniti in serie. Sono presenti anche vie per l'acqua a bassa resistenza (prive di parete secondaria) lungo le pareti laterali.



Entrambi i tipi di vasi sono formati da cellule morte con parete lignificata.

L'acqua si sposta nel floema in base al flusso di massa, ma il gradiente di pressione non basta per spiegare il movimento dei liquidi nello xilema (è di solo 0.1 MPa e si annulla se la traspirazione è elevata). Il flusso di massa è descritto dalla legge di Poiseuille:

Equazione di Poiseuille

$$\text{Velocità di flusso} = \frac{\pi r^4}{8 \eta} \frac{dP}{dx} \quad [\text{m}^3 \text{s}^{-1}]$$

r raggio della tubatura

η viscosità del liquido (per H_2O $\eta = 10^{-9} \text{ MPa s}^{-1}$)

$\frac{dP}{dx}$ gradiente di pressione

Il gradiente necessario per trasportare l'acqua è (secondo vari calcoli) pari a 0.02 MPa/ metro, un valore enorme.

Immaginiamo di avere un tubo composto da cellule vive piuttosto che morte e cave: nel caso della diffusione dell'acqua attraverso questo tessuto, l'equazione è: conduttanza idraulica/ gradiente di potenziale idrico.

Dopo innumerevoli calcoli si scopre che il gradiente di potenziale idrico necessario per attraversare una singola membrana plasmatica è pari a 10^4 MPa, un valore enorme, che se poi è moltiplicato per le più di 1000 cellule presenti in ogni vaso xilematico, raggiungerebbe valori stratosferici. Quindi gli elementi xilematici cavi sono l'unica soluzione per un efficiente trasporto su lunga distanza.

Il gradiente di pressione che si presenta nello xilema è di circa 3 MPa, molto superiore al valore massimo di 0.5 MPa dato dalla pressione radicale. Da dove deriva il resto del gradiente di pressione?

La soluzione è stata sviluppata sotto il nome di *Teoria della coesione-tensione*: la forza motrice che permette all'acqua di risalire dipende dalle proprietà collegata alla molecola d'acqua.

Le forze di coesione/adesione delle molecole di acqua consentono sia la trasmissione della tensione sviluppata in seguito alla traspirazione che avviene nelle foglie, sia la formazione di colonne di acqua intatte che determinano la risalita dell'acqua nello xilema; si sviluppa un gradiente di pressione negativo (quindi lo xilema è sotto tensione) che si propaga a tutta la colonna d'acqua grazie alle forze di adesione e coesione. La forte tensione negativa è contrastata dalla lignificazione delle pareti secondarie delle cellule xilematiche, che altrimenti collaserebbero come una busta di plastica collassa in cui si inspira al suo interno. La forza di coesione consente alla colonna d'acqua di non rompersi: essa sale grazie alla pressione negativa che si trasmette dalle foglie, dove è generata per traspirazione, fino alle piccole venature dello xilema.

Come conseguenza del fatto che l'acqua è sotto pressione, si osserva nelle piante il fenomeno della *cavitazione*: i gas disciolti nell'acqua sotto tensione tendono a passare nella fase di vapore formando bolle che si espandono nei vasi xilematici, bloccando il vaso se si formano bolle troppo grandi; la formazione delle bolle è superata grazie alle punteggiature appaiate che caratterizzano gli elementi vasali e le tracheidi, che offrono così una via alternativa al passaggio dell'acqua. La notte, quando la traspirazione è bassa, diminuisce la tensione nello xilema e i gas si ridisciolgono nell'acqua eliminando le bolle. Anche la presenza di una pressione radicale limita la cavitazione in quanto pressione positiva.

In seguito all'evaporazione dell' H_2O , si sviluppa sulla superficie delle pareti cellulari una pressione negativa (tensione) che permette al succo xilematico di raggiungere la foglia: questo corrisponde alla diminuzione del raggio dei menischi; mano a mano che il raggio del menisco diminuisce, diminuisce anche la pressione idrostatica. Ad esempio con un raggio di 5 nm si ottiene una pressione di circa -30 MPa. Sulla base di questo discorso è chiaro che l'acqua si muove nelle cellule morte per un processo passivo, ed è stato sperimentalmente dimostrato che l'acqua può muoversi in un albero anche se le cellule sono morte.

Il raggio più piccolo che un menisco può contenere è di 0.12 nm, conferendo la capacità di sopportare una colonna d'acqua di 120 metri!

Riassumendo:

- L'acqua all'interno della pianta forma una colonna di liquido continua dalle radici alle foglie. Tale continuità idraulica permette il trasferimento istantaneo delle variazioni di P.
- La forza motrice per il movimento dell'acqua è la tensione superficiale che si sviluppa a livello della superficie di evaporazione.
- Il raggio dei menischi ricurvi è sufficientemente piccolo da supportare colonne di acqua molto alte ($r = 0.12 \mu\text{m}$ supporta una colonna di 120 m).
- L'evaporazione determina un gradiente di pressione o tensione lungo la via di traspirazione. Ciò causa un influsso di acqua dal suolo alla superficie di traspirazione.
- L'acqua nello xilema è in uno stato metastabile e può dar luogo al fenomeno della cavitazione.

LIVELLO FOGLIARE: TRASPIRAZIONE

La traspirazione consiste nell'evaporazione dell'acqua a livello delle superfici acqua-aria dei tessuti vegetali e nel movimento delle molecole di vapore acqueo dagli spazi intercellulari all'esterno. Il 95% della traspirazione avviene a livello degli stomi, solo il restante 5% è perso tramite la cuticola.

$$\text{VELOCITA' DI FLUSSO} = \frac{\text{FORZA MOTRICE}}{\text{RESISTENZA}}$$

Forza motrice: è il gradiente di pressione nello xilema; nella traspirazione è il gradiente di vapor d'acqua tra la foglia e l'aria: l'acqua, evaporata dalla superficie delle cellule negli spazi aeriferi, esce dalla foglia per diffusione. Ma come può avvenire su lunga distanza negli spazi aeriferi, se la diffusione è analizzabile solo su breve distanza?

$$-[C_{wv(aria)} - C_{wv(foglia)}]$$

$C_{wv(foglia)}$ viene stimata assumendo che negli spazi aeriferi il potenziale idrico sia in equilibrio con quello delle superfici dalle quali l'acqua evapora.

$$t_{c=1/2} = \frac{d^2}{D_w} \rightarrow \frac{(10^{-3} \text{ m})^2}{2.4 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}} = 0.042 \text{ s}$$

Normalmente le sostanze hanno un coefficiente di diffusione (D) molto basso, ma per i gas è invece elevato quindi impiegano pochissimo tempo per muoversi tramite diffusione. Il vapore ha un coefficiente di diffusione pari a 10^{-5} m/s.

Nello spazio aerifero è possibile supporre che il potenziale idrico dell'aria sia in equilibrio con il potenziale idrico presente nello spazio aerifero, questo perchè il volume dello spazio aerifero, rispetto al volume della superficie dalla quale avviene la traspirazione, è molto piccolo, l'equilibrio quindi è raggiunto rapidamente.

$$\psi = \frac{RT}{V_w} \ln(RH)$$

RH umidità relativa dell'aria

$$RH = \frac{C_{wv}}{C_{wv(sat.)}}$$

$0 < RH < 1$

TABLE 4.2
Representative values for relative humidity, absolute water vapor concentration, and water potential for four points in the pathway of water loss from a leaf

Location	Relative humidity	Water vapor	
		Concentration (mol m ⁻³)	Potential (MPa) ^a
Inner air spaces (25°C)	0.99	1.27	-1.38
Just inside stomatal pore (25°C)	0.95	1.21	-7.04
Just outside stomatal pore (25°C)	0.47	0.60	-103.7
Bulk air (20°C)	0.50	0.50	-93.6

L'umidità relativa negli spazi aeriferi fogliari arriva fino a valori del 100%. Il potenziale idrico dell'aria arriva a -93.6 MPa, quindi è presente un gradiente molto ripido di potenziale idrico che favorisce di molto la fuoriuscita dell'acqua dallo spazio aerifero verso l'esterno. L'umidità relativa dipende dalla temperatura esterna, poiché la saturabilità dello spazio aerifero è esponenzialmente proporzionale alla temperatura esterna. Quindi se la pianta subisce un repentino aumento di temperatura, l'umidità relativa diminuisce perchè aumenta la concentrazione di acqua che determina la saturazione massima all'interno dello spazio aerifero. Se diminuisce l'umidità relativa diminuisce anche il potenziale idrico, quindi altra acqua evapora dalla superficie della foglia per ripristinare l'equilibrio.

Resistenza alla diffusione del vapore d'acqua: si compone di due tipi di resistenze:

- **resistenza stomatica:** gli stomi sono aperture presenti sul margine inferiore delle foglie, che quando sono chiuse impediscono il passaggio della maggior parte del vapore acqueo intrappolato negli spazi aeriferi. Quando l'aria è ferma, l'apertura degli stomi non determina una grande variazione del flusso di traspirazione; quando l'aria è in movimento (vento), l'apertura degli stomi comporta un forte incremento della traspirazione
- **resistenza dello strato limite:** lo strato limite è uno strato di aria immobile presente sulla superficie fogliare, che quindi impedisce fisicamente il passaggio del vapore acqueo che vi rimane intrappolato.

$$\text{VELOCITA' DI FLUSSO} = \frac{\text{FORZA MOTRICE}}{\text{RESISTENZA}}$$

$$E = \frac{C_{wv(foglia)} - C_{wv(aria)}}{r_s + r_b}$$

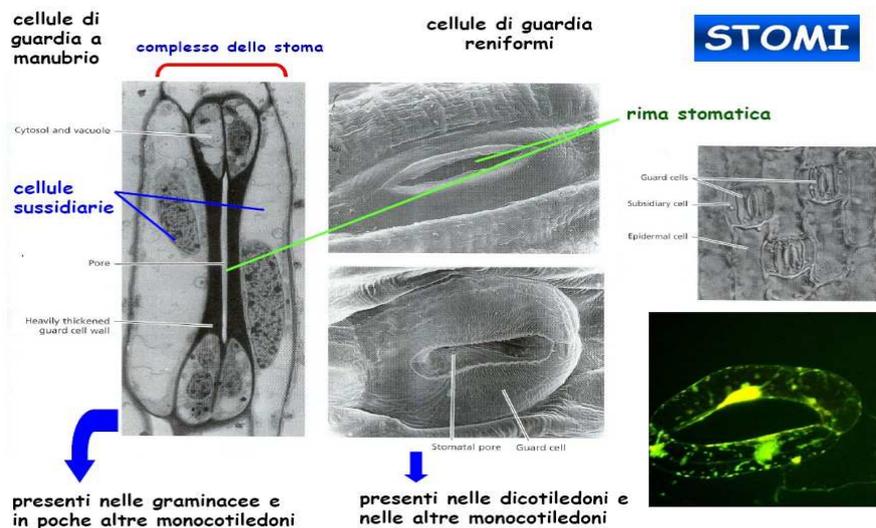
E [mol m⁻² s⁻¹]
r [m⁻¹ s]
C_w [mol m⁻³]

STOMI

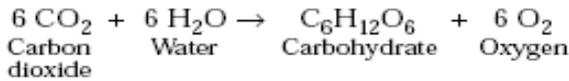
Lo stoma consiste in un'apertura chiamata *rima stomatica* circondata da due *cellule di guardia*; l'apertura dello stoma è causata da un aumento di turgore in queste cellule. Le pareti delle cellule di guardia sono ispessite ($\approx 5 \mu\text{m}$) rispetto a quelle delle altre cellule epidermiche ($\approx 1-2 \mu\text{m}$); nelle cellule normali le microfibrille di cellulosa sono orientate trasversalmente rispetto all'asse principale della cellula, mentre nelle cellule di guardia le microfibrille si aprono a ventaglio e l'ingrandimento cellulare è rinforzato: le cellule si curvano verso l'esterno. L'aumento della pressione di turgore è causato da alcune H^+ -ATPasi presenti sulla membrana plasmatica delle cellule di guardia.

I fitocromi permettono ai recettori di captare la luce blu o rossa; alcuni recettori che captano la luce blu attivano le H^+ -ATPasi del plasmalemma, le quali iperpolarizzano la cellula innescando l'apertura dei canali del potassio, permettendo l'entrata di ioni potassio nel citoplasma ed abbassando il potenziale di soluto e quindi il potenziale idrico (ossia aumenta la pressione osmotica). All'entrata degli ioni potassio segue l'entrata degli ioni cloro. L'abbassamento del potenziale idrico permette l'entrata di acqua e la conseguente apertura dello stoma.

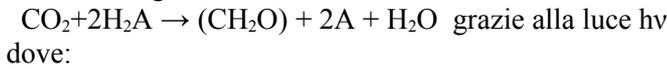
Questa è una teoria nuova: prima si riteneva che l'amido fosse degradato a malato, aumentando così la pressione osmotica, ma la verità è che l'acido malico, essendo bicarbossilico, presenta due cariche negative a pH citoplasmatico: la sua funzione consiste nell'annullare l'afflusso delle cariche positive del potassio che entrano nel citoplasma, non serve ad aumentare la pressione osmotica!



FOTOSINTESI

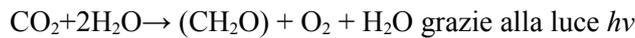


La fotosintesi è un processo biologico di ossidoriduzione in cui l'accettore di elettroni è l'anidride carbonica e un composto generico H₂A ridotto funge da donatore di elettroni. In generale:



- (CH₂O): carboidrato generato per riduzione
- 2A: prodotto formato per ossidazione di H₂A

Nella fotosintesi ossigenica il donatore di elettroni è l'acqua: in questo processo si ha evoluzione di O₂ grazie alla fotolisi di H₂O:



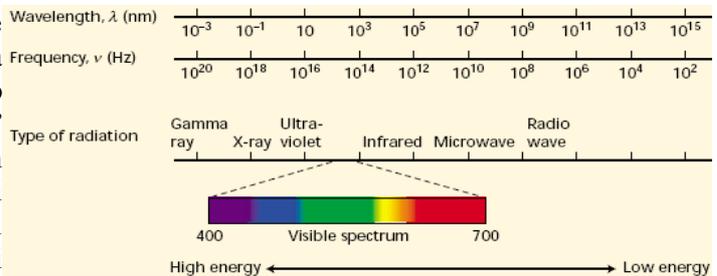
La luce è utilizzata come fonte di energia dato che i reagenti naturalmente non avrebbero l'energia per dare i prodotti. In altri tipi di fotosintesi come composto ridotto donatore di elettroni non è utilizzata l'acqua ma altre sostanze. Ad esempio nei batteri purpurei il donatore di elettroni è lo zolfo:



Fotosintesi e respirazione sono i processi complementari che fanno funzionare il flusso ciclico della materia ed il flusso non ciclico dell'energia all'interno della biosfera. La fotosintesi utilizza l'energia luminosa per trasformare gli ossidi inorganici in ossigeno e composti organici come il glucosio. Nella respirazione, sia delle piante sia degli animali, l'ossigeno reagisce con questi composti producendo gli ossidi inorganici anidride carbonica e acqua e energia utile.

ASSORBIMENTO E DIMENSIONE DI UN FOTONE

Quando un fotone con energia pari a $E=h\nu$ è assorbito da una molecola, ne modifica la configurazione degli orbitali esterni donando energia agli elettroni che possono così "saltare" da un orbitale (*stato basale*) ad un orbitale con energia più alta (*stato eccitato*). Gli elettroni occupano solo stati energetici distinti, e quindi l'energia fornita dal fotone deve essere pari all'energia richiesta per la transizione tra stati diversi. L'energia richiesta può anche essere scritta come: $E=hc/\lambda$: solo certe lunghezze d'onda (λ) possono essere assorbite. Quindi energia e lunghezza d'onda sono inversamente proporzionali. Dal momento che la luce si propaga per *quanti*, significa che per raggiungere determinati livelli energetici saranno assorbite solo determinate lunghezze d'onda: un elettrone assorbendo la luce acquista quel determinato quanto/i di energia e passa ad un livello energetico maggiore. Negli atomi ci sono pochi livelli energetici che richiedono grandi transizioni. Nei pigmenti utilizzati nella fotosintesi, invece, ci sono doppi legami coniugati che permettono la presenza di più livelli, il passaggio tra i quali richiede poco spazio di transizione tra stato basale e stato eccitato; i pigmenti assorbono quindi a lunghezze d'onda maggiori poiché richiedono meno quantità di energia per "sparare" gli elettroni da uno stato energetico all'altro. La fotosintesi utilizza come fonte energetica la luce visibile, un ristrettissimo spettro di lunghezze d'onda, che va dal rosso (bassa energia) al blu (alta energia).



Chemical structures of photosynthetic pigments are shown below:

- (A) Chlorophylls: Chlorophyll a, Chlorophyll b, and Bacteriochlorophyll a.
- (B) Carotenoids: β-Carotene.
- (C) Bilin pigments: Phycoerythrobilin.

La fotosintesi può dividersi in due grandi momenti: *reazioni alla luce* e *reazioni al buio*. La luce è necessaria per trasformare gli elettroni che derivano dall'acqua in energia chimica nei legami dell'ATP e del NADPH.

REAZIONI ALLA LUCE

Il trasferimento dell'energia degli elettroni è svolto da un complesso antenna dei tilacoidi, in cui *carotenoidi* e *clorofille* coinvolgono gli elettroni verso un centro di reazione centrale, tramite uno schema ad imbuto; una singola molecola d'acqua necessita di più di 100 clorofille per permettere il trasferimento fisico di elettroni fino al centro di reazione. I carotenoidi proteggono anche dalla fotoossidazione, quindi dalla morte.

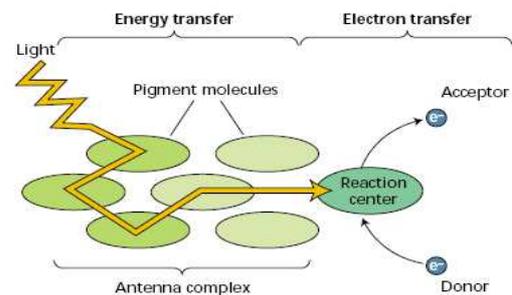
L'elettrone trasferito dall'acqua ossidata è necessario per rimpiazzare l'elettrone donato dal centro di reazione. L'eccitazione di un elettrone di una molecola di pigmento porta l'elettrone a uno o all'altro di pochi stati energetici distinti; non sono possibili livelli intermedi. Sovrapposti agli stati energetici leciti vi sono dei substatii che rappresentano l'energia vibrazionale e rotazionale della molecola. Anche i substatii sono distinti ma poco distanziati. Il passaggio dal terzo al secondo stato eccitato emette energia sotto forma di calore.

Quando un elettrone assorbe un fotone, viene dapprima innalzato a un livello di energia chiamato *stato eccitato di singoletto*. In base all'energia del fotone, l'elettrone può raggiungere il primo stato eccitato di singoletto o qualche stato superiore; si allontana, tuttavia, rapidamente dal primo, dissipando parte della sua energia come calore in un processo chiamato *conversione interna*. Nel primo stato eccitato di singoletto, la molecola può utilizzare la sua energia in una reazione chimica e può perdere energia per conversione interna, può irradiarla come *fluorescenza* (10^{-9} secondi) o passare in un altro stato eccitato: lo stato di *tripletto*. Quest'ultimo è più duraturo e la luce che viene emessa dalle molecole nello stato di tripletto viene chiamata *fosforescenza* (tempo maggiore rispetto alla fluorescenza, ossia 10^{-3} secondi). Gli stati di singoletto e tripletto sono definiti dallo spin degli elettroni esterni in un atomo o in una molecola: se gli spin sono antiparalleli, la molecola si trova in uno stato di singoletto, se sono paralleli in uno stato di tripletto. Lo stato di *doppietto* necessita di un elettrone non appaiato. I termini singoletto, doppietto e tripletto si riferiscono al numero di modi in cui gli elettroni possono orientarsi rispetto a un campo magnetico.

Tutti i pigmenti come le clorofille hanno la capacità di fluorescere.

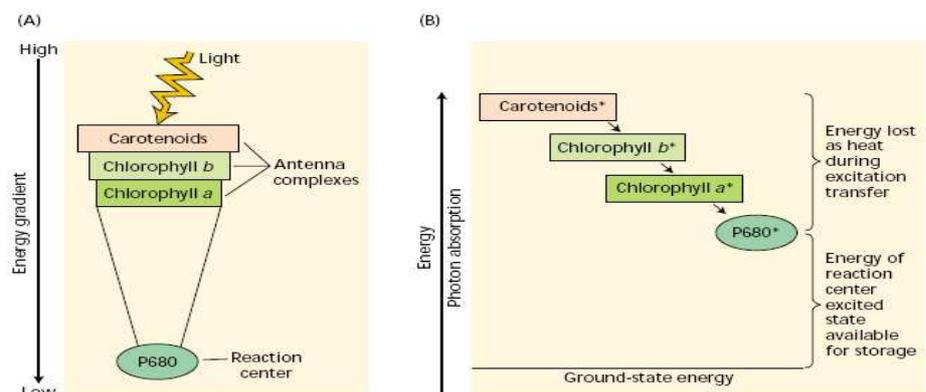
Il decadimento dallo stato eccitato allo stato basale emette energia sotto forma di radiazione luminosa (secondo la legge di conservazione dell'energia), ma poiché una parte di energia è persa sotto forma di calore, la radiazione emessa avrà una lunghezza d'onda maggiore dato che ha energia minore. I cloroplasti per questo motivo sono rossi osservandoli con un fluorimetro.

Una clorofilla avrà un particolare spettro di assorbimento in base alle lunghezze d'onda che i suoi elettroni sono in grado di assorbire; quindi in base alla struttura, presenza di doppi legami, configurazione elettronica, ci sarà un assorbimento di determinate lunghezze d'onda aventi determinate energie, le quali scompariranno da uno spettro di assorbimento, ma compariranno in uno spettro di emissione (come positivo e negativo di una foto). In particolare il passaggio da stati superiori a stati di singoletto cede energia sotto forma di calore, quindi avremo un riscaldamento dell'apparato fotosintetico ad intensità molto forti. Il trasferimento di energia dal primo stato eccitato ad altri processi impiega 10^{-12} secondi.



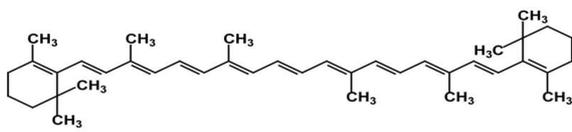
TRASFERIMENTO DI ENERGIA A PROCESSI FOTOCHIMICI

L'energia è trasmessa dallo stato eccitato allo stato fondamentale attraverso i pigmenti, tramite il meccanismo della *risonanza*, ossia senza un trasferimento di luce, ma solo grazie alla vibrazione delle molecole di clorofilla. Il principio alla



base di tutte le fotosintesi è lo stesso: più lunghezze d'onda un tilacoide può assorbire, più differenze di intensità luminose può sfruttare per compiere il processo fotosintetico.

La clorofilla è un pigmento contenente un anello protoporfirinico, struttura simile a molte molecole (quello che cambia è l'atomo centrale), tra cui anche il *fitocromo*, recettore della luce rossa, che ha la struttura di un tetrapirrolo aperto. Nel sistema descritto in precedenza ad imbuto, gli elettroni sono trasmessi per risonanza dopo che la luce colpisce i pigmenti: i primi a recepire lunghezze d'onda basse sono i carotenoidi, in seguito l'energia è trasferita alla clorofilla *b*, poi alla clorofilla *a*, in seguito al centro di reazione P680, durante ogni eccitazione una parte dell'energia è persa sotto forma di calore.



I carotenoidi sono il *licopene* ed il β -*carotene* (a lato), i quali divisi a metà forniscono 2 molecole di vitamina A: i doppi legami coniugati tipici dei carotenoidi garantiscono proprietà sia di assorbimento sia di neutralizzazione dei radicali liberi

che si generano durante il processo fotosintetico, e salvaguardano quindi le clorofille. Esiste un erbicida che blocca la sintesi dei carotenoidi e porta alla morte della pianta dato il danneggiamento delle clorofille (la pianta non è più verde).

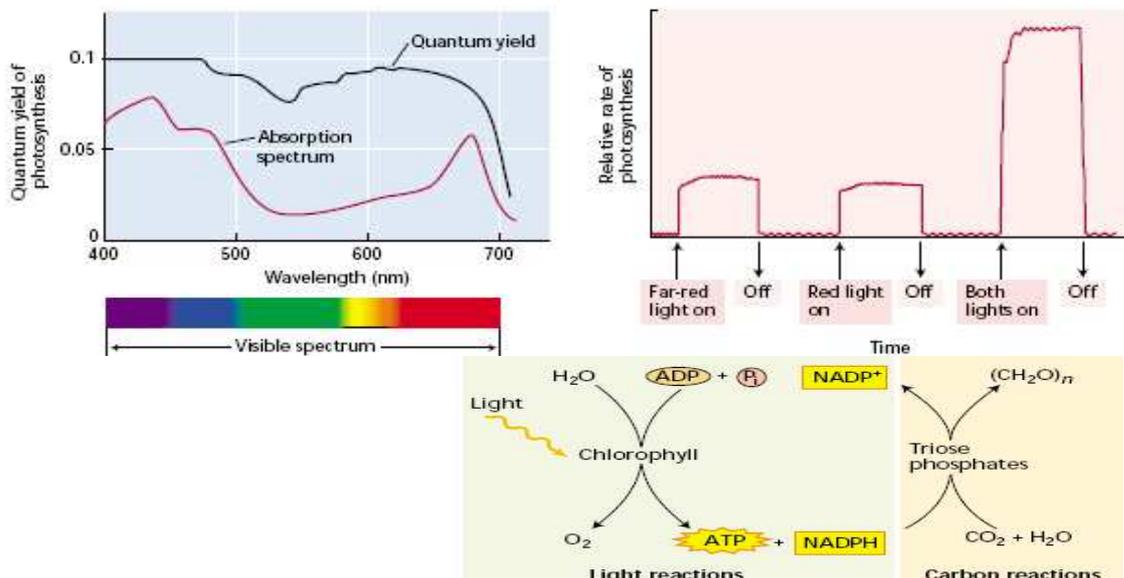
Quando la pianta è soggetta ad intensità luminose troppo alte il meccanismo di salvaguardia della cellula non riesce a "smaltire" la grande quantità di fotoni che arrivano agli apparati fotosintetici; i fotoni in eccesso generano prodotti fototossici portando alla cosiddetta *fotoinibizione*, tra i quali ci sono l'ossigeno singoletto, gli anioni superossido, l'acqua ossigenata, la clorofilla tripletto ed altri radicali liberi, i quali danneggiano principalmente le proteine del fotosistema 2. Questi danni possono essere prevenuti dai carotenoidi, dall'ascorbato, dalla superossido dismutasi, che permettono alla cellula di sintetizzare nuove proteine del fotosistema per riparare la parte danneggiata del complesso antenna. Una quantità troppo elevata di prodotti fototossici non permette un'adeguata riparazione data la limitata velocità del sistema di riparazione.

Per stimare l'efficienza fotosintetica si utilizza l'equazione:

$$\phi = \text{numero di prodotti formati fotochimicamente} / \text{numero di quanti assorbiti}$$

In natura il rapporto è molto minore di 1, dato che il processo fotosintetico è molto poco efficiente, solo il 2% dell'energia solare è utilizzata! La resa quantica maggiore ottenibile è 0.1, sebbene in laboratorio si arrivi anche a 0.3. La resa quantica della fotosintesi cade drasticamente con la luce nel "rosso lontano" a lunghezze d'onda maggiori di 680 nm, indicando che la luce nel rosso lontano da sola non è sufficiente a portare avanti la fotosintesi. Il leggero flesso vicino ai 500 nm è dovuto in un certo modo alla minor efficienza della fotosintesi che utilizza la luce assorbita da pigmenti accessori, i carotenoidi.

L'effetto di *amplificazione* (sotto): la velocità della fotosintesi in presenza contemporanea di luce rossa e rosso lontano è superiore alla somma delle velocità ottenute dalle singole lunghezze d'onda. Le frecce rivolte verso l'alto e verso il basso indicano l'accensione e lo spegnimento della luce che permette la fotosintesi. Questo esperimento confuse i ricercatori degli anni '50, ma fornì una prova basilare a favore del concetto che la fotosintesi è condotta da due sistemi fotochimici che lavorano in tandem, ma che possiedono dei valori ottimali di lunghezza d'onda leggermente differenti.



LO SCHEMA Z

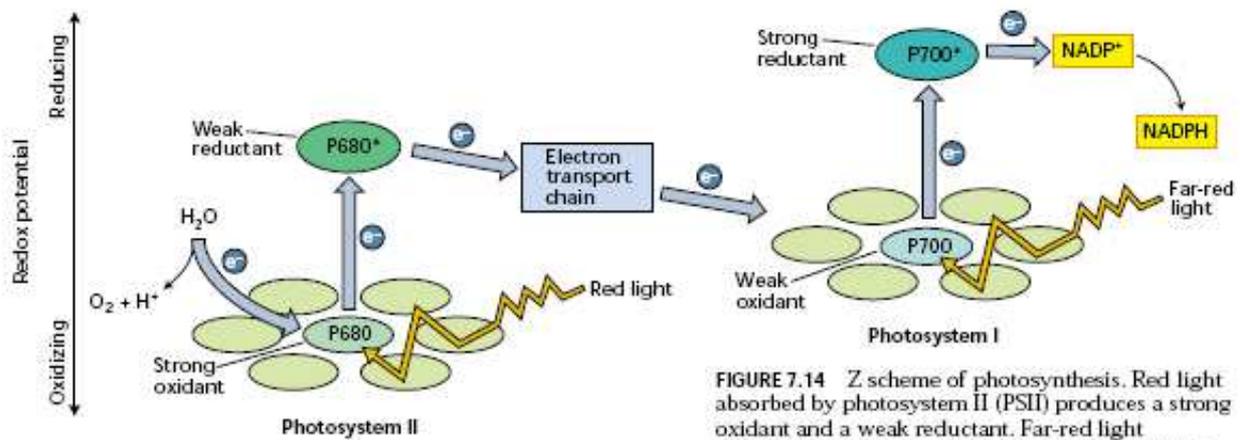
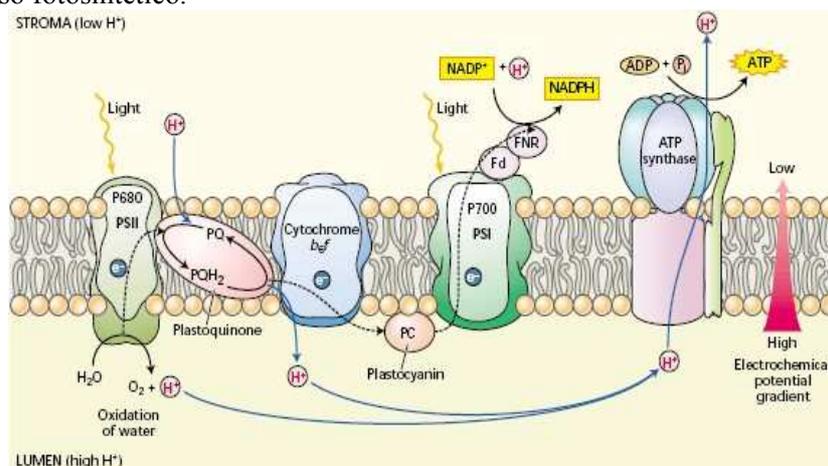


FIGURE 7.14 Z scheme of photosynthesis. Red light absorbed by photosystem II (PSII) produces a strong oxidant and a weak reductant. Far-red light absorbed by photosystem I (PSI) produces a weak oxidant and a strong reductant. The strong oxidant generated by PSII oxidizes water, while the strong reductant produced by PSI reduces NADP^+ . This scheme is basic to an understanding of photosynthetic electron transport. P680 and P700 refer to the wavelengths of maximum absorption of the reaction center chlorophylls in PSII and PSI, respectively.

Il termine “schema Z” si riferisce alla posizione dei potenziali ossidoriduttivi presenti nel complesso. Gli elettroni ottenuti dalla fotolisi dell'acqua passeranno da un forte ossidante ad un debole riducente, che potrà così donarli ad un debole ossidante e dopo ad un forte riducente: gli elettroni sono portati da un potenziale di 1.2 ad uno di -0.4, e questo è fondamentale dato che anche gli elettroni dell'acqua passano da un potenziale di 0.8 ad uno di -0.4. Gli elettroni sono trasferiti in modo spontaneo tramite il gradiente di potenziale ossidoriduttivo.

Nella respirazione mitocondriale gli elettroni del NADPH sono trasferiti tramite i citocromi in un ordine preciso, ossia aumentando il potenziale ossidoriduttivo (gradiente crescente), permettendo la spontaneità del passaggio.

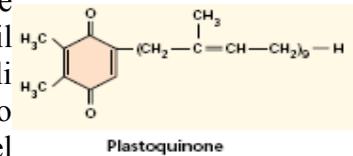
Anche nel cloroplasto avviene lo stesso meccanismo: gli elettroni viaggiano dalla feofitina alla plastocianina secondo un potenziale ossidoriduttivo crescente, e l'energia liberata è utilizzata per generare ATP. Quindi la luce interviene a livello dei centri di reazione P680 e P700, nei quali l'energia solare è utilizzata per compiere un salto di potenziale ossidoriduttivo e formare una molecola di NADPH; NADPH e ATP sono perciò i prodotti del processo fotosintetico.



Nel fotosistema 2 gli elettroni sono ceduti alla feofitina ed in seguito al plastoquinone, viaggiando secondo il gradiente di potenziale ossidoriduttivo; nel P700 gli elettroni sono energizzati e ceduti alla ferredossina. L'energia è trasformata in un gradiente di potenziale elettrochimico, ossia un gradiente di ioni H^+ , il quale permette attraverso la chemiosmosi la produzione di ATP da parte delle ATP sintasi.

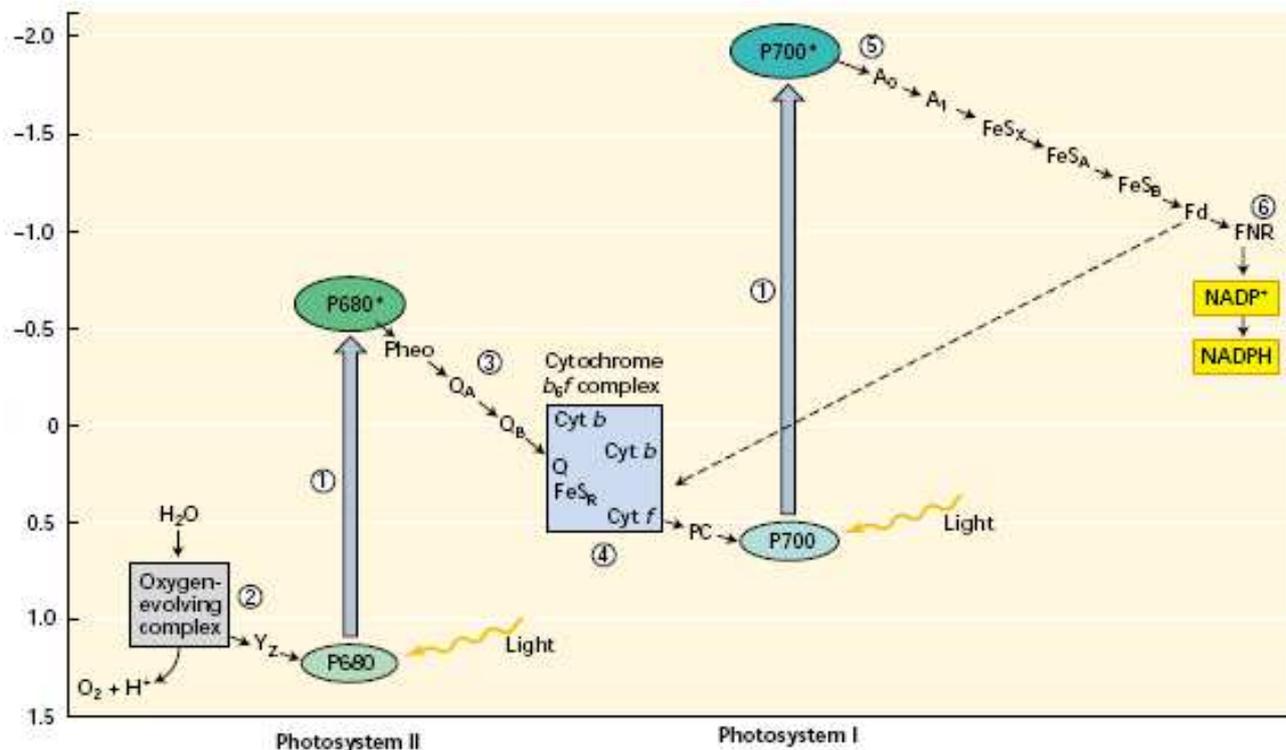
IL PSII

Il fotosistema 2 è il centro di reazione che utilizza gli elettroni derivanti dalla luce per fotolizzare l'acqua; coinvolte nell'ossidazione dell'acqua ci sono le proteine D1 e D2 che legano il P680, la feofitina ed il plastoquinone, collegando il fotosistema 2 alla catena intermedia successiva che trasferirà gli elettroni al fotosistema 1, il tutto senza consumo di energia ma secondo il gradiente di potenziale ossidoriduttivo; anzi la spontaneità del passaggio genera un gradiente protonico che verrà sfruttato dalle ATP-sintasi della membrana del cloroplasto per sintetizzare ATP (chemioosmosi).



La *proteina D1* ha molti domini transmembrana ed è esposta per la maggior parte nel lume del tilacoide (parte carbossiterminale) e una piccola porzione si affaccia nello stroma; D1 possiede un residuo di tirosina coinvolta nell'ossidazione dell'acqua, permesso dalla presenza degli ioni manganese i quali liberano i protoni ed elettroni dell'acqua: gli elettroni liberati sono trasferiti, tramite il residuo di tirosina della proteina D1, alla feofitina e plastoquinone legati al PSII. Lo ione manganese è ancorato ad alcune proteine situate nel centro di reazione; il *citocromo b559* permette invece l'assemblaggio corretto delle proteine del centro di reazione: quindi questa, insieme ad altre proteine, seppur non intervenendo nel processo fotosintetico, permette il corretto funzionamento del centro di reazione.

Le proteine del PSII coinvolte nell'ossidazione dell'acqua hanno un peso molecolare di 33, 23 e 17 kDa.



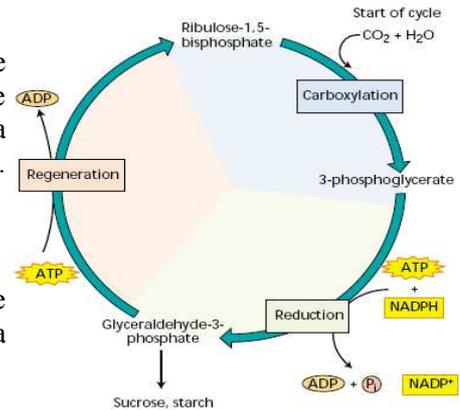
Il P680 cede gli elettroni al P700 che ha un potenziale ossidoriduttivo più positivo (quindi è un ossidante più forte) per poi cedere alla fine gli elettroni al NADP⁺ che diverrà NADPH.

Quindi nello schema Z sono presenti due ossidanti principali: il primo che ossida l'acqua ed il P700; non c'è altro che un passaggio di elettroni dall'acqua al NADP⁺, ossia trasformazione di energia solare in energia chimica.

In un esperimento sono stati dati quanti di luce ad una cellula: dopo 3 flash in un sistema al buio si osserva evoluzione di ossigeno, da H₂O a O₂, in seguito solo dopo ogni quarto flash si osserva quest'evoluzione, ed in seguito il sistema raggiunge un plateau. La spiegazione consiste nella presenza di 4 stati successivi di ossidazione, in cui servono 4 flash per completare un ciclo e portare all'evoluzione dell'ossigeno; nella condizione di buio si parte dallo stato S1, quindi servono solo 3 flash per raggiungere lo stato S4 in cui l'ossigeno evolve. Fondamentale è il ruolo dello ione manganese, il quale si lega ad alcuni amminoacidi della proteina D1 e necessita anche di calcio, ossigeno e cloruro; il manganese funge da accumulatore di carica (il manganese ha una struttura a *cluster*).

LE REAZIONI AL BUIO

La fase luminosa porta alla produzione di NADPH ed ATP che verranno utilizzati nelle reazioni al buio per permettere la fissazione della CO₂ sotto forma di zuccheri nello stroma del cloroplasto: la Rubisco permette la fissazione di una molecola di CO₂ su un pentoso. Per ogni triosofosfato prodotto sono usati 9 ATP e 3 NADPH.

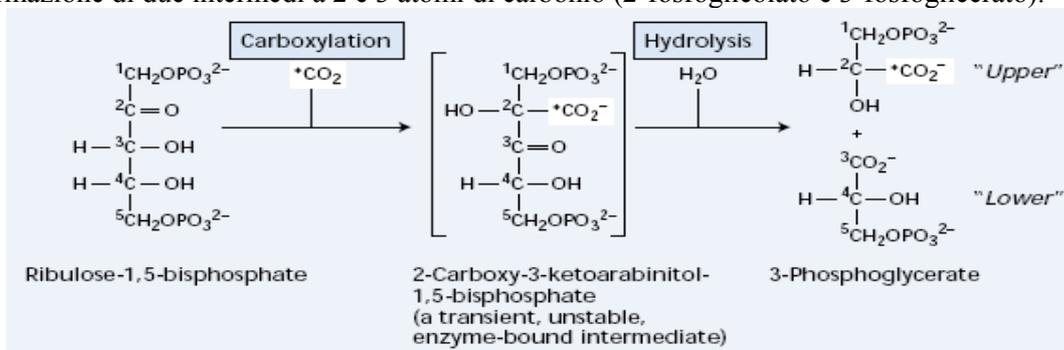


IL CICLO DI CALVIN

Calvin scoprì i vari intermedi di questo ciclo miscelando delle foglie con etanolo caldo e separando tutti i composti tramite una cromatografia bidimensionale su carta.

Il ciclo di Calvin si compone di tre fasi:

- **Carbossilazione:** per formare una nuova molecola di trioso fosfato sono necessarie tre molecole di CO₂. La Rubisco catalizza l'entrata dell'anidride carbonica sul carbonio 2 generando un intermedio instabile, che rompendosi dà due molecole di 3-fosfoglicerato. Se a livello del carbonio 2 reagisce l'ossigeno la pianta subisce un danno data la diminuita efficienza del processo, portando la formazione di due intermedi a 2 e 3 atomi di carbonio (2-fosfoglicolato e 3-fosfoglicerato).



- **Riduzione:** la funzione carbossilica del 3-fosfoglicerato è ridotta ad aldeide a causa della fosforilazione del gruppo carbossile; è comunque uno zucchero riducente sebbene a soli 3 atomi di carbonio. Le reazioni che subiscono gli zuccheri non necessitano di apporto energetico.
- **Rigenerazione:** tramite numerose reazioni si rigenera il ribuloso 1,5 difosfato che si unirà ad un'altra molecola di anidride carbonica.

Le uniche due reazioni in cui è consumata energia sono la carbossilazione e la rigenerazione, con una spesa totale di 2 ATP.

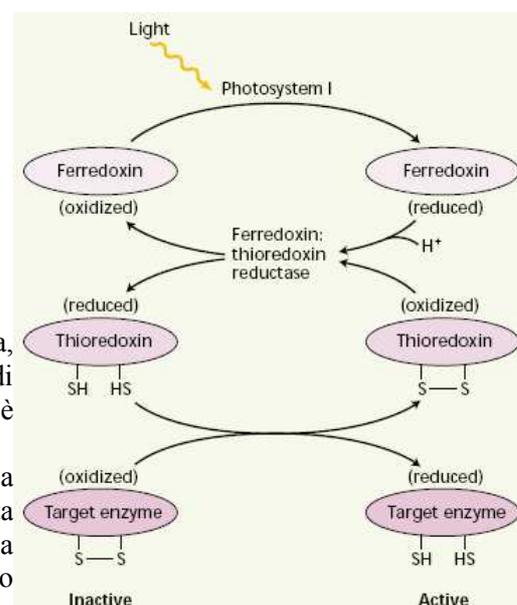
Molti enzimi sono regolati dalla luce, in particolare:

1. Rubisco
2. NADP:gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi
3. Fruttosio-1,6-bisfosfatasi
4. Sedoheptulose-1,7-bisfosfatasi
5. Ribulose-5-fosfato chinasi

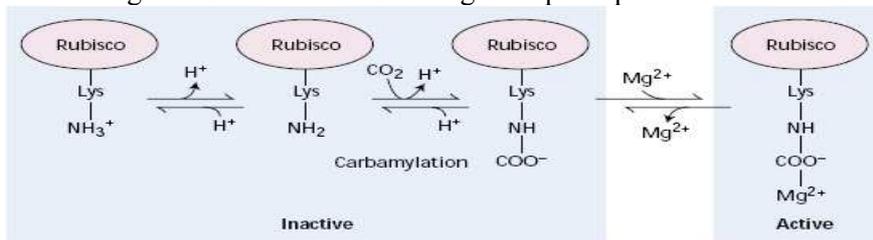
Gli ultimi 4 sono regolati dal sistema ferredoxina-tioredoxina, regolato dalla ferredoxina riduttasi, che presenta un sistema di ponti disolfuro regolati dalla luce. La Rubisco (gene *rbcs*) è regolata dalla rubisco attivasi.

La ferredoxina ossidata durante la traslocazione elettronica operata dal fotosistema riduce la tioredoxina, la quale presenta nello stato ossidato un ponte disolfuro. Nello stato ridotto la tioredoxina riduce i ponti disolfuro dell'enzima bersaglio, il tutto grazie alla capacità di cisteine vicine spazialmente di formare un ponte disolfuro se ridotte.

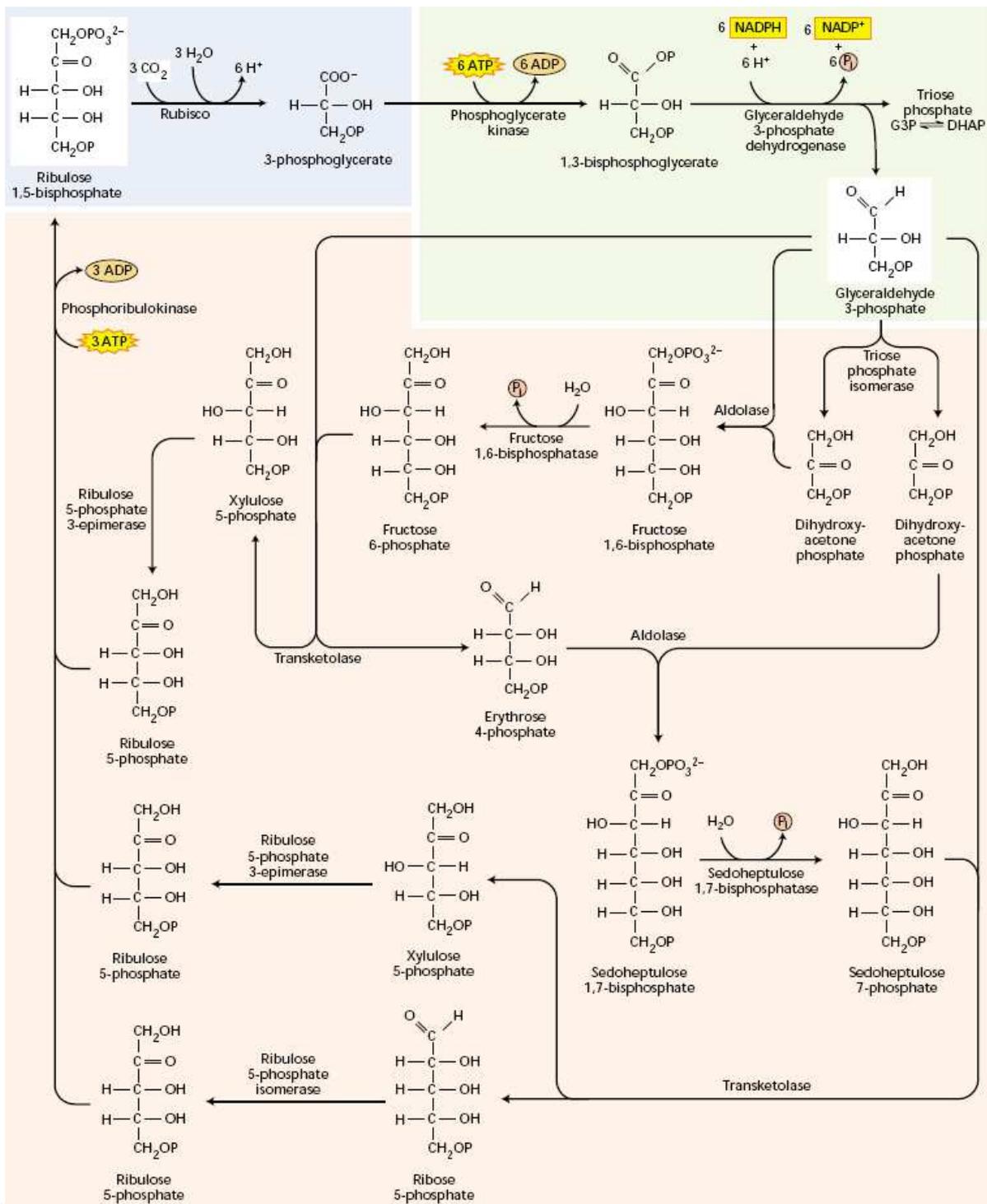
La disattivazione dell'enzima avviene grazie all'ossidazione operata anche dall'ossigeno; in sostanza la ferredoxina ridotta in condizioni di luce è in grado di ridurre la tioredoxina.

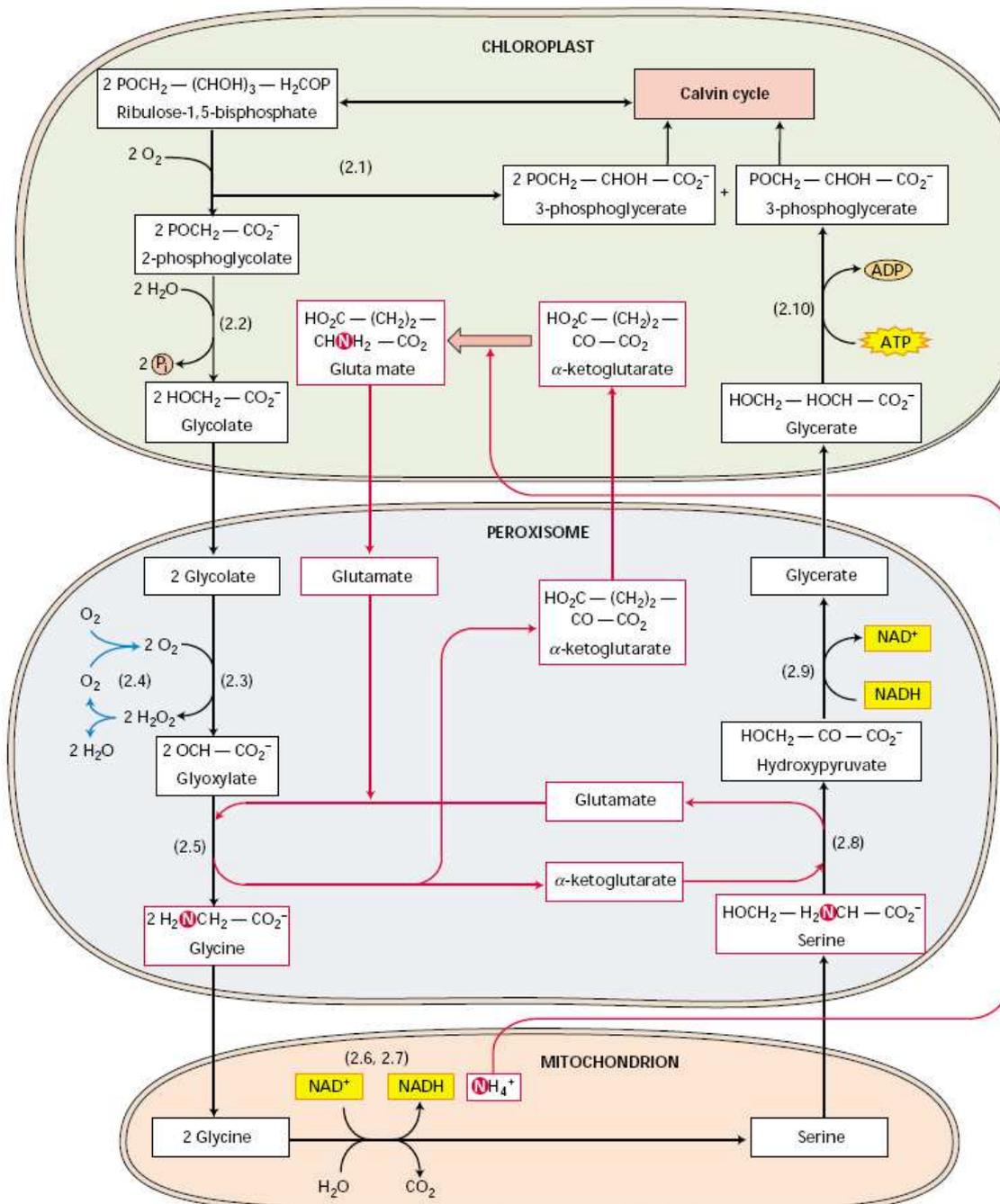


La Rubisco attivasi è in grado di attivare l'enzima Rubisco tramite la rimozione del ribulosio difosfato legato all'enzima inattivo: il ribulosio difosfato agisce infatti da inibitore. La Rubisco che deriva dalla rimozione del ribulosio difosfato non è ancora completamente attiva, ma richiede una ulteriore carbammilazione della lisina (legame della CO₂), impedita proprio dal legame del Ribulosio difosfato. L'enzima Rubisco così attivato si lega tramite un legame ionico ad uno ione magnesio per espletare la sua funzione.



LA FOTORESPIRAZIONE





La *fotospirazione* comporta l'unione di un ossigeno molecolare al posto di una molecola di anidride carbonica, il tutto catalizzato dall'enzima Rubisco, portando alla formazione di un composto a 2 (fosfoglicolato) e di un composto a 3 atomi di carbonio (fosfoglicerato). La reazione (svantaggiosa per la pianta) avviene soprattutto ad alte temperature (> 35°), quando la concentrazione relativa di anidride carbonica disciolta nella cellula diminuisce più rapidamente della concentrazione relativa di ossigeno molecolare sempre disciolto nella cellula, quindi aumenta la concentrazione di ossigeno. L'ammontare del gas disciolto nell'acqua è proporzionale alla sua pressione parziale; la relazione è descritta dalla *legge di Haw*:

$$[uM] = P_{\text{gas}} \alpha 10^6 / V_0$$

Il coefficiente α indica la quantità di gas assorbita dal liquido alla pressione standard di un'atmosfera, ma diminuisce all'aumentare della temperatura.

Ad alte temperature quindi la Rubisco catalizza la reazione ossigenasica portano alla formazione del fosfoglicolato a 2 atomi di carbonio, che deve essere convertito in 3-fosfoglicerato per generare uno zucchero a 6 atomi di carbonio. La fotorespirazione avviene in 3 compartimenti:

- Cloroplasto: la reazione ossigenasica determina la creazione di una molecola di 3-fosfoglicerato e una di 2-fosfoglicolato; quest'ultima deve passare nei compartimenti successivi per generare un'altra molecola di 3-fosfoglicerato.
- Perossisoma: il glicolato è trasformato in gliossilato. L'aldolasi trasforma la funzione CH_2OH in una funzione aldeidica consumando ossigeno e producendo acqua ossigenata, potenzialmente dannosa e quindi rimossa dall'azione della catalasi contenuto in cristalli nei perossisomi (in questi organelli rappresenta fino al 25% del contenuto). Il gliossilato subisce una reazione di transamminazione in cui la funzione aldeidica è amminata da una transamminasi, generando l'amminoacido glicina. In una reazione di *transamminazione*, un amminoacido ed un chetoacido si scambiano gruppi amminici: in questo caso l'amminoacido donatore è la serina o il glutammato. La glicina migra nel mitocondrio.
- Mitocondrio: la glicina decarbossilasi unendo due glicine genera una serina. Una glicina, privata di gruppo carbossilico e amminico, funge da donatore di un gruppo CH_2 che si aggancia alla glicina accettore. I coenzimi della glicina decarbossilasi sono piridossalfosfato e metilentetraidrofolato, i quali concorrono nella traslocazione del frammento monocarbonioso sulla glicina accettrice; il piridossalfosfato in particolare permette la perdita dell'anidride carbonica (decarbossilazione); il frammento che ne rimane reagisce con una cisteina che si riduce e permette la deamminazione; il frammento monocarbonioso rimanente è traslocato dal tetraidrofolato (il quale generalmente trasloca CH_3 , CH_2 e CH).

In questa reazione quindi è liberata CO_2 (ecco perchè la pianta "respira") ed è formata ammoniacca, tossica, che è rimossa con grande consumo di energia nel cloroplasto, nel quale NH_3 si complessa con l' α -chetoglutarato dando glutammato, il tutto catalizzato dalla glutammina sintasi e dalla glutammina α -chetoglutarato amminotransferasi con consumo di ATP e ferredoxina ridotta, prodotti durante le reazioni alla luce. La glutammina α -chetoglutarato amminotransferasi è attiva anche nelle piante che formano simbiosi con batteri nitrificanti o che vivono in terreni ricchi di azoto, in quanto ne permette l'organizzazione (sempre consumando ATP). La glutammina sintasi invece è specifica della fotorespirazione.

La fotorespirazione è evidentemente molto costosa in termini energetici, pertanto è certamente un danno per la pianta che la compie.

La serina prodotta nel mitocondrio passa nel perossisoma, dove è deamminata da una transamminasi nel corrispondente chetoacido chiamato idrossipiruvato, ridotto a glicerato ad opera del NADH. Nel cloroplasto il glicerato è fosforilato a 3-fosfoglicerato con consumo di ATP, mentre nel perossisoma e mitocondrio non avviene altro che una ossidazione e riduzione del NADH e NAD^+ , senza consumo di energia.

I punti energeticamente dispendiosi della fosforilazione sono l'assimilazione del gruppo ammonio e la fosforilazione del glicerato.

Per ogni molecola di anidride carbonica evoluta (quindi per ogni atto respiratorio) sono necessarie due molecole di Ribulosio difosfato che interagiscano con l'ossigeno, poiché sono necessarie due glicine per dare una serina; le glicine a loro volta derivano da due molecole di fosfoglicolato. Il consumo di ossigeno ammonta a 3 molecole di O_2 .

Il problema derivante dalla fotorespirazione non esisteva agli albori, quando l'evoluzione creò l'apparato fotosintetico e la Rubisco in particolare: quest'enzima svolge tanto efficientemente il suo lavoro che non sono stati selezionati mutanti che potessero ovviare al problema; difatti l'ossigeno fu creato dagli organismi fotosintetici stessi. Inoltre la fotorespirazione si riscontra soltanto negli organismi che vivono negli ambienti caldi, quindi non c'è stata una gran pressione selettiva per risolvere questo difetto della Rubisco.

L'ossigeno prodotto dagli organismi fotosintetici ha contribuito alla formazione dello strato di ozono atmosferico.

Le piante che vivono in ambienti caldi sono quindi svantaggiate in termini energetici e di produzione di nutrienti; molte hanno evoluto diverse strategie per ridurre i costi della fotorespirazione e dell'attività ossigenasica della Rubisco. Ad esempio le piante C_4 sequestrano la Rubisco in un ambiente dove la concentrazione dell'ossigeno è molto bassa (cellule della guaina del fascio), pertanto il ciclo di Calvin avverrebbe in un ambiente separato dalla fase PS2 (cellule del mesofillo); l'anidride carbonica è trasportata e "buttata" direttamente sulla Rubisco.

Le piante che vivono nel deserto, come le *Crassulacee*, hanno invece un metabolismo CAM, in cui l'enzima e l'ossigeno non sono separati spazialmente ma temporalmente, poiché gli stomi di giorno sono chiusi, altrimenti perderebbero acqua. Di notte l'anidride carbonica entra nella pianta, è accumulata sotto forma di *acido malico* nel vacuolo e di giorno (quando gli stomi sono chiusi) è utilizzata per compiere la fotosintesi; in questo modo le grassulacee limitano i danni sia della fotorespirazione che della traspirazione.

CICLO C₄

Ciclo tipico di piante che vivono per la maggior parte a temperature maggiori di 35°, come il mais e la canna da zucchero. Il nome C₄ cell deriva da una reazione aggiuntiva che permette di traslocare l'anidride carbonica carbossilando il fosfoenolpiruvato, e trasportandola dalle cellule del mesofillo alle cellule della guaina del fascio, le quali sono in connessione attraverso plasmodesmi. L'intermedio a 4 atomi di carbonio rilascia l'anidride carbonica direttamente sull'enzima Rubisco del ciclo di Calvin; l'intermedio a 3 atomi di carbonio risultante torna nelle cellule del mesofillo per ricominciare il ciclo e fungere da navetta per l'anidride carbonica.

Ci sono differenti tipi di metabolismo C₄:

- **NADP:malico**: la CO₂ nelle cellule del mesofillo sotto forma di ione bicarbonato reagisce con il fosfoenolpiruvato dando ossalacetato, che si trasforma in malato e solo dopo è in grado di traslocare, attraverso i plasmodesmi, nelle cellule della guaina del fascio; qui viene riossidato e decarbossilato dall'enzima malico, dando piruvato. La CO₂ decarbossilata è utilizzata dalla Rubisco per il ciclo C₃.

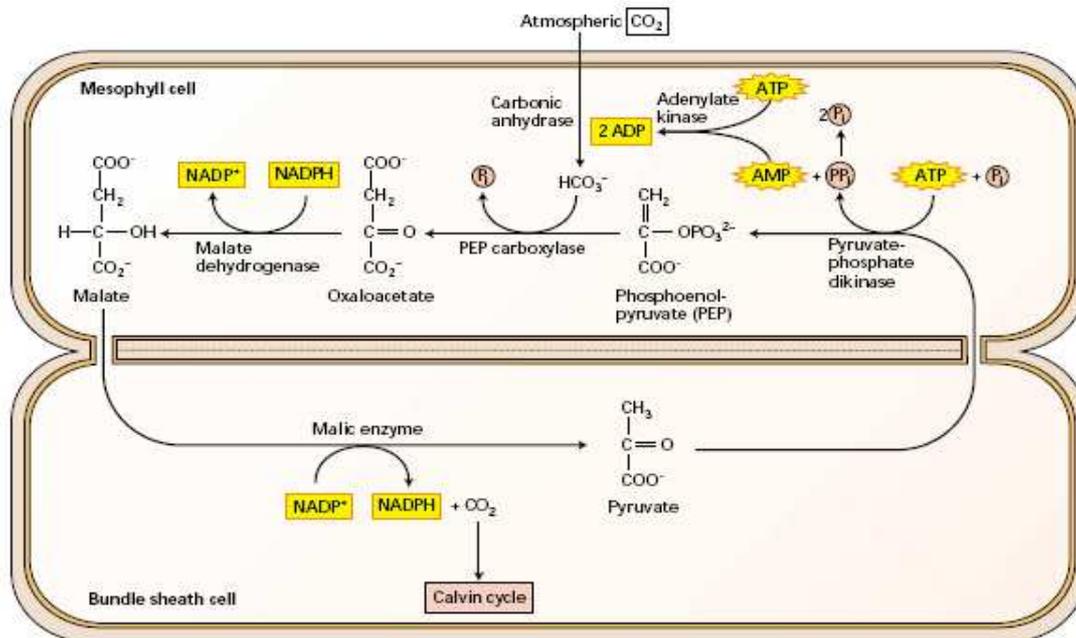
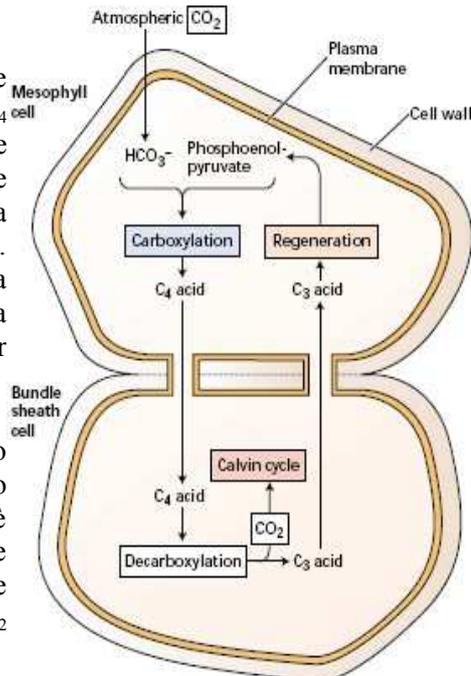


FIGURE 8.11 The C₄ photosynthetic pathway. The hydrolysis of two ATP drives the cycle in the direction of the arrows, thus pumping CO₂ from the atmosphere to the Calvin cycle of the chloroplasts from bundle sheath cells.

- **variante NAD-malico**: l'ossalacetato si trasforma in acido aspartico in seguito ad amminazione; può così passare dalle cellule del mesofillo alle cellule della guaina del fascio, dove è deamminato di nuovo ad ossalacetato, diventa acido malico, per essere riossidato e decarbossilato dall'enzima NAD⁺ malico. Lo shuttle non è mai un chetoacido ma sempre un amminoacido come aspartato o alanina; il piruvato diventa alanina traslocata nelle cellule del mesofillo, dove l'alanina ridiventa piruvato che si trasforma in fosfoenolpiruvato, substrato della PEP carbossilasi.
- **Tipo fosfoenolpiruvato carbossichinasi**: l'ossalacetato rigenera direttamente il fosfoenolpiruvato, è la variante più semplice.

REGOLAZIONE

La piruvato difosfato dichinasi catalizza la reazione del piruvato che reagisce con ATP e fosfato per dare fosfoenolpiruvato, AMP e pirofosfato. L'enzima è attivo di giorno quando fosforilato su una treonina specifica. La fosforilazione di questa treonina è data da una molecola regolatoria che utilizza un fosfato dell'ADP. Invece la defosforilazione notturna non è compiuta dallo stesso enzima, bensì da una molecola di fosfato che diviene così pirofosfato. Di notte l'enzima è defosforilato e quindi inattivo, di giorno è fosforilato ed attivo. L'enzima si trova nelle cellule del mesofillo.

Non c'è consumo di coenzimi ridotti nella fotorespirazione, ma la loro semplice traslocazione; invece c'è consumo di ATP, ossia 2 ATP per ogni CO₂ incorporata nel fosfoenolpiruvato. Inoltre sono anche consumate 2 ferredossine.

Phosphoenolpyruvate + H ₂ O + NADPH + CO ₂ (mesophyll)	→	malate + NADP ⁺ + P _i (mesophyll)
Malate + NADP ⁺	→	pyruvate + NADPH + CO ₂ (bundle sheath)
Pyruvate + P _i + ATP	→	phosphoenolpyruvate + AMP + PP _i (mesophyll)
PP _i + H ₂ O	→	2 P _i (mesophyll)
AMP + ATP	→	2ADP
Net: CO ₂ (mesophyll) + ATP + 2 H ₂ O	→	CO ₂ (bundle sheath) + 2ADP + 2 P _i

Cost of concentrating CO₂ within the bundle sheath cell = 2 ATP per CO₂

Note: As shown in reaction 1 of Table 8.3, the H₂O and CO₂ shown in the first line of this table actually react with phosphoenolpyruvate as HCO₃⁻.
P_i and PP_i stand for inorganic phosphate and pyrophosphate, respectively.

Dato il loro maggior consumo di ATP, le piante con metabolismo C₄ sono quindi svantaggiate in climi temperati rispetto alle altre piante, ma nel loro habitat sono invece favorite e sopravvivono senza grossi problemi.

PIANTE CAM

La PEP carbossilasi accumula anidride carbonica sotto forma di acido malico di notte, quando la pianta tiene aperti gli stomi (di notte la disidratazione è minore). L'acido malico è accumulato nei vacuoli divenendo così acidissimi, da qui il nome *Metabolismo Acido delle Crassulacee*. Di giorno l'acido malico fuoriesce dal vacuolo ed è decarbossilato ed ossidato a piruvato, liberando l'anidride carbonica che verrà utilizzata nel ciclo di Calvin. C'è quindi una separazione temporale in questo metabolismo, mentre in quello precedente era presente una separazione spaziale dei due momenti. E' evidente che, mentre nel metabolismo C₄ il sistema funziona sempre di giorno, dove c'è un afflusso continuo di CO₂ dall'atmosfera, in questo metabolismo CAM è necessario un grande accumulo di anidride carbonica di notte, per poterla utilizzare di giorno. In queste piante è stato osservato che l'acido malico non solo si accumula nel vacuolo, ma anche nel mitocondrio divenendo prima acido fumarico ed in seguito acido malico.

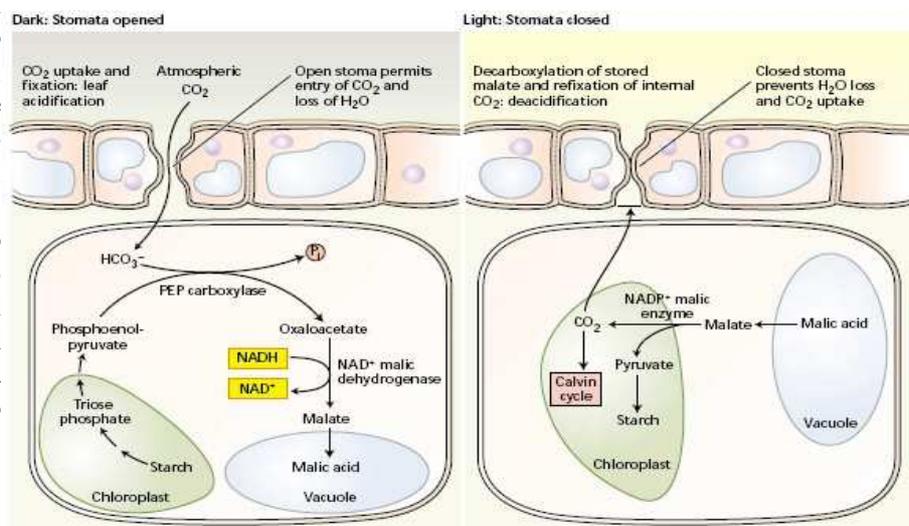


FIGURE 8.12 Crassulacean acid metabolism (CAM). Temporal separation of CO₂ uptake from photosynthetic reactions: CO₂ uptake and fixation take place at night, and decarboxylation and refixation of the internally released CO₂ occur during the day. The adaptive advantage of CAM is the reduction of water loss by transpiration, achieved by the stomatal opening during the night.

REGOLAZIONE

La PEP carbossilasi deve essere regolata perchè deve funzionare solo di notte, altrimenti di giorno genererebbe un ciclo futile entrando in competizione con la Rubisco del ciclo di Calvin, poiché entrambi gli enzimi catalizzano una reazione di carbossilazione sottraendo CO₂. Nelle piante CAM la PEP carbossilasi è attivata di notte tramite la fosforilazione di una serina operata dall'enzima PEP-carbossilasi chinasi che si attiva di notte e aggiunge un gruppo fosfato alla serina sottraendola all'ATP e lasciando ADP. Di giorno il gruppo fosfato è idrolizzato attivando l'enzima.

Nelle piante CAM la fosforilazione della PEP-carbossilasi la rende insensibile al malato (che funge da inibitore) in condizioni di buio (nelle piante C₄ questo processo avviene di giorno), mentre la defosforilazione della PEP carbossilasi avviene di giorno rendendola sensibile al malato e quindi inattivandola. Quindi lo stesso enzima funziona di giorno nelle piante C₄ e di notte nelle piante CAM (ritmo circadiano giorno-notte); in entrambi i tipi di piante la PEP carbossilasi è inibita dal malato ed attivata dal glucosio 6-fosfato.

Un modello prevede l'attivazione della PEP carbossilasi-chinasi in seguito all'aumentata concentrazione di 3-fosfoglicerato con conseguente aumento della concentrazione del calcio citosolico, che innesca l'attivazione dell'enzima regolatore.

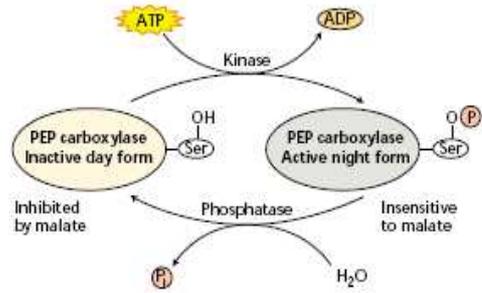
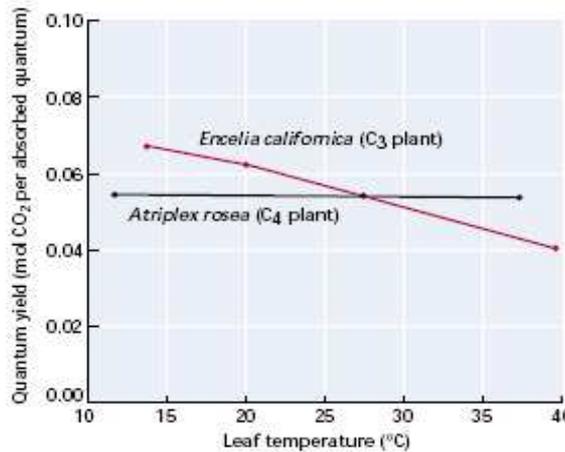


FIGURE 8.13 Diurnal regulation of CAM phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase. Phosphorylation of the serine residue (Ser-OP) yields a form of the enzyme which is active during the night and relatively insensitive to malate. During the day, dephosphorylation of the serine (Ser-OH) gives a form of the enzyme which is inhibited by malate.

EFFICIENZA DELLE PIANTE C₃ E C₄

Nelle piante C₃ all'aumentare della temperatura la resa quantica si abbassa moltissimo, sebbene a temperatura ottimali sia molto alta, raggiungendo un massimo di 0.08. Le piante C₄, pur mantenendo una resa quantica minore a temperatura considerate ottimali per le piante C₃ (dato il maggior costo di fissazione di una molecola di anidride carbonica) hanno il pregio di mantenere costante la resa quantica anche ad alte temperature. La temperatura in cui le piante C₄ divengono più efficienti delle piante C₃ si aggira intorno ai 35/ 40°.

La fotorespirazione abbassa la resa quantica perchè invece di fissare CO₂ la rilascia!



LA FISSAZIONE DEL CARBONIO

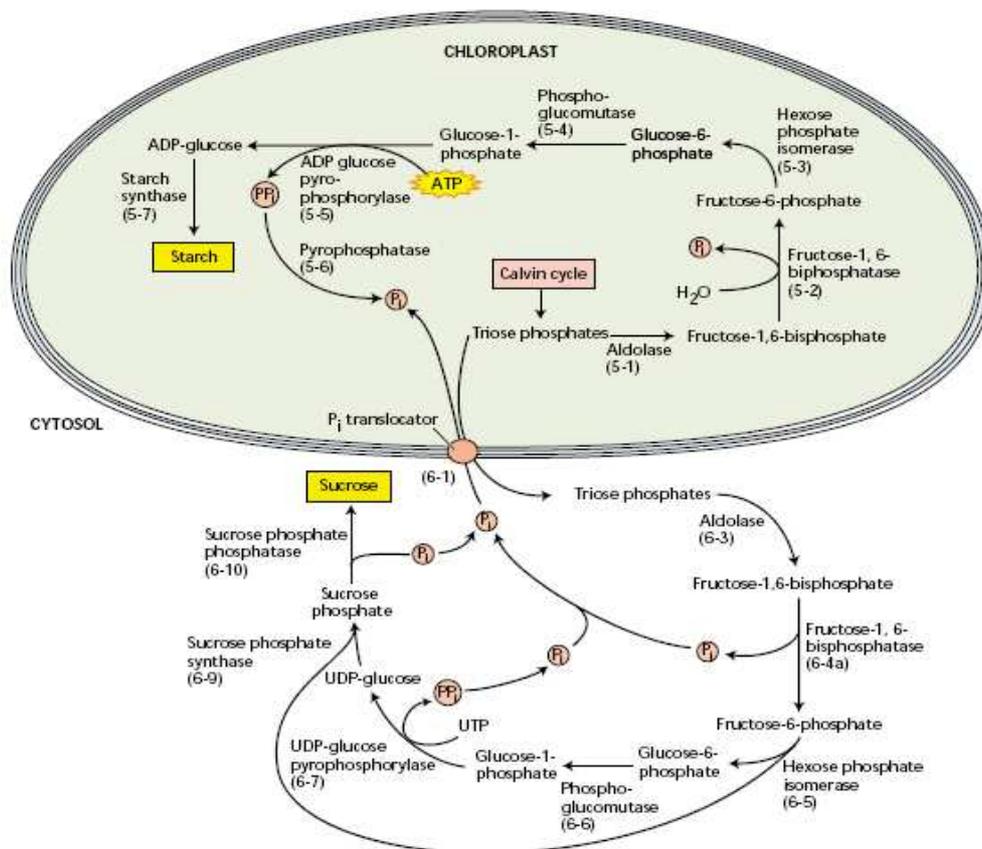


FIGURE 8.14 The syntheses of starch and sucrose are competing processes that occur in the chloroplast and the cytosol, respectively. When the cytosolic P_i concentration is high, chloroplast triose phosphate is exported to the cytosol via the P_i in exchange for P_i , and sucrose is synthesized. When the cytosolic P_i concentration is low, triose phosphate is retained within the chloroplast, and starch is synthesized. The numbers facing the arrows are keyed to Tables 8.5 and 8.6.

I prodotti di riserva delle piante sono accumulati inizialmente nei cloroplasti (dove vengono prodotti) sotto forma di *amido primario*, e dopo traslocati negli amiloplasti tramite lo zucchero saccarosio (che libera glucosio 6-fosfato), trasportato tramite il floema ai tessuti che necessitano di energia. Negli amiloplasti i granuli di amido fungono anche da sensori della gravità.

I triosifosfato prodotti devono essere incanalati o nella via che porta alla sintesi di saccarosio nel citosol, o nella via che porta alla formazione di amido secondario nel cloroplasto; il tutto è regolato da un antiporto triosifosfato-fosfato presente nella membrana esterna del cloroplasto: il segnale è dato dalla concentrazione citosolica di fosfato, negli amiloplasti invece il segnale è dato dalla concentrazione di glucosio. Se il fosfato nel citosol è alto i triosifosfato sono traslocati nel citosol per dare saccarosio. Negli amiloplasti il saccarosio è scisso in fruttosio e glucosio, e quest'ultimo è direttamente attivato tramite il legame all'ATP e quindi aggiunto alla catena di amido in crescita.

In entrambe le vie i triosifosfato si legano dando l'esoso fruttosio 1,6-bifosfato, il quale verrà trasformato nel glucosio da una isomerasi, ed in seguito attivato nella funzione riducente con l'unione ad un glicoside fosfato, per permette la formazione di un legame glicosidico.

SINTESI DI AMIDO

L'aldolasi catalizza la formazione di fruttosio 1,6-bifosfato da idrossiacetone fosfato e gliceraldeide 3-fosfato. Il fruttosio 1,6-bifosfato verrà defosforilato a fruttosio 6-fosfato dalla fosfatasi, nel primo punto di regolazione. Queste reazioni sono in comune anche nella via biosintetica del saccarosio, ma gli enzimi, sebbene catalizzino le stesse reazioni, sono leggermente diversi e si chiamano *isoenzimi*: ad esempio la regolazione della fruttosio 1,6 bifosfatasi è data dalla tioredoxina, insensibile al fruttosio 2,6-bifosfato.

In seguito l'isomerasi trasforma il fruttosio 6-fosfato in glucosio 6-fosfato, ed in seguito la mutasi lo trasforma in glucosio 1-fosfato, che verrà attivato nel carbonio 1 da un ATP che perderà un pirofosfato generando un ADP-glucosio. Il pirofosfato generato verrà scisso in due gruppi fosfato, spostando a destra la

reazione. La pirofosforilasi è stimolata dal 3-fosfoglicerato ed inibita dal fosfato. L'ADP-glucosio in seguito si lega alla catena in crescita di amido.

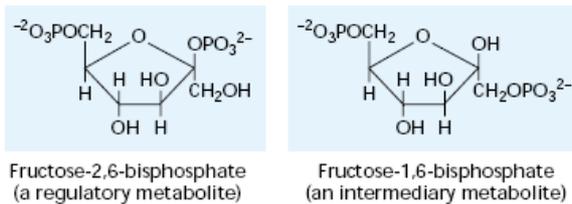
In generale i trisfosfato in eccesso stimolano la sintesi dell'amido, mentre i fosfati in eccesso la inibiscono. L'amido è presente principalmente in due forme:

- **amilosio**: omopolimero di glucosio legato da legami α 1-4; questo differente tipo di legame permette all'amilosio di avere una struttura completamente diversa da quella planare della cellulosa (determinata dai legami β 1-4), ossia l'amilosio assume una forma elicoidale priva di ramificazioni.
- **amilopectina**: la struttura è simile all'amilosio, ma sono presenti punti di ramificazione α 1-6 che legano il carbonio 6 di un glucosio della catena principale all'estremità riducente (carbonio 1) di una ramificazione; l'estremità libera di una ramificazione è quindi il carbonio 4, non riducente. L'amilopectina non è soggetta a precipitazione, dato che essendo ramificata crea maggiori legami ad idrogeno al suo interno. L'amilopectina per formarsi necessita dell'enzima ramificatore, che scinde un legame α 1-4 di una molecola di amido per unire l'estremità libera ad un carbonio 6 di un glucosio di un'altra molecola di amilosio, formando un legame α 1-6 e quindi una molecola di amilopectina. A seconda dell'attività dell'enzima ramificatore si forma una amilopectina poco o molto ramificata.

Negli amiloplasti le molecole di amilopectina sono generalmente in una conformazione cristallina donata dai legami ad idrogeno tra gli ossidrili liberi. L'acqua ha poco accesso, ma se l'acqua riesce ad entrare nella struttura, il cristallo si rigonfia e, scaldando il tutto, l'amilosio si separa dall'amilopectina. Se la stessa miscela è raffreddata, i legami ad idrogeno si formano anche tra amilopectina ed amilosio mantenendo intrappolata l'acqua al loro interno, quindi la struttura presenta un volume maggiore rispetto a quello iniziale.

SINTESI DI SACCAROSIO

I passaggi sono simili a quelli della sintesi dell'amido, ma avvengono nel citosol da isoenzimi; la regolazione della fosfatasi è data dal fruttosio 2,6-bisfosfato. L'attivazione del glucosio non è data dal legame con l'ATP ma con l'UTP. L'UDP-glucosio reagendo con fruttosio darà saccarosio 6-fosfato, disaccaride non riducente. Il saccarosio 6-fosfato è defosforilato per essere trasportato al di fuori della cellula ed essere così inviato ai tessuti che ne necessitano; è importante che il saccarosio sia uno zucchero non riducente, in quanto non reagirà con le altre molecole nel corso della sua traslocazione attraverso il floema.



Poiché la sintesi di amido e saccarosio sono in conflitto tra loro, è necessaria una raffinata regolazione che consenta alla cellula del mesofillo di garantire un'adeguata quantità di zuccheri sia per se stessa che per il resto dell'organismo. La molecola regolatrice è il fruttosio 2,6-bisfosfato, che non rappresenta nessun intermedio delle reazioni precedenti ma

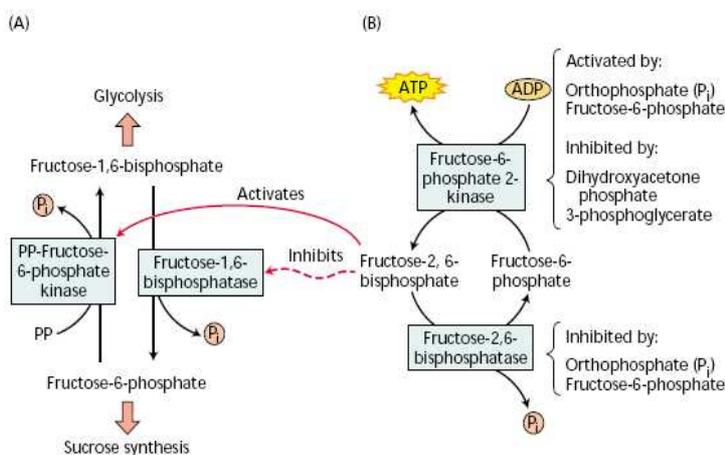


FIGURE 8.16 Regulation of the cytosolic interconversion of fructose-6-phosphate and fructose-1,6-bisphosphate. (A) The key metabolites in the allocation between glycolysis and sucrose synthesis. The regulatory metabolite fructose 2,6-bisphosphate regulates the interconversion by inhibiting the phosphatase and activating the kinase, as shown. (B) The synthesis of fructose-2,6-bisphosphate itself is under strict regulation by the activators and inhibitors shown in the figure.

è sintetizzato solo per esplicare la propria funzione regolatrice: la sua funzione riducente sul carbonio 2 è impegnata in un legame con un gruppo fosfato. Il fruttosio 2,6 bifosfato da una parte attiva la fosfofruttochinasi che fosforila il fruttosio 6-fosfato a fruttosio 1,6 bifosfato, e dall'altra inibisce la fruttosio 1,6 bifosfatasi, che aumenta i livelli di fruttosio 1,6-bisfosfato; l'effetto è inibire la sintesi di saccarosio data la limitata disponibilità di fruttosio 6-fosfato da legare al glucosio.

Il fruttosio 2,6 bifosfato è generato dall'enzima fruttosio 6-fosfato 2-chinasi quando la concentrazione di ortofosfati è alta; un'alta concentrazione di trisfosfato nel citosol indica una grande attività di formazione di saccarosio. La fruttosio 2,6

bifosfatasi, enzima che defosforila il fruttosio 2,6 bifosfato sul carbonio 2 generando fruttosio 6-fosfato, è inibita da ortofosfato e dal fruttosio 6-fosfato.

Nel citosol un basso rapporto triosofosfati/ fosfati stimola la fruttosio 6-fosfato 2-chinasi a produrre l'inibitore per inibire la sintesi di saccarosio.

Molti degli intermedi descritti in queste reazioni sono coinvolti anche in numerosi altri processi:

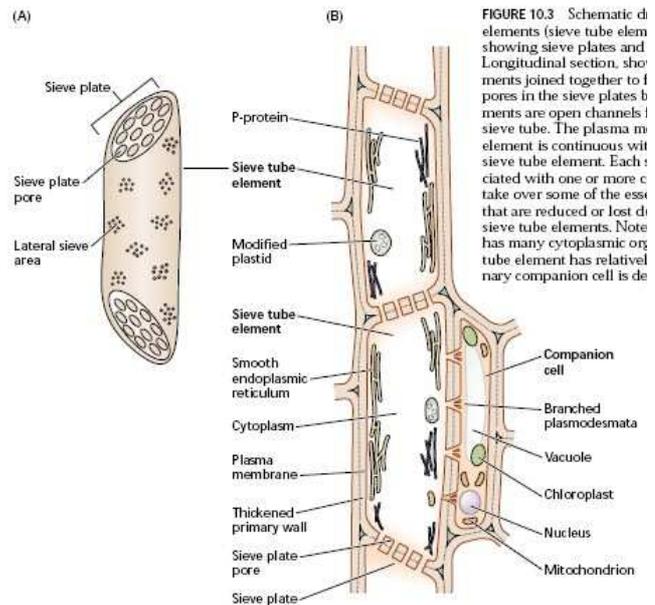
- Glucosio 6-fosfato: dà origine al fruttosio 6-fosfato ed al glucosio 1-fosfato, può legarsi all'amido, può dare saccarosio o essere coinvolto nella via dei pentosi fosfato.
- Glucosio 1-fosfato: intermedio chiave per la sintesi di amido, cellulosa o altri componenti della parete cellulare.
- Fruttosio 6-fosfato: coinvolto nella biosintesi di saccarosio e nell'attività glicolitica.

Di giorno i triosifosfato sono trasformati in saccarosio ed inviati dalle cellule fotosintetiche al resto dell'organismo per essere utilizzati come fonte energetica, o accumulati negli amiloplasti come fonte di riserva; di notte, quando la fotosintesi non avviene, il glucosio dall'amido conservato negli amiloplasti è trasformato in saccarosio ed inviato al resto dell'organismo, anche alle parti verdi che di notte non riescono a produrre triosifosfato; di notte quindi il pool di triosifosfato presenti nelle cellule deriva dalla mobilizzazione del glucosio conservato nelle cellule di riserva, prodotto di giorno quando la fotosintesi è possibile.

TRASLOCAZIONE NEL FLOEMA

I tessuti vascolari presenti nella pianta sono due:

- **Xilema:** predisposto alla traslocazione di acqua e sali minerali dalle radici al resto dell'organismo. Per svolgere questa funzione hanno caratteristiche anatomiche che permettono un'elevata velocità di flusso. Gli elementi xilematici sono cellule morte che formano lo xilema primario e secondario, a seconda di quanto sia sviluppato.
- **Floema:** atto a traslocare fotosintati dalle foglie alle altre parti della pianta non dotate di attività fotosintetica, come le radici, i frutti, le giovani foglie e in generale strutture non ancora differenziate. E' evidente quindi che, mentre nello xilema la direzione del flusso è unidirezionale dal basso verso l'alto, nel floema le direzioni sono molte. Gli elementi floematici sono cellule vitali allungate e sono collegate tra loro da plasmodesmi o piastre cribrose.
- **Cambio cribrovascolare:** tessuto posizionato tra xilema e floema, contiene cellule meristematiche che si differenzieranno in uno dei due tipi di tessuto vascolare.



Per comprendere la struttura dei vasi, fu fatto l'esperimento dell'anellatura da Malpighi alla fine del Seicento, ma solo nel 1928 ne fu data una spiegazione: la parte esterna del tronco è eliminata, si assiste ad un rigonfiamento della parte superiore e alla morte dei tessuti posizionati inferiormente al taglio. Meson e Master hanno dimostrato che nella parte rigonfia si accumulano zuccheri.

Gli elementi del floema sono:

- **cellule cribrose:** presenti nelle Gimnosperme.
- **tubi cribrosi:** presenti nelle Angiosperme.

Il modello elaborato per la traslocazione floematica delle Angiosperme non è applicabile alle Gimnosperme. Nelle Angiosperme gli elementi dei tubi cribrosi sono cellule collegate le une alle altre da aree cribrose, connessioni tra due cellule che presentano pori di 1-15 μm : l'insieme di questi pori prende il nome di *placca cribrosa*. Queste cellule non sono complete ma mancano di nucleo, microfilamenti, microtubuli, apparato di Golgi e ribosomi, non hanno quindi espressione genica e devono essere supportate dalle cosiddette *cellule compagne*, cellule normali che sostengono le cellule degli tubi cribrosi e le riforniscono di tutto ciò sia necessario alla loro sopravvivenza; sono collegate tramite plasmodesmi. Le cellule dei tubi cribrosi e le cellule compagne derivano, nelle Angiosperme, dalla stessa cellula madre. Le cellule compagne sono collegate alle cellule della *guaina del fascio* (dove vengono prodotti i fotosintati) tramite le *cellule intermedie*, le quali presentano un'elevata superficie (donata da una grande invaginazione plasmalemmatica) che consente di traslocare molto più velocemente una grande quantità di saccarosio attraverso il plasmalemma.

Nelle Gimnosperme ci sono connessioni ma non piastre, e queste connessioni sono costituite dalla membrana plasmatica che quindi ostacola il passaggio delle sostanze attraverso il tessuto floematico: l'efficienza è effettivamente minore rispetto al tessuto floematico delle Angiosperme. Le cellule di sostegno si chiamano nelle Gimnosperme *cellule albuminose*, che hanno un'origine diversa rispetto alla cellula cribrosa che sostengono.

I tessuti floematici sono mantenuti aperti dalle proteine P che formano dei sistemi microfilamentosi quando il tubo cribroso è danneggiato. Quando c'è un danno al tessuto cribroso, le proteine P ostruiscono l'apertura che permette al succo floematico di andare perduto; nella successiva fase di riparazione la stessa funzione sarà svolta dal *callosio*, omopolimero del glucosio collegato con legami β 1-3 glicosidici (il callosio è uno dei pochi polisaccaridi il cui enzima è localizzato nel plasmalemma, come la cellulosa-sintasi).

Il callosio può essere definito come:

- callosio da ferita
- callosio da dormienza (piante perenni durante l'inverno)
- callosio definitivo (cellule morenti)

TRASLOCAZIONE DEL SACCAROSIO E DEI FOTOSINTATI

Le parti della pianta che producono i fotosintati sono definite *sorgenti*, e le parti che li utilizzano sono detti *pozzi*, quindi i fotosintati si dirigono dalle sorgenti ai pozzi. Le sorgenti non solo sono le parti verdi che compiono fotosintesi

clorofilliana, ma anche i tessuti della pianta dai quali sono mobilitate le riserve di zuccheri da inviare ai pozzi. I pozzi invece sono rappresentati da radici, frutti, foglie giovani e gemme (queste ultime due non ancora in grado di svolgere una quantità di fotosintesi adeguata a soddisfare il loro e di altri fabbisogno). I pozzi possono essere ognuno diversamente famelico dall'altro, in quanto un frutto giovane richiede meno fotosintati di un frutto al massimo della maturazione, così come una foglia o gemma giovane richiede più apporti nutrizionali rispetto ad una foglia completamente sviluppata (i meristemi sono punti della pianta da cui si sviluppano foglie o radici o altri tessuti vegetali).

Il movimento dei fotosintati nel tessuto floematico può essere visualizzato principalmente attraverso la marcatura, sebbene ultimamente gli sviluppi della microscopia confocale permettano di seguire *in vivo* i movimenti dei fotosintati. Uno dei primi fotosintati ad essere studiati è stata la *melata*, secrezione prodotta

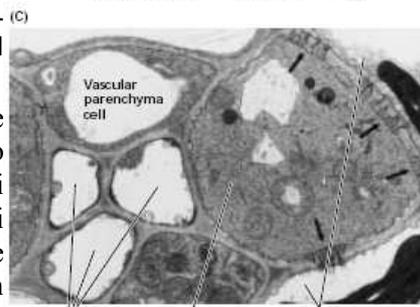
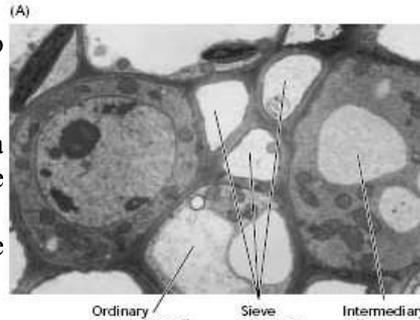
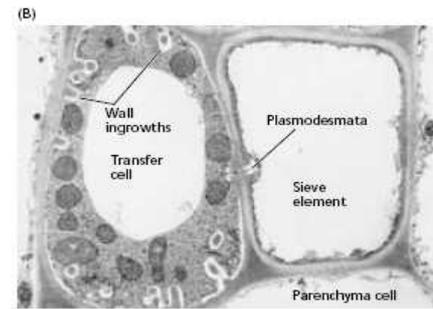
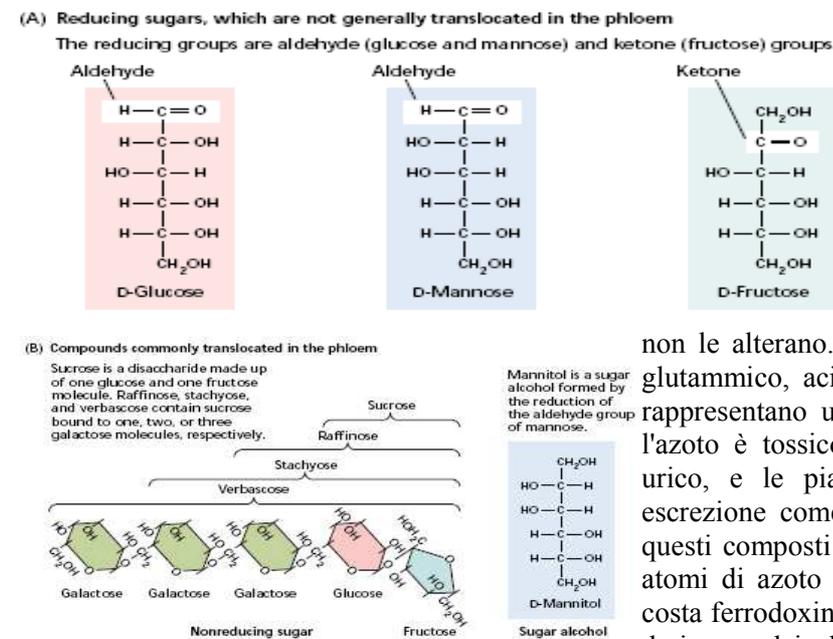


FIGURE 10.7 Electron micrographs of companion cells in minor veins of mature leaves. (A) Three sieve elements about two intermediary cells and a more lightly stained ordinary companion cell in a minor vein from *Minutulus cardinalis*. (6585 \times) (B) A sieve element adjacent to a transfer cell with numerous wall ingrowths in pea (*Pisum sativum*). (8020 \times) Such ingrowths greatly increase the surface area of the transfer cell's plasma membrane, thus increasing the transfer of materials from the mesophyll to the sieve elements. (C) A typical intermediary cell with numerous fields of plasmodesmata (arrows) connecting it to neighboring bundle sheath cells. These plasmodesmata are branched on both sides, but the branches are longer and narrower on the intermediary cell side. Minor-vein phloem was taken from heartleaf maskflower (*Aloisoa warsepewiczii*). (4700 \times) (A and C from Turgeon et al. 1993, courtesy of R. Turgeon; B from Brentwood 1978.)

dagli afidi che posseggono uno stiletto in grado di penetrare il tessuto floematico ed assorbirne i fotosintati.

In generale nel floema sono traslocati zuccheri, amminoacidi, acido organici ma poche proteine. Gli zuccheri traslocati sono tutti zuccheri non riducenti, poiché non reagiscono con le molecole e quindi

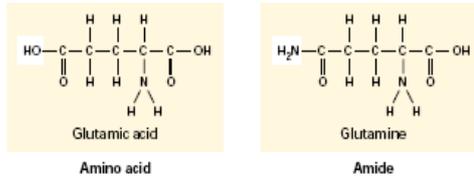
non le alterano. Le *ureidi*, come glutammina e acido glutammico, acido allantoico, allantoio e citrullina, rappresentano una forma di organizzazione dell'azoto; l'azoto è tossico sotto forma di ammoniaca o acido urico, e le piante non posseggono un sistema di escrezione come gli animali, quindi li organizzano in questi composti che riescono ad accumulare molti più atomi di azoto rispetto alla normale ammoniaca (che costa ferrodoxina e ATP). L'azoto traslocato può anche derivare dai batteri simbiotici azotofissatori che



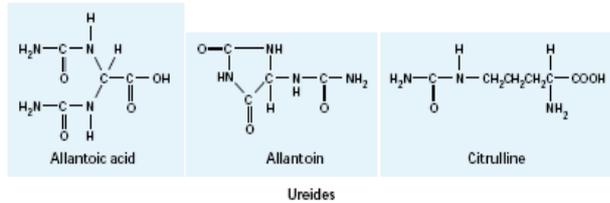
risiedono nei noduli radicali. Nelle ureidi il rapporto carbonio/ azoto è più basso.

Il trasporto floematico si divide in trasporto a breve distanza e trasporto a lunga distanza; il primo consiste nella traslocazione dei fotosintati attraverso le cellule fino al tessuto floematico, ed il secondo consiste nel movimento dei fotosintati attraverso i vasi.

Glutamic acid, an amino acid, and glutamine, its amide, are important nitrogenous compounds in the phloem, in addition to aspartate and asparagine.



Species with nitrogen-fixing nodules also utilize ureides as transport forms of nitrogen.



CARICAMENTO DEL FLOEMA

La concentrazione di fotosintati nel trasporto a breve distanza aumenta avvicinandosi ai vasi floematici, quindi il trasporto di questi fotosintati avviene contro gradiente di concentrazione, quindi implica un trasporto attivo.

Le modalità di trasporto a breve distanza sono due:

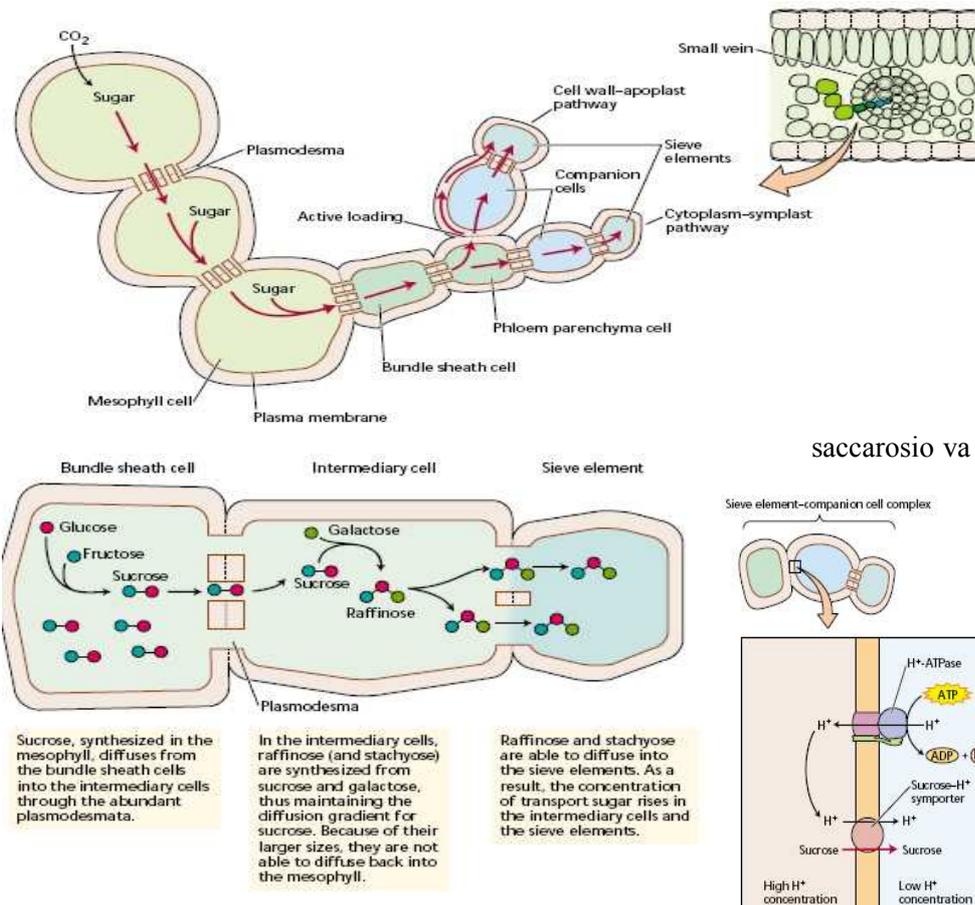
- **via apoplastica:** lo zucchero viaggia a livello dell'apoplasto senza entrare nelle cellule, alla fine è caricato nel vaso floematico. Le evidenze sperimentali consistono nell'aver osservato saccarosio nell'apoplasto; l'inibizione dei carrier plasmalemmatici inibisce il trasporto di saccarosio; piante transgeniche con una invertasi (che scinde saccarosio in glucosio e fruttosio) apoplastica presentano attività ottica (data dagli zuccheri scissi). Questo trasporto contro gradiente di concentrazione prevede un trasporto attivo secondario, ossia i fotosintati passano dalle cellule intermedie alle cellule compagne, fino al floema, il tutto sfruttando l'energia metabolica derivante dalla scissione dell'ATP e dal gradiente di protoni H⁺ (a lato). Questa via è tipica dei pozzi che accumulano saccarosio, come i tuberi e la canna da zucchero.
- **via simplastica:** consiste nel trasporto degli zuccheri attraverso il citoplasma delle cellule intermedie e compagne, fino ad arrivare nei vasi floematici. Nelle venature minori troviamo la via simplastica in cui le cellule della guaina del fascio sono collegate da plasmodesmi. Il modello proposto per il caricamento simplastico si chiama *polimer trapping* (sotto) ed è adatto per le specie che trasportano glucosio o raffiniosio. Il saccarosio dalle cellule della guaina del fascio (dove è prodotto) passa nelle cellule intermedie attraverso i plasmodesmi, ma viene sottratto al pool di saccarosio libero poiché è unito ad una molecola di galattosio formando raffiniosio sempre attraverso il legame con l'UTP. Il raffiniosio non riesce a tornare indietro e trasloca negli elementi del floema; il caricamento del

raffiniosio nel floema è inibito dal PCMB5. Questa via è tipica dei pozzi che utilizzano saccarosio, come le foglie giovani o gli apici radicali, questo perchè per mantenere una via simplastica il

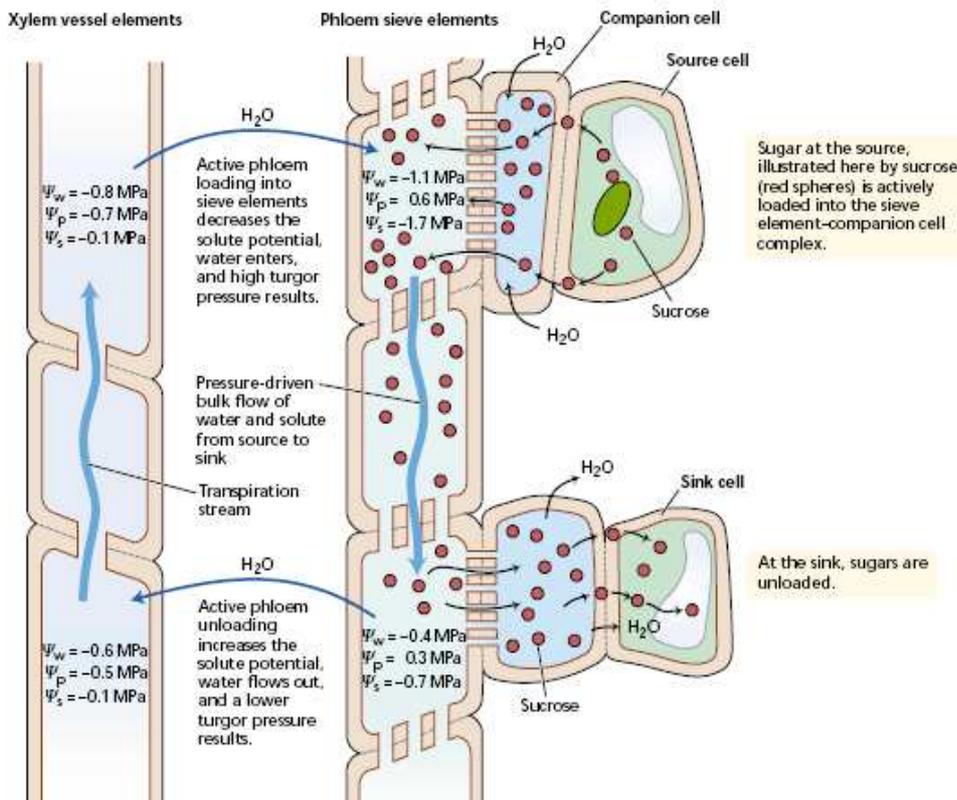
saccarosio va utilizzato subito, al fine di

mantenere ripido il gradiente di fotosintati che permette il flusso floematico verso il pozzo "affamato".

Gli enzimi per la biosintesi del raffiniosio sono localizzati quindi nelle cellule intermedie. I plasmodesmi che collegano le cellule della guaina del fascio con le cellule intermedie



sono più piccoli rispetto a quelli che collegano le cellule intermedie con le cellule dei vasi floematici, questo perchè i tetrasaccaridi così non possono tornare indietro ma spostarsi solamente nei vasi floematici.



TRASPORTO A LUNGA DISTANZA

Il meccanismo che consente ai fotosintati di passare dalle sorgenti ai pozzi è definito *modello di flusso di pressione*, applicabile solo alle Angiosperme. I fotosintati diminuiscono il potenziale idrico dei vasi in cui si muovono, ma aumentano la pressione di turgore dei vasi data la maggior quantità di acqua che si accumula al loro interno. Come risultato il flusso floematico si indirizza verso i pozzi che assorbendo i soluti diminuiscono la pressione di turgore da 1.7 MPa a 0.7 MPa, dato che l'acqua segue il movimento dei fotosintati; l'acqua si

muove quindi verso i pozzi secondo un flusso di pressione di turgore (da maggiore a minore), e la driving force è data proprio dall'assorbimento del saccarosio dai pozzi. Il gradiente di pressione è di 0.41 MPa, sufficiente a giustificare il movimento nel floema.

La velocità di traslocazione del floema è molto più bassa di quello dello xilema: i valori si aggirano intorno a 1 metro/ora, in termini di massa possono essere traslocati 15 grammi/ora per metro di superficie.

Il modello spiega bene come la velocità di flusso dipenda dalle dimensioni dalla "voracità" del pozzo stesso, in quanto più un pozzo necessita di fotosintati, più ne assorbe e più quindi aumenta la velocità di flusso diretta verso il pozzo stesso; se il pozzo smette di assorbire fotosintati il flusso diminuisce fino a arrestarsi, ed i nutrienti saranno indirizzati ad altri pozzi; la richiesta di fotosintati quindi regola la velocità del flusso floematico. La forza del pozzo non varia solamente in base alla richiesta ma anche in base alle dimensioni, quindi la forza dei pozzi in generale determina dove andranno i fotosintati prodotti dalle sorgenti.

Nel caricamento simplastico è presente una connessione tra le cellule del cribro e le cellule del pozzo; nel caricamento apoplastico invece le connessioni scarseggiano anche se sono caratterizzati da pochi plasmodesmi.

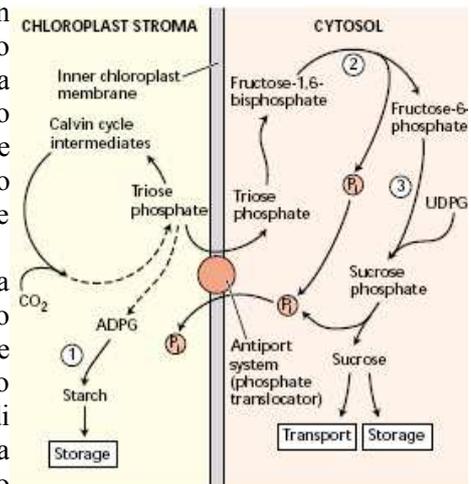
Nella via apoplastica è attivo nell'apoplasto l'enzima *invertasi* che scinde il saccarosio in glucosio e fruttosio così da rendere ripido il gradiente di concentrazione e far uscire più rapidamente il saccarosio dalle cellule intermedie; in alternativa il saccarosio può essere scisso una volta entrato nelle cellule del pozzo; in particolare il saccarosio entra nel vacuolo dove è attiva l'*invertasi* che scinde il saccarosio. L'accumulo nel vacuolo consente anche alle cellule del pozzo di assorbire con più efficienza i fotosintati dato che non sono accumulati nel citosol (garantendo un gradiente di concentrazione ripido). Il saccarosio è accumulato nel vacuolo da un antiporto protone-saccarosio che lavora sfruttando il gradiente di protoni H^+ generato dalle ATPasi di membrana tramite l'utilizzo di ATP. Nel vacuolo in generale sono accumulati moltissimi zuccheri.

Affinchè il modello appena descritto sia attuabile sono necessarie alcune condizioni:

- i pori delle placche cribrose della Angiosperme non devono essere occlusi
- non può esserci trasporto bidirezionale nello stesso momento nel vaso
- non è richiesto un grande apporto di energia tranne che nei trasporti attivi
- deve esserci un gradiente di pressione

La trasformazione della foglia da pozzo a sorgente è analizzabile con una autoradiografia che mostra come inizialmente il saccarosio marcato sia assorbito dalla foglia in fase di sviluppo, ma in seguito la foglia acquisterà capacità fotosintetica ed il segnale del saccarosio marcato sarà visibile solo alla base. Lo sviluppo da pozzo a sorgente è determinata da segnali come ormoni e carboidrati che influenzano l'attività del pozzo in base a meccanismi di crescita, senescenza e sviluppo.

Una minor domanda di fotosintati da parte del pozzo determina una inibizione del trasporto che carica il saccarosio nel floema, questo determina una più alta concentrazione di saccarosio nella sorgente (come le cellule del mesofillo), l'attività fotosintetica è rallentata o comunque la sintesi di saccarosio è rallentata a favore della sintesi di amido. L'importanza dell'antiporto presente sulla membrana plasmatica che consente di traslocare il saccarosio nel floema è stato dimostrato tramite una pianta costruita con un RNA antisense che inibiva la sua traduzione, e come risultato si è visto che l'aumentata concentrazione citosolica di saccarosio determinava un aumento della produzione di amido ed in generale il destino dei triosifosfato.



ORMONI

Gli *ormoni* sono molecole prodotte da parti diverse della pianta (gli ormoni animali sono prodotti solo da organi specifici) che agiscono su siti anche distanti sebbene presenti a basse concentrazioni; inoltre presentano effetti *pleiotropici*, ossia inducono risposte diverse, a volte anche opposte dipendenti da esempio dalla concentrazione, in tessuti diversi. Queste sono caratteristiche che individuano un dato composto come ormone.

Gli ormoni vegetali sono raggruppabili in 5 classi:

- auxine
- citochinine
- gibberelline
- acido abscissico
- etilene (CH₂CH₂)

Le prime tre classi individuano un gruppo di molecole con caratteristiche e strutture abbastanza simili, mentre l'acido abscissico e l'etilene sono ormoni unici, che non individuano un insieme di composti.

Gli effetti di questi ormoni variano a seconda della sensibilità del bersaglio, e soprattutto in base alla natura recettoriale, la quale è diversa in tessuti diversi o in stadi dello sviluppo differenti. Gli ormoni animali invece posseggono un unico bersaglio.

Gli effetti degli ormoni derivano anche dalla sovrapposizione dei loro singoli effetti, quindi in una data via metabolica possono agire anche ormoni con attività opposte, il cui risultato dipende dall'equilibrio che si raggiunge a seconda delle concentrazioni, come nel differenziamento del meristema apicale controllato da auxine e citochinine. Gli ormoni hanno inoltre un importante ruolo commerciale.

Lo schema che segue spiega il modello di descrizione che verrà applicato a tutti gli ormoni:

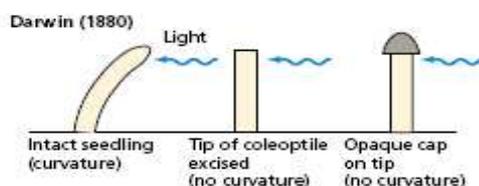
- come è stato scoperto
- come dove è prodotto
- come viene trasportato
- risposte indotte dall'ormone

Gli ormoni controllano anche le risposte agli stress, che si definiscono *abiotici* quando sono di tipo fisico (stress idrico, illuminazione, freddo, siccità, temperatura, ad esempio lo stress idrico è una condizione normale delle piante e lo stress luminoso è ciclico); gli stress *biotici* invece dipendono da patogeni, funghi o virus che attaccano la pianta causando anche gravi danni.

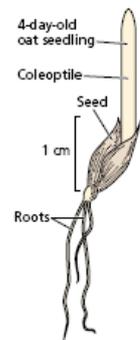
AUXINA

L'auxina è stato il primo ormone identificato da Darwin alla fine dell'Ottocento dopo ripetuti esperimenti svolti sui coleottili, in particolare su semi fatti crescere in modo eziolato (al buio), in cui si ha un allungamento del fusto e manca lo sviluppo delle foglie; il *coleottilo* è la guaina che circonda la parte superiore del fusticino, e svolge una funzione molto importante nell'allungamento di quest'ultimo in base alla provenienza della luce. Il mesocotile e l'ipocotile sono invece le parti del fusticino che si allungano per permettere (in natura) al seme di raggiungere gli strati più superficiali e fuoriuscire dal terreno; la capacità di riconoscere la luce deriva dalla presenza del *fitocromo*. Quando il fusticino fuoriesce dal terreno, si blocca la crescita del mesocotile ed il coleottilo è perforato dalla prima foglia della sommità, che in seguito diviene verde ed inizierà a svolgere la fotosintesi per garantire un adeguato rifornimento energetico a tutto l'organismo: per questo la pianta in condizioni eziolate cresce il più velocemente possibile!

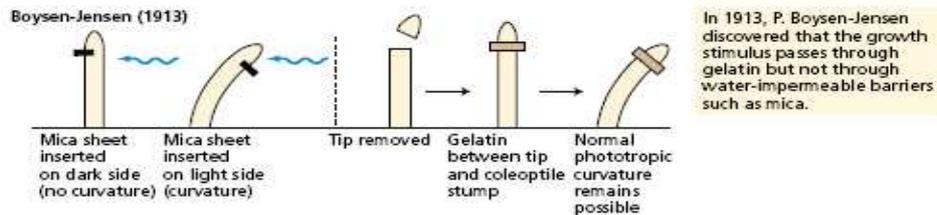
Il coleottilo è una di quelle aree ricche in ormoni caratterizzata dal *fototropismo*, ossia dai movimenti indotti dalla direzione di provenienza della luce. Darwin capì l'importanza della parte apicale del coleottilo dopo numerosi esperimenti in cui osservò la mancanza di fototropismo in seguito alla rimozione o alla copertura del coleottilo; ciò non si verificava se si sotterrava il mesocotile e si lasciava scoperto il coleottilo che continuava a curvarsi nella direzione della luce come nelle piante normali.



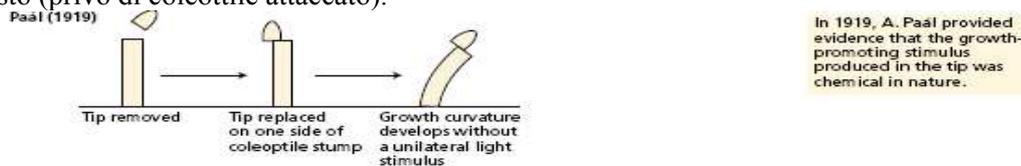
From experiments on coleoptile phototropism, Darwin concluded in 1880 that a growth stimulus is produced in the coleoptile tip and is transmitted to the growth zone.



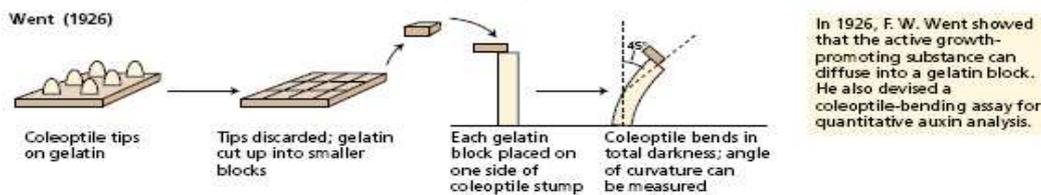
In successivi esperimenti è stato visto che anche rimuovendo il coleotile ed inserendo un blocchetto di gelatina (che lasciava passare le sostanze) tra la parte apicale e centrale del coleotile, la curvatura fototropica era ancora presente.



Invece rimuovendo il coleotile e riattaccandolo leggermente spostato ad un'estremità, la pianta si incurvava sul lato opposto (privo di coleotile attaccato).



Se invece il coleotile era posto inizialmente su un blocchetto di agar il tempo sufficiente per fare assorbire al blocchetto le sostanze rilasciate, ed in seguito il blocchetto di agar era scambiato con la parte apicale del coleotile di una pianta qualsiasi, la curvatura fototropica si attuava normalmente, quindi questo processo è innescato da sostanze diffusibili rilasciate dalla parte apicale del coleotile.



Le sostanze responsabili di questi effetti sono 3 auxine naturali, prodotte in proporzioni diverse a seconda della pianta e con localizzazioni diverse. L'acido 3-indolo butirrico ad esempio è presente in grandi quantità nel mais.

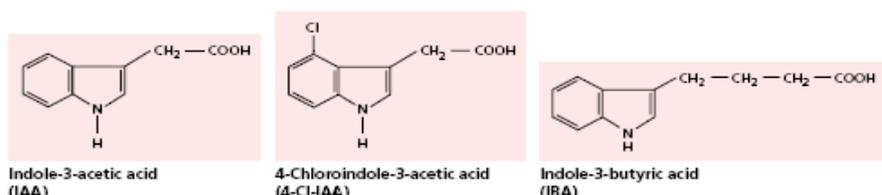


FIGURE 19.3 Structure of three natural auxins. Indole-3-acetic acid (IAA) occurs in all plants, but other related compounds in plants have auxin activity. Peas, for example, contain 4-chloroindole-3-acetic acid. Mustards and corn contain indole-3-butyric acid (IBA).

La struttura che accomuna le auxine è un anello indolico, ossia un anello etrociclico simile al triptofano dal quale, infatti, derivano.

Commercialmente sono state sintetizzate numerose auxine sintetiche che hanno risvolti sia come stimolatori della crescita che come erbicidi (a dosi elevate). E' interessante che queste auxine sintetiche svolgono la stessa attività di quelle naturali pur mancando di un anello indolico.

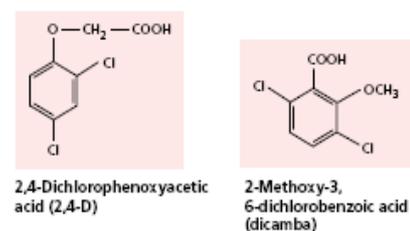


FIGURE 19.4 Structures of two synthetic auxins. Most synthetic auxins are used as herbicides in horticulture and agriculture.

La spiegazione è da ricercarsi nella presenza di una carica parzialmente positiva e di una carica negativa del carbossile, che distano tra loro circa 0.5 nm, quindi si ritiene che il recettore delle auxine riconosca una struttura carica di questo tipo, ma la questione è ancora aperta.

Un problema delle auxine sintetiche è la loro non degradabilità, e quindi i loro effetti anche tossici si prolungano nel tempo con gravi conseguenze.

L'auxina è sintetizzata a partire dal triptofano, sebbene sia stata scoperta una via triptofano-indipendente dallo studio di mutanti. Per il tipo di attività controllate dall'auxina (crescita e sviluppo della pianta), questo ormone è presente nei tessuti giovani in rapida crescita come tessuti meristemati ma anche frutti immaturi.

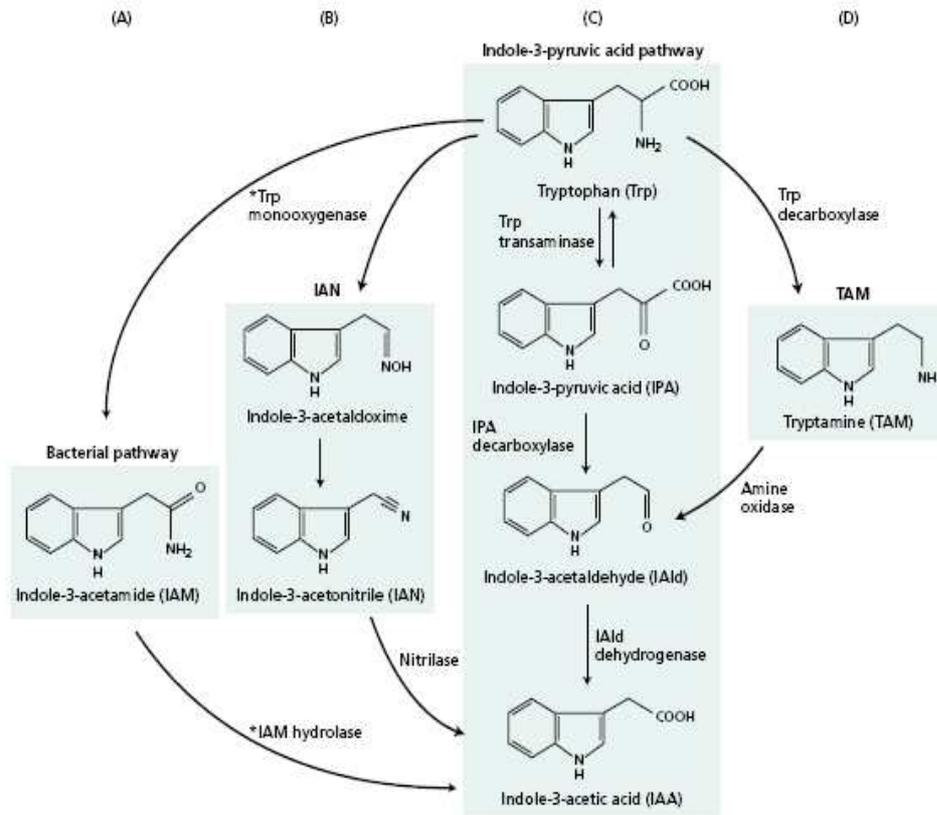


FIGURE 19.6 Tryptophan-dependent pathways of IAA biosynthesis in plants and bacteria. The enzymes that are present only in bacteria are marked with an asterisk. (After Bartel 1997.)

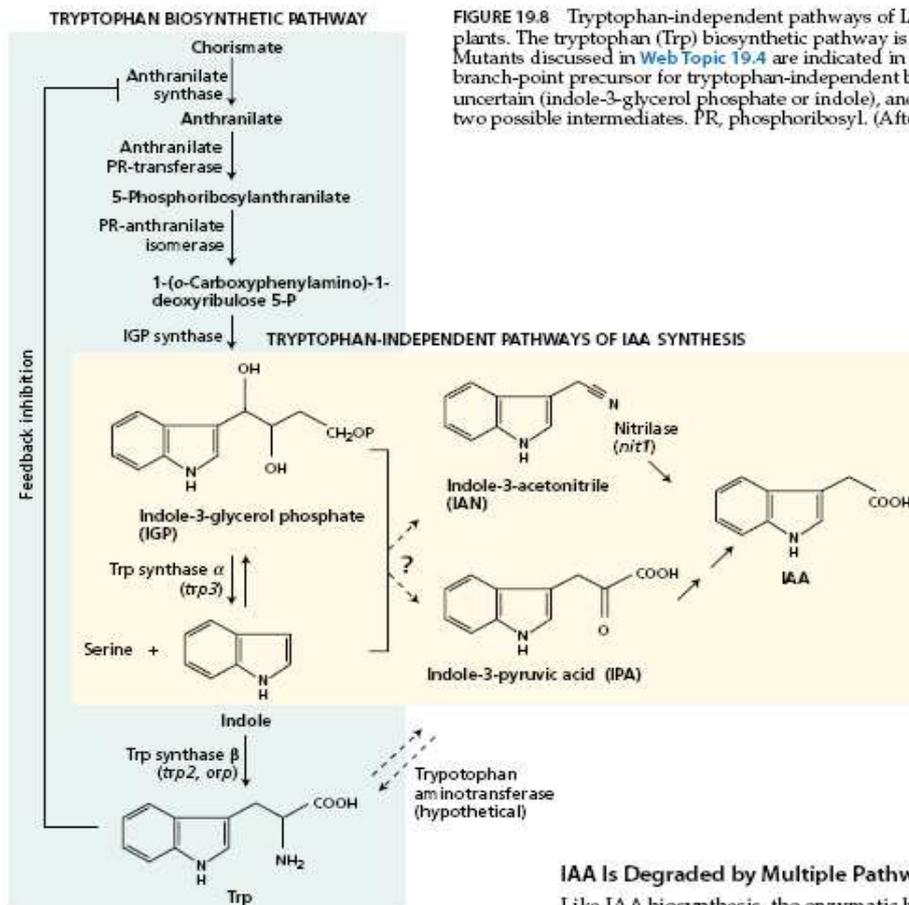


FIGURE 19.8 Tryptophan-independent pathways of IAA biosynthesis in plants. The tryptophan (Trp) biosynthetic pathway is shown on the left. Mutants discussed in Web Topic 19.4 are indicated in parentheses. The branch-point precursor for tryptophan-independent biosynthesis is uncertain (indole-3-glycerol phosphate or indole), and IAN and IPA are two possible intermediates. PR, phosphoribosyl. (After Bartel 1997.)

IAA Is Degraded by Multiple Pathways

Like IAA biosynthesis, the enzymatic breakdown (oxida-

Più vie di biosintesi dell'auxina sono quindi presenti all'interno della pianta. Le parti della pianta che producono attivamente auxina sono gli apici dei germogli, le giovani foglie, gli embrioni, i fiori, i frutti ed il polline.

Proprio per la sua produzione nelle parti giovani l'auxina, le gibberelline e le citochinine, sono considerati ormoni giovanili, mentre l'etilene e l'acido abscissico come ormoni dell'adulto.

Oltre alle vie biosintetiche sono state scoperte anche le 3 vie di degradazione dell'auxina.

L'anello indolo acetico in seguito a perossidazione non è più attivo, quindi l'auxina cessa ogni attività, e questo controllo è importante date le basse concentrazioni alle quali gli ormoni agiscono.

Quindi l'auxina è prodotta dalla via dipendente o indipendente del triptofano, ma la via di degradazione ossidativa ne elimina l'attività sia direttamente sia dopo la coniugazione all'aspartato.

Un altro sistema di controllo dell'auxina è la compartimentalizzazione all'interno della cellula; l'organello più frequente è il cloroplasto nel quale sono compartimentalizzati ormoni come ad esempio l'acido abscissico, i quali hanno una funzione debolmente acida. La dissociazione varia a seconda del pH di ogni compartimento: l'apoplasto è acido, il cloroplasto è alcalino, lo stroma in particolare è molto alcalino. L'acido 3-indolo acetico entrando nello stroma si dissocia e la conseguente carica negativa lo confina nello stroma.

La coniugazione può essere effettuata con molecole ad alto peso molecolare o a basso peso molecolare, ad esempio possono esservi coniugazioni con glicoproteine o glucani, ma anche con glucosio o mioinositolo. La possibilità di legarsi a glicoproteine, glucani o polialcoli è una caratteristica di questi ormoni, e può funzionare sia come riserva, quindi funge da processo reversibile, ma per altri ormoni la coniugazione determina la definitiva inattivazione. I coniugati oltre ad essere fonti di auxina possono essere considerati elementi di storage o di difesa dall'ossidazione.

Il trasporto dell'auxina all'interno del coleottil è polarizzato, infatti se rimuovo un pezzo di coleottil e lo inserisco tra due blocchetti di agar, uno contenente auxina e l'altro no, il trasporto è effettuato solo dal blocchetto di agar contenente auxina verso il blocchetto di agar che non ne contiene. Ciò non si osserva se il pezzo di coleottil è ruotato di 180°. Il blocco del trasporto dell'auxina causa gravi problemi a livello dello sviluppo dell'embrione. La polarità del trasporto dell'auxina non dipende dalla gravità, bensì dalla disposizione di speciali trasportatori.

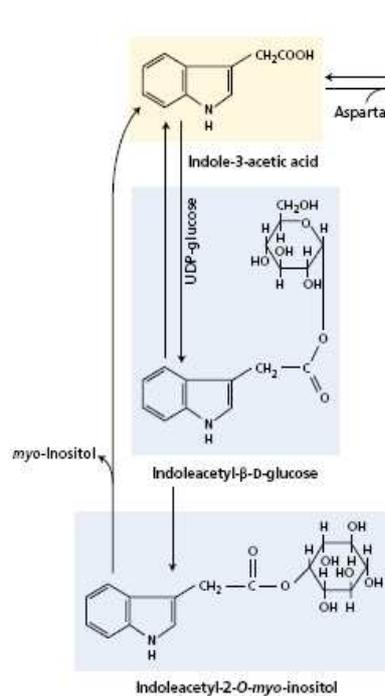


FIGURE 19.9 Structures and proposed metabolic pathways of bound auxins. The diagram shows structures of various IAA conjugates and proposed metabolic pathways involved in their synthesis and breakdown. Single arrows indicate irreversible pathways; double arrows, reversible.

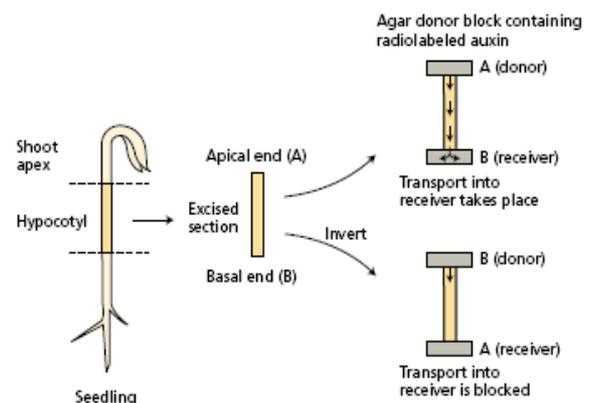
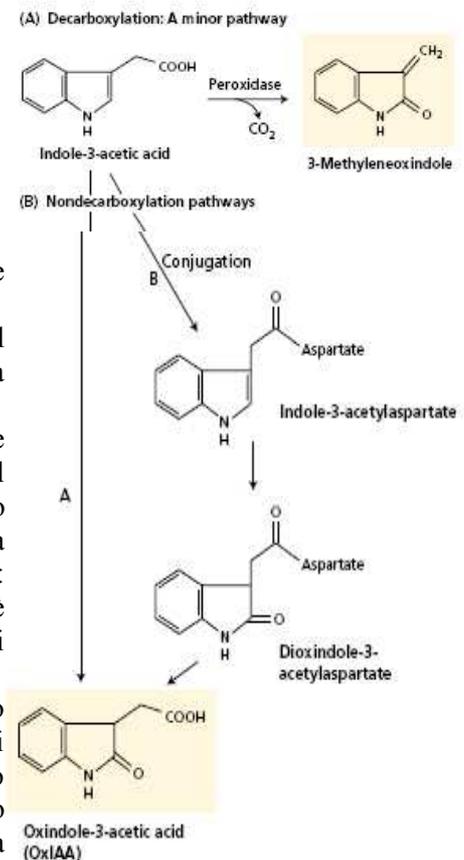


FIGURE 19.11 The standard method for measuring polar auxin transport. The polarity of transport is independent of orientation with respect to gravity.

L'auxina essendo un acido debole si può trovare in forma dissociata o indissociata.

In forma indissociata (condizioni di pH apoplastiche, ossia pH 4.5) permea facilmente il doppio strato fosfolipidico apolare del plasmalemma, entrando nel citosol dove si dissocierà ed acquisirà una carica negativa rimanendo confinata nel citosol; la poca auxina presente in forma dissociata nell'apoplasto sarà assorbita attraverso un simporto attivo secondario che utilizza 2H^+ pompato all'esterno dalle ATPasi di membrana. Il traslocatore dell'auxina è specifico, saturabile ed uniformemente distribuito sul plasmalemma, nonché attivo in quanto l'energia dell'ATP (la cui produzione è inibita dal cianuro) è indirettamente sfruttata per il trasporto di questo ormone.

Le H^+/ATP asi sono fondamentali in quanto mantengono il pH apoplastico abbastanza acido e forniscono il gradiente per il trasporto attivo secondario; l'eccessiva alcalinizzazione del citosol derivante dalla loro attività è evitata da opportuni meccanismi di controllo che mantengono il pH citosolico intorno a 7, grazie al quale la forma dissociata dell'auxina predominerà, confinando questo ormone nel citosol data l'impossibilità per un composto polare di attraversare il plasmalemma.

L'uscita dell'auxina dal citosol è mediata da carrier specifici localizzati nella zona basale delle cellule del tessuto del coleotile: in questo modo il trasporto dell'auxina può avvenire in una sola direzione, proprio come risultava dagli esperimenti precedenti. Tutto ciò prende il nome di *modello chemioosmotico del trasporto apolare dell'auxina*.

E' stato dimostrato che il trasporto dell'auxina è cellulare, quindi non interessa xilema o floema.

Il trasportatore che consente la traslocazione dell'auxina si chiama *PIN*, ed appartiene ad una superfamiglia di trasportatori che comprende anche trasportatori eucariotici e batterici, è composta da 10 segmenti transmembrana e le estremità C ed N terminale sono entrambe affacciate nel citosol (studi di immunofluorescenza). La funzione di questi trasportatori *PIN* è stata identificata dal punto di vista funzionale tramite l'uso di inibitori NPA e TIBA, noti per inibire il trasporto dell'auxina tramite il legame con questo carrier di efflusso. Entrambi sono inibitori sintetici creati chimicamente, ma ci sono anche inibitori naturali come la quercetina e la genisteina con attività paragonabile.

I mutanti *Tir3* di *Arabidopsis Thaliana* sono meno sensibili all'*NPA* e mostrano un trasporto polare ridotto, sito di legame ridotto, mostrano un fenotipo nano e non emettono radici laterali.

Il mutante che mostra ipersensibilità all'*NPA* mostra invece un fenotipo con radici arricciate, sebbene il gene mutato non sia legato al sito di legame del trasportatore *PIN* bensì alla via di trasduzione del segnale, in particolare ad una fosfatasi di tipo 2.

Il meccanismo di inibizione di questi due trasportatori colpisce soprattutto la localizzazione delle proteine *PIN* nella parte basale delle cellule. Le *PIN* sono prodotte nel compartimento endosomiale ed in seguito ad etichettatura sono indirizzate nella parte basale della cellula: è a questo livello che agisce l'inibitore *NPA*.

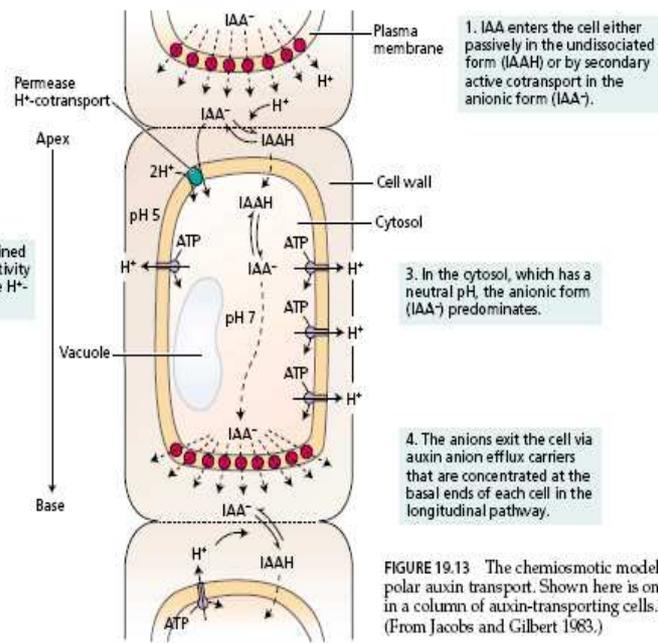
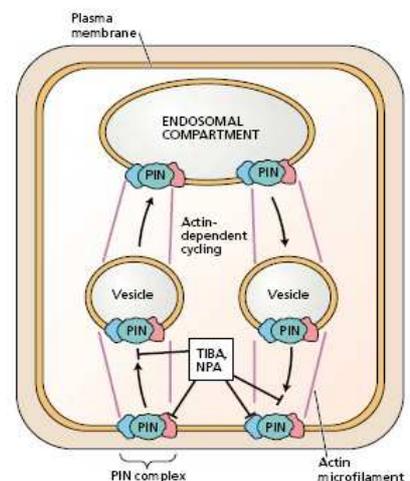
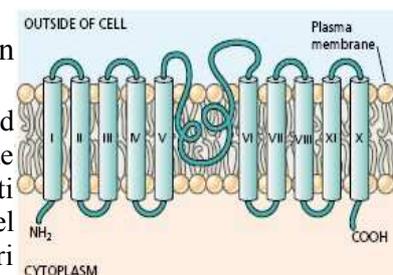


FIGURE 19.13 The chemiosmotic model for polar auxin transport. Shown here is one cell in a column of auxin-transporting cells. (From Jacobs and Gilbert 1983.)



L'auxina è traslocata non solo a livello cellulare, ma anche per grandi distanze tramite il trasporto floematico, per questo può agire anche su tessuti diversi da quello di produzione.

DOSAGGI ORMONALI

Il biosaggio è un sistema abbastanza impreciso che permette di avere rapidamente informazioni quantitative sul tessuto da analizzare; l'imprecisione è data da possibili inibitori presenti nel tessuto. Nel caso dell'auxina il biosaggio consiste nel misurare l'induzione della curvatura fototropica mediata da un blocchetto di agar imbibito di auxina: la curva dose-effetto mette in relazione l'angolo di curvatura indotto dall'auxina con la concentrazione dell'ormone stesso; in questo modo per verificare la quantità di auxina presente in un tessuto è sufficiente aggiungere l'estratto del tessuto stesso in un blocchetto di agar in modo da misurare la curvatura indotta basandosi sulla curva dose-effetto.

In un qualsiasi biosaggio è indispensabile analizzare un effetto tipico solo dell'ormone da analizzare: nel caso dell'auxina la curvatura del coleotile.

Una stima più precisa è data dal saggio radioimmunologico o da un saggio ELISA.

Il *saggio radioimmunologico* (RIA) dà una concentrazione precisa dell'ormone e quindi mostra un'alta sensibilità; si basa sull'utilizzo di anticorpi leganti l'ormone marcato radioattivamente, e la marcatura riscontrata è proporzionale alla quantità di antigene marcato.

Il RIA può essere effettuato anche tramite un saggio di competizione, usando un inibitore che impedisce il legame dell'anticorpo all'antigene, quindi si presenterà radioattività legata e radioattività libera; l'aggiunta di un secondo anticorpo porterà alla precipitazione del complesso antigene- anticorpo che verrà misurata per quantizzare l'ormone presente nel tessuto. La quantizzazione si basa anche in questo caso su di una curva standard in cui la radioattività nel pellet varia in funzione della quantità dell'ormone, e la radioattività legata decrescerà proporzionalmente alla quantità di auxina non marcata introdotta nel sistema.

EFFETTI FISIOLGICI

L'auxina induce l'accrescimento della pianta: nelle parti aeree la concentrazione dell'ormone è di 10^{-5} M, mentre nelle radici troviamo una concentrazione di 10^{-9} / 10^{-10} M. L'auxina induce nella parte apicale la produzione di etilene in quanto stimola l'ACC sintasi (enzima predisposto alla produzione di etilene). La velocità di crescita è misurata dalla formula:

$$GR = m (\Psi_p - Y)$$

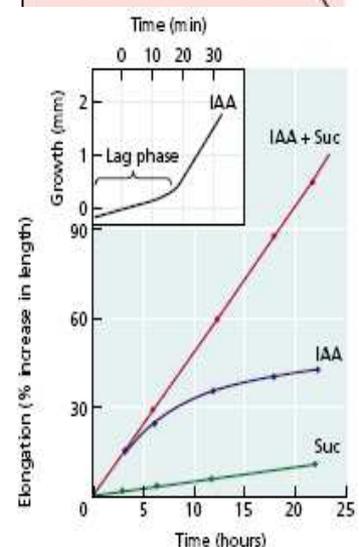
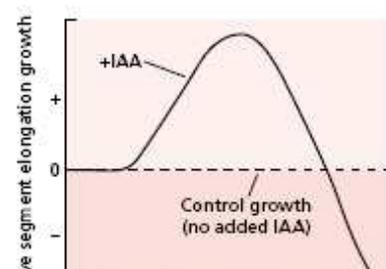
ve:

- GR = velocità di crescita
- m = estensibilità della parete
- Ψ_p = pressione di turgore
- Y = soglia di cedevolezza

La pressione di turgore aumenta quando l'acqua entra nella pianta richiamata da un potenziale idrico negativo, inoltre l'auxina aumenta l'estensibilità della parete permettendo la *crescita per distensione* tipica dei cellule giovani che si accrescono senza mitosi.

Analizzando una curva dose-risposta e misurando la crescita per allungamento si nota che l'auxina inizialmente induce uno stimolo per l'allungamento del meso- o ipocotile, a concentrazione di 10^{-6} . Aumentando la concentrazione di auxina e arrivando a concentrazioni dell'ordine di 10^{-4} / 10^{-2} , la curva di crescita diminuisce a causa dell'effetto inibitorio dell'ormone il quale stimola la produzione di etilene (inibitore della crescita).

Lo stimolo della crescita non parte immediatamente dopo l'aggiunta di auxina, ma si osserva una fase lag di circa 10 minuti dettata dalla necessità per la cellula di attivare i macchinari biochimici che consentano una maggior estensibilità della parete; inoltre l'aggiunta di saccarosio consente di prolungare la risposta di crescita grazie alla sua attività osmotica che aumenta la pressione di turgore.



I tropismi sono fenomeni in cui la pianta apparentemente compie un movimento, e sono dettati da:

- luce (fototropismo)
- gravità (gravitropismo)

FOTOTROPISMO

Una luce intermittente che viene data ogni 30 minuti permette di osservare la curvatura verso la fonte di luce: questa proprietà si chiama *fototropismo*. Questo fenomeno è osservabile in tutte le piante, anche in quelle adulte, e deriva da una distribuzione asimmetrica dell'auxina, in quanto il lato in ombra cresce di più rispetto al lato illuminato data la maggiore concentrazione di auxina. La piegatura è determinata dalla componente blu della luce, e ciò è stato osservato tramite esperimenti in cui si utilizzavano spettri di azione differenti, ossia lunghezze d'onda differenti misurando di volta in volta la curvatura fototropica: il picco di curvatura si riscontra tra i 300 nm e i 500 nm, corrispondenti alla luce blu. Anche per il fitocromo (recettore della luce rossa) è stata utilizzata l'analisi degli spettri d'azione differenti.

I recettori della luce blu sono flavoproteine chiamate fotoproteine che, in quanto chinasi, si autofosforilano in seguito all'illuminazione, causando una redistribuzione dell'auxina dovuta ad un gradiente di autofosforilazione. La luce blu stimola anche l'apertura stomatica (gli stomi si apriranno di più quando c'è maggiore necessità di CO₂ ossia in condizioni di aumentata fotosintesi); l'apertura stomatica è stimolata sia dalla luce rossa, che lentamente attiva l'apertura di non tutti gli stomi, e dalla luce blu, la quale stimola la completa apertura di tutte le rime stomatiche colpite.

Le piante nel corso della giornata sono soggette a diverse qualità spettrali della luce, infatti all'alba e al tramonto non solo è presente una diversa intensità luminosa, ma anche la qualità della luce è diversa in quanto è più ricca in rosso lontano rispetto alla luce rossa normale, anche la luce lunare è ricca in rosso lontano, e per questo ad esempio alcune specie sono piantate solo in condizioni di luna piena in quanto crescono più velocemente, e viceversa per altre specie vegetali.

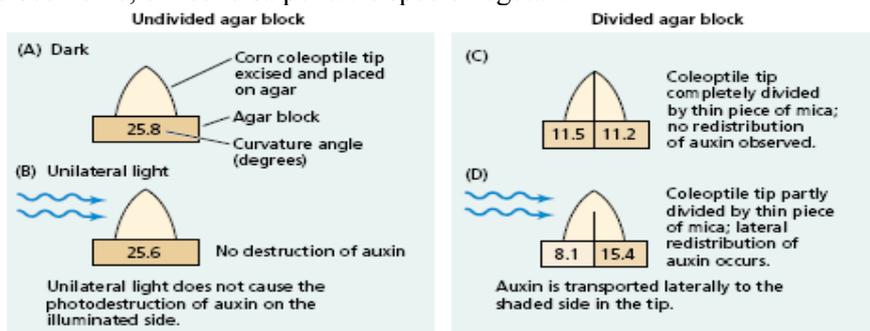


FIGURE 19.27 Evidence that the lateral redistribution of auxin is stimulated by unidirectional light in corn coleoptiles.

La percezione della luce blu da parte delle fototropine si tramuta in una redistribuzione laterale dell'auxina, comprovato dall'esperimento soprastante in cui se la sommità del colottille è posata su un blocchetto di agar e successivamente si irradia con luce blu, non si assiste ad una distruzione dell'auxina. Se il coleottille è diviso non avviene la redistribuzione dell'auxina, ma se invece è unito la metà non illuminata presenterà una maggiore concentrazione di auxina dovuta alla traslocazione dell'ormone dalla parte illuminata verso la parte non illuminata.

GRAVITROPISMO

Se una pianta cade orizzontalmente al suolo dopo un certo tempo le foglie si riorientano verso l'alto e le radici verso il basso. La gravità diventa un segnale di corretto posizionamento della pianta in base alle necessità dell'organismo stesso: il gravitropismo negativo determina il riorientamento dei fiori e delle foglie verso l'alto, mentre il gravitropismo positivo è tipico delle radici che si orientano verso il basso. La percezione della gravità è dato dall'amido che nei tessuti radicali è accumulato nelle *statocisti*, organelli che

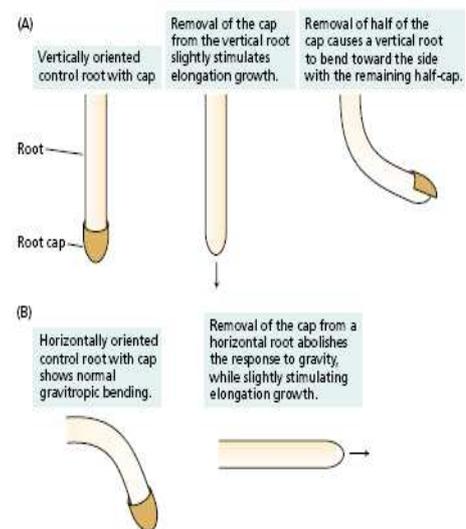


FIGURE 19.31 Microsurgery experiments demonstrating that the root cap produces an inhibitor that regulates root gravitropism. (After Shaw and Wilkins 1973.)

permettono di percepire la gravità. Un ruolo molto importante è svolto dalla *cuffia radicale*, ossia l'involucro che protegge l'estremità l'apice in crescita della radice stessa. La radice si muove verso il basso grazie alla crescita dei tessuti più distali (quindi più nuovi) che devono essere protetti in quanto il terreno è un ambiente impervio che potrebbe altrimenti danneggiare il tessuto radicale in accrescimento.

La cuffia radicale inoltre ha un ruolo fondamentale nel gravitropismo in quanto senza di essa non sarebbe possibile da parte della pianta percepire la gravità; la rimozione di metà cuffia radicale spinge la radice a crescere solo in direzione della metà di cuffia radicale rimanente.

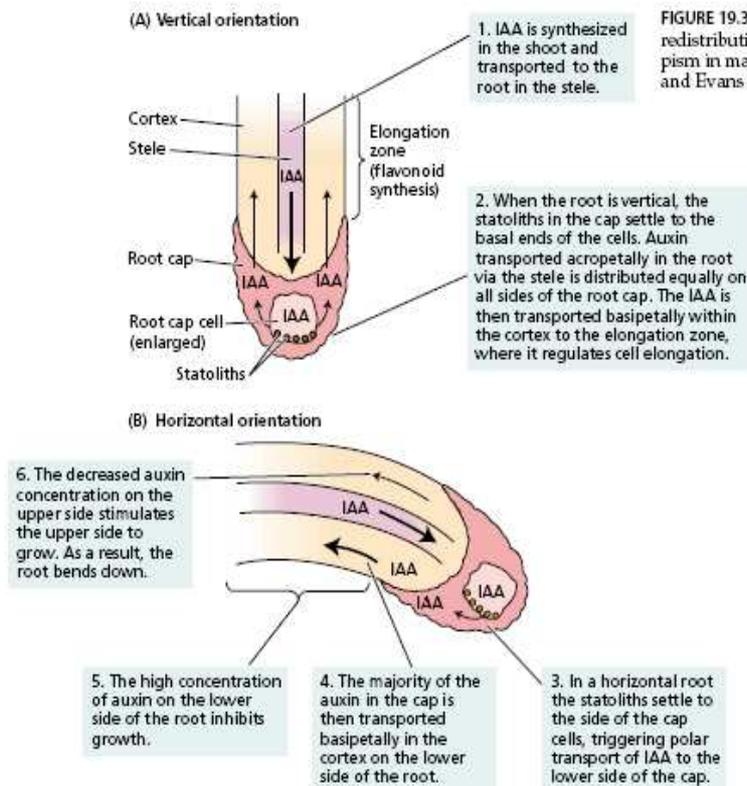


FIGURE 19.33 Proposed model for the redistribution of auxin during gravitropism in maize roots. (After Hasenstein and Evans 1988.)

Nella cuffia radicale gli statoliti agiscono sul fondo e l'auxina è traslocata nel cilindro radicale e ripartita in modo eguale tra tutte le parti della cuffia radicale, nel caso in cui la radice sia perpendicolare al terreno e rivolta verso il basso. Se invece gli statoliti sono posizionati su di un lato della cuffia radicale, l'auxina seguirà gli statoliti formando un gradiente dall'alto verso il basso in direzione della gravità. La maggiore concentrazione di auxina nella parte bassa della cuffia inibisce la crescita della zona, spingendo la crescita della parte della cuffia radicale con meno auxina che quindi si incurva verso il basso, il

calcio ha un ruolo inibitorio in quanto crea i graticci di pectine.

Quindi è evidente che, mentre nel fusto la maggiore concentrazione di auxina stimola la crescita, nelle radici è esattamente il contrario.

La gemma primaria all'apice del germoglio impedisce alle altre gemme laterali di crescere, e questa inibizione è indotta dall'auxina, in quanto se si recide la gemma apicale le altre gemme laterali possono crescere, ma se al posto della gemma apicale recisa è applicato un blocchetto di agar contenente auxina, la situazione rimane inalterata: le gemme laterali non possono crescere. In questo fenomeno un ruolo importante non è svolto solo dall'auxina, ma anche dalle citochinine e dall'acido abscissico; l'acido abscissico in particolare controlla i fenomeni di dormienza anche in altri processi, ed in questo caso mantiene dormienti le gemme laterali: la recisione della gemma apicale porta alla diminuzione sia dell'acido abscissico che dell'auxina, dal quale si evince che l'auxina mantiene alta la concentrazione di acido abscissico; le citochinine invece stimolano la crescita delle gemme laterali se applicate manualmente.

Nel caso delle radici l'auxina stimola la formazione di radici avventizie. Il processo di radicazione consiste nella formazione di radici avventizie a livello del meristema del tessuto del fusto, in caso di taglio della pianta, perchè esistono sempre dei tessuti meristemati, ma senza auxina le radici si riformano con grande lentezza: l'auxina accelera di molto il processo. La formazione di radici avventizie dipende da un ridifferenziamento del cilindro vascolare (meristema) che normalmente per potere iniziare la formazione delle radici laterali ha bisogno di un gene e dell'auxina., la quale è trasportata in modo *acropetalo* (dalla base della radice verso l'apice), mentre nel fusto il movimento era *basidiopetalo* (dal coleotile alla base). Un discorso simile può essere fatto sulle fragole, nelle quali la rimozione degli acheni impedisce la crescita del frutto, ma se lo stesso frutto privo di acheni è spruzzato con l'auxina allora la crescita avviene normalmente. L'auxina è applicata anche commercialmente per produrre frutti più grossi ma meno saporiti!

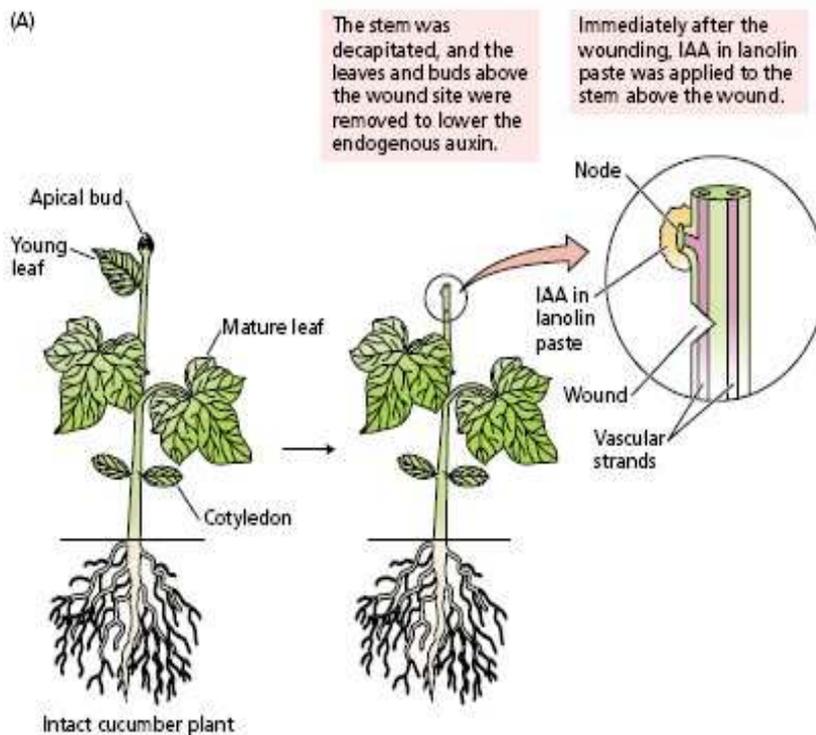
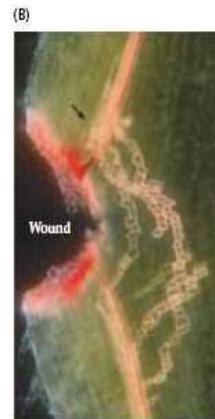


FIGURE 19.40 IAA-induced xylem regeneration around the wound in cucumber (*Cucumis sativus*) stem tissue. (A) Method for carrying out the wound regeneration experiment. (B) Fluorescence micrograph showing regenerating vascular tissue around the wound. (B courtesy of R. Aloni.)

Se una pianta subisce una ferita, l'applicazione di una certa quantità di indolo acetico al di sopra della ferita stessa (sul fusto) permette il ridifferenziamento del tessuto vascolare, analizzabile con microscopia confocale; il ridifferenziamento del tessuto vascolare determina la formazione di nuovi canali che permettono allo xilema di rigenerare xilema e floema nel caso di alte concentrazioni di auxina, ma basse concentrazioni dello stesso ormone permettono lo sviluppo solo del floema.



Xylem differentiation occurs around the wound, following the path of auxin diffusion.

Le applicazioni commerciali dell'auxina sono:

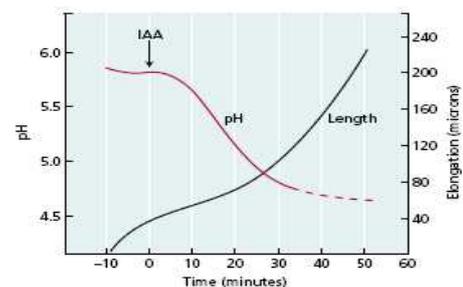
- radicazione
- stimolazione di frutti senza semi (partenocarpici)
- erbicidi: le auxine sintetiche, non essendo metabolizzate, presentano una concentrazione inibitoria per lo sviluppo della pianta, in quanto hanno attività sia antiauxinica che antibiologica; sono utilizzate contro le erbacce ma alcune monocotiledoni inattivano le auxine sintetiche tramite coniugazione con zuccheri, amminoacidi o sostanze a basso peso molecolare

CRESCITA ACIDA DELL'AUXINA

Esiste un parallelismo stretto tra l'acidificazione del mezzo esterno di un tessuto quando sono somministrate auxine e l'allungamento che ne consegue. Se ad un pezzo di mesocotile è aggiunta auxina il pH della parete si acidificherà raggiungendo una differenza di 2 unità rispetto al pH di partenza, sebbene almeno inizialmente sia presente una fase di lag. L'acidificazione dell'apoplasto innesca l'attività delle epsansine che consentono la crescita per distensione data da una maggiore estensibilità. Ci sono 3 possibili spiegazioni della aumentata attività della H⁺-ATPasi che causa l'acidificazione dell'apoplasto:

1. il complesso recettoriale al quale si lega l'auxina va a disattivare il complesso di trascrizione atto a reprimere il gene dell'H⁺ ATPasi ; la degradazione di questo repressore stimola la trascrizione genica e quindi la secrezione delle nuove pompe.
2. l'auxina si lega al fattore ABP1 che stimola la traslocazione delle pompe dal reticolo al plasmalemma
3. la pompe è stabilizzata e quindi maggiormente mantenuta nel plasmalemma

Si pensa che la proteina ABP1 abbia un ruolo in tutti e tre questi meccanismi. Sicuramente l'attivazione di queste pompe di membrana non dipende dalle proteina 14:3:3, ma usa un meccanismo meno diretto. La capacità di alcuni inibitori metabolici di bloccare la crescita prova la mancata attività dell'auxina su cellulasi e pectinasi.



Activation hypothesis:
 Auxin binds to an auxin-binding protein (ABP1) located either on the cell surface or in the cytosol. ABP1-IAA then interacts directly with plasma membrane H⁺-ATPase to stimulate proton pumping (step 1). Second messengers, such as calcium or intracellular pH, could also be involved.

Synthesis hypothesis:
 IAA-induced second messengers activate the expression of genes (step 2) that encode the plasma membrane H⁺-ATPase (step 3). The protein is synthesized on the rough endoplasmic reticulum (step 4) and targeted via the secretory pathway to the plasma membrane (steps 5 and 6). The increase in proton extrusion results from an increase in the number of proton pumps on the membrane.

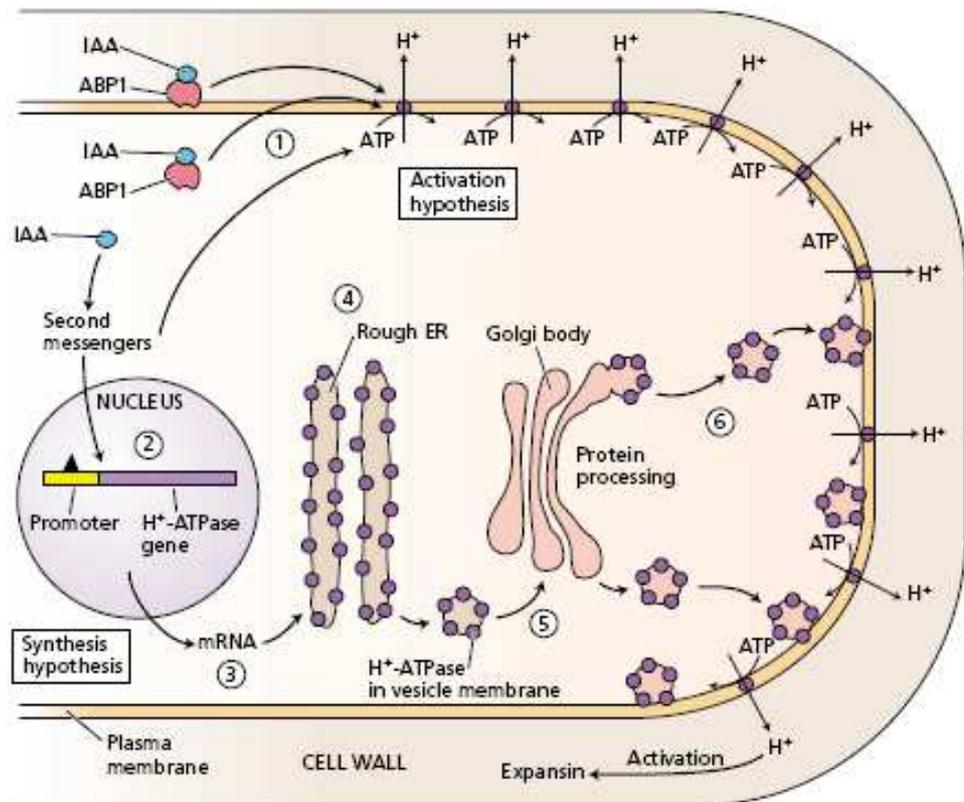


FIGURE 19.25 Current models for IAA-induced H⁺ extrusion. In many plants, both of these mechanisms may operate. Regardless of how H⁺ pumping is increased, acid-induced wall loosening is thought to be mediated by expansins.

GENI INDOTTI DALL'AUXINA

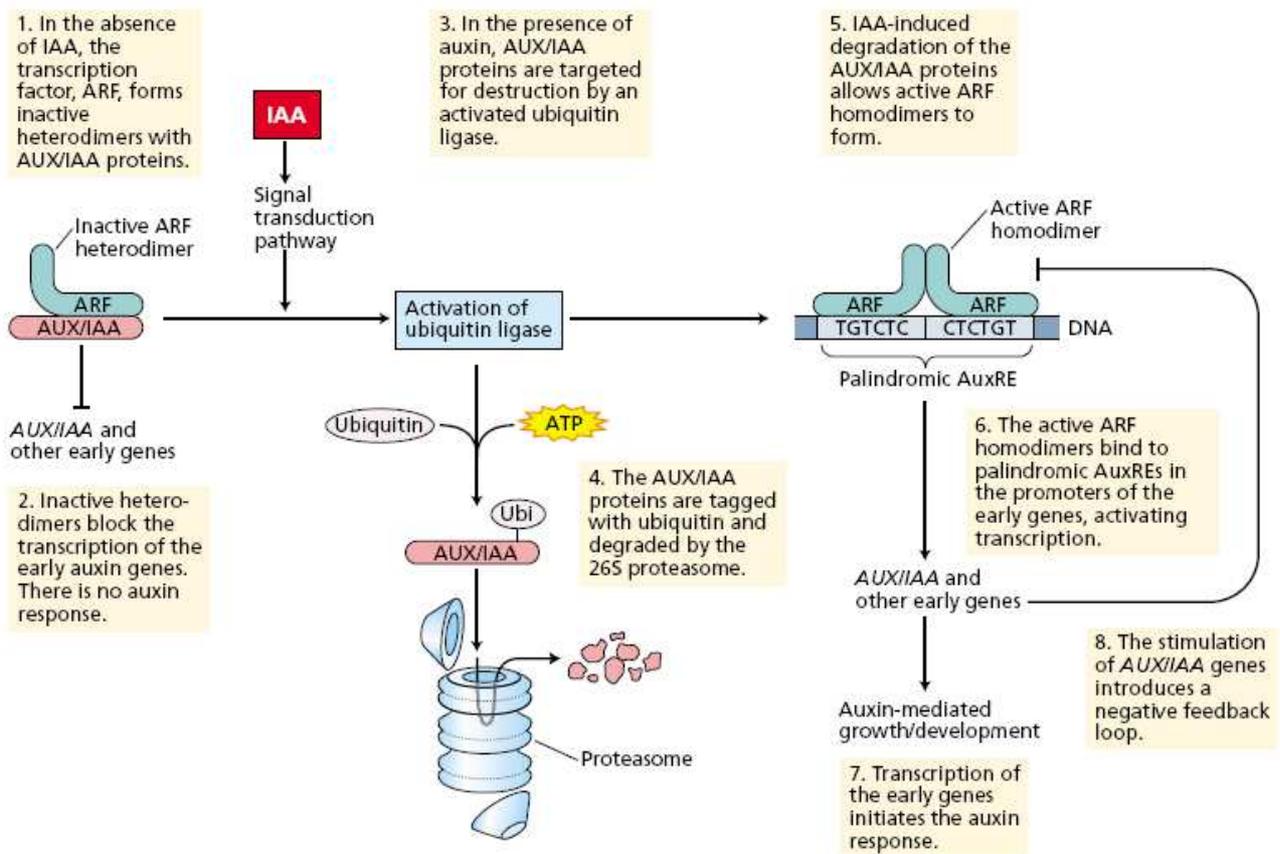


FIGURE 19.41 A model for auxin regulation of transcriptional activation of early response genes by auxin. (After Gray et al. 2001.)

I *geni di risposta primaria* non richiedono la sintesi proteica quindi si ritiene che l'auxina agisca su fattori di trascrizione (ARF) già presenti nella cellula. I geni attivati sono necessari per la crescita e lo sviluppo della pianta e sono state identificate le famiglie SAUR, GH3, geni di risposta a stress, glutatione transferasi, ACC sintasi, AUX/ IAA.

L'ACC sintasi è l'enzima che porta alla biosintesi dell'etilene ed è stimolato dall'auxina.

I *late genes* sono i geni di risposta secondaria e prevedono una risposta a lungo termine, in quanto sono attivati da alcuni geni primari e sono bloccati da inibitori della sintesi proteica.

Normalmente i fattori di trascrizione ARF sono complessati in un eterodimero con AUX/ IAA (fattori che bloccano i fattori di trascrizione) e sono inattivi, ma il segnale indotto dall'auxina induce l'attivazione dell'ubiquitina ligasi che aggiunge un residuo di ubiquitina all'AUX/ IAA, portando alla loro distruzione da parte del proteasoma. Gli ARF ora liberi si complessano in un omodimero attivando i geni di risposta precoce menzionati precedentemente, i cui prodotti con un meccanismo a feedback negativo inibiscono la loro stessa trascrizione se presenti in quantità eccessive.

LE CITOCHININE

Le *citochinine* sono una classe di ormoni strettamente correlate con le auxine, e furono identificate negli anni '50 in seguito a vari esperimenti con lo scopo di identificare i fattori che promuovessero la crescita in coltura e da applicare per fini commerciali; era stato osservato che il Dna dello sperma di aringa e l'endosperma di cocco erano in grado di stimolare la divisione cellulare: questa sostanza era un derivato dell'adenina, chiamata *chinetina*.

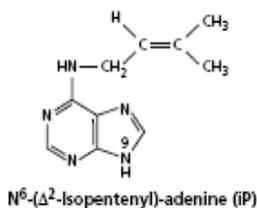
Insieme all'auxina le citochinine non solo promuovono la divisione cellulare ma anche il differenziamento dei sistemi colturali in vitro: il rapporto tra auxina e citochinina determina un certo profilo di differenziamento.

In particolare l'auxina stimola l'allungamento delle parti apicali ma in termini di differenziamento spinge il meristema secondario verso la formazione di radici secondarie; le citochinine promuovono il differenziamento verso i germogli.

La chinetina era stata vista di promuovere non solo il differenziamento di cellule animali ma anche del midollo di tabacco: l'unica differenza tra la chinetina e le citochinine naturali consiste nella catena laterale legata all'adenina.

Le citochinine naturali hanno la caratteristiche di essere legate alla purina adenina.

Le citochinine sono sostanzialmente formate da un'adenina che si lega ad una molecola di isopentenile (catena a 5 atomi di carbonio che può essere formata da CH₃ e CH₂OH); essendoci un doppio legame tra due carboni è possibile avere un'isomeria sia *cis* che *trans*. Un'altra citochinina ha invece un dimetil-allile (*isopentenil-adenina*).



Un'altra citochinina ha invece un dimetil-allile (*isopentenil-adenina*).

Le citochinine naturali sono la *cis* e la *trans* zeatina; il doppio legame può essere saturato e dare così la citochinina chiamata *diidrozeatina*, comunque attiva.

Sostanzialmente sono queste tre molecole le principali citochinine naturali; un'adenina legata ad un ribosio e ad un gruppo fosfato si chiama nucleotide, ma sono

comunque in grado, se scissi, di dare origine ad una citochinina attiva (anche nei batteri sono presenti citochinine), ed essendo basi azotate possono trovarsi anche nella struttura di alcuni tRNA, i quali quando sono degradati possono dare origine ad una citochinina, in particolare le basi azotate dell'anticodone, anche se in natura sono rare situazioni del genere.

BIOSINTESI

L'isopentenile deve essere trasferito sull'adenina dall'*isopentenil transferasi* o *citochinina sintasi* (9 isoforme in *Arabidopsis Thaliana*). Le 9 isoforme di *Arabidopsis* possono essere clonate in *E.Coli* come proteine ricombinanti e come substrato utilizzano indifferentemente sia ATP che ADP.

L'isopentenile deriva dall'isopentenil pirofosfato o dal dimetil allil pirofosfato che tramite numerosi passaggi può originare una *trans*-zeatina per trasformazione del metile in CH₂OH; in seguito verranno trasformati nei relativi ribosidi e ribotidi di queste citochinine.

La degradazione delle citochinine da parte della *citochinina ossidasi* porta all'adenina e all'isopentenile ossidato, chiamato 3-metil-2-butenale.

Le citochinine per la loro proprietà di induzione della divisione cellulare e del differenziamento sono sintetizzate in tessuti molto giovani come foglie in via di sviluppo, meristemi, tessuti embrionali e frutti; il trasporto avviene dalle radici alle foglie tramite la via xilematica e si è scoperto che a livello delle gemme parte un segnale che induce le radici a produrre citochinine che vengono trasportate alle gemme stesse.

L'utilità dei ribosidi consiste nel fatto che sarebbe pericoloso trasportare nello xilema un ormone attivo, quindi si preferisce coniugarlo per inattivarlo: svolgerà la sua funzione nel tessuto bersaglio dopo il rilascio della citochinina. Anche i glucosidi rappresentano una forma di coniugazione, in quanto il glucosio può

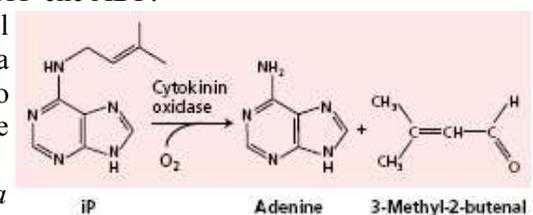
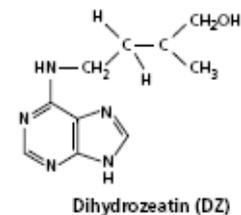
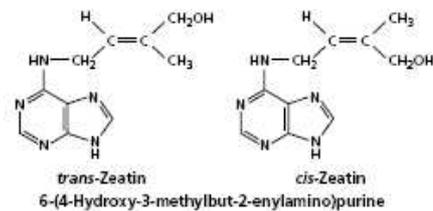
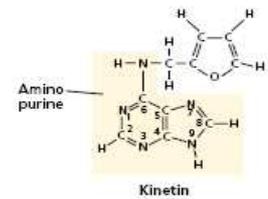


FIGURE 21.7 Cytokinin oxidase irreversibly degrades some cytokinins

legarsi all'estremità CH₂OH della zeatina; anche in questo caso il trasporto dell'ormone coniugato inibisce la sua reattività: svolgerà la sua funzione nel tessuto bersaglio dopo la scissione dal glucosio.

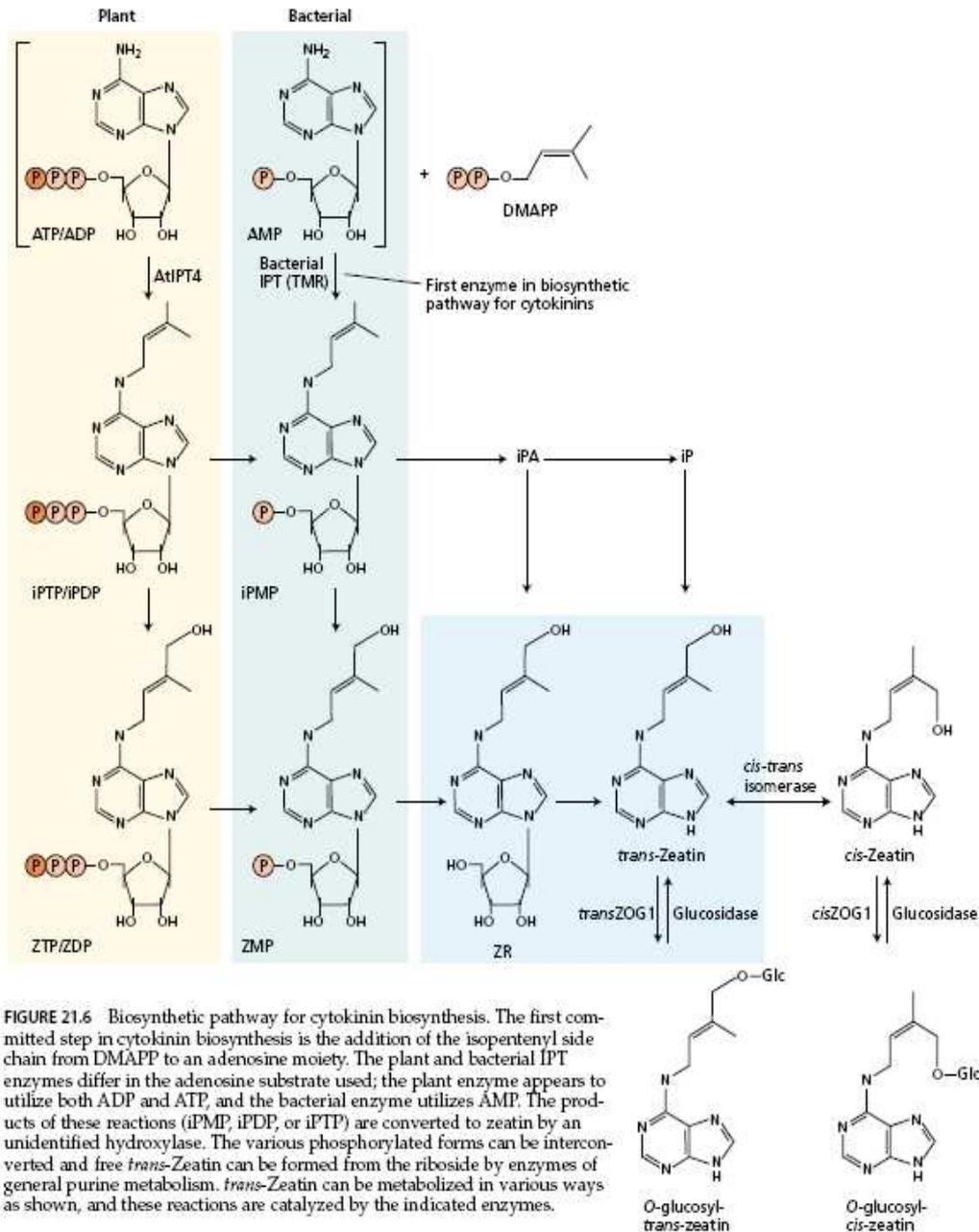


FIGURE 21.6 Biosynthetic pathway for cytokinin biosynthesis. The first committed step in cytokinin biosynthesis is the addition of the isopentenyl side chain from DMAPP to an adenosine moiety. The plant and bacterial IPT enzymes differ in the adenosine substrate used; the plant enzyme appears to utilize both ADP and ATP, and the bacterial enzyme utilizes AMP. The products of these reactions (iPMP, iPDP, or iPTP) are converted to zeatin by an unidentified hydroxylase. The various phosphorylated forms can be interconverted and free *trans*-Zeatin can be formed from the riboside by enzymes of general purine metabolism. *trans*-Zeatin can be metabolized in various ways as shown, and these reactions are catalyzed by the indicated enzymes.

EFFETTI FISIOLGICI

Le citochinine:

- stimolano la mitosi
- provocano un ritardo della senescenza
- stimolano la maturazione dei cloroplasti e quindi dei tilacoidi
- mobilizzano i nutrienti: nel tessuto in rapida attività i nutrienti devono essere pienamente utilizzati, e la presenza di ormoni funge da segnale di richiamo
- stimola l'espansione delle foglie e dei cotiledoni dal tessuto germogliante
- inibiscono la crescita degli internodi
- nella dominanza apicale le citochinine permettono lo sviluppo delle gemme se sono rimosse dall'apice
- morfogenesi

La presenza di citochinine a concentrazione crescente permette l'apertura dei cotiledoni ed il differenziamento delle foglie e quindi della pianta nella sua piena attività, in quanto è inibita la crescita dei fusti e degli internodi. Se la pianta cresce in maniera eziolata l'allungamento dipende dall'auxina ad alte concentrazioni, perchè in assenza di luce la pianta deve crescere il più velocemente possibile per trovare la luce affinché il germoglio possa svilupparsi tramite la fotosintesi, necessaria per il metabolismo dell'organismo. Quando la pianta raggiunge la superficie, grazie alla luce si attivano le citochinine che permettono lo sviluppo delle foglie e l'apertura dei cotiledoni, rallentando l'allungamento dell'internodo (non ve ne è più bisogno). La capacità delle citochinine di indurre questi effetti è provata sperimentalmente somministrando citochinine a piante cresciute al buio. L'effetto sulla mitosi è legata da una regolazione del ciclo cellulare che diviene più rapido tramite il controllo di chinasi ciclina-dipendenti.

In seedling A, the left cotyledon was sprayed with water as a control. The left cotyledon of seedling B, and the right cotyledon of seedling C, were each sprayed with a solution containing 50mM kinetin.

The dark stippling represents the distribution of the radioactive amino acid as revealed by autoradiography.

The results show that the cytokinin-treated cotyledon has become a nutrient sink. However, radioactivity is retained in the cotyledon to which the amino acid was applied when the labeled cotyledon is treated with kinetin (seedling C).

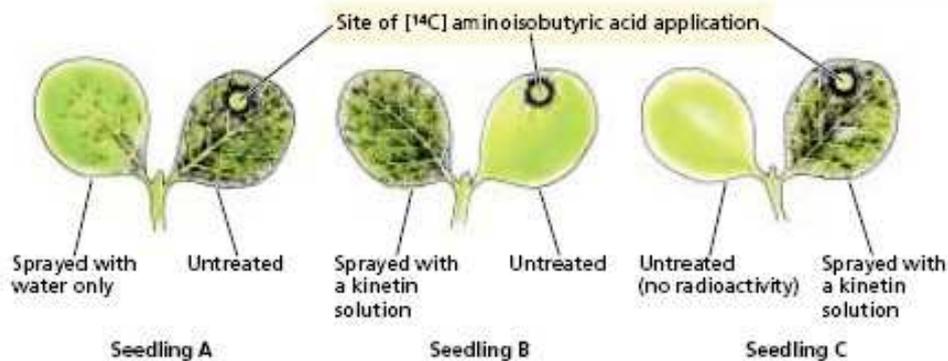


FIGURE 21.19 The effect of cytokinin on the movement of an amino acid in cucumber seedlings. A radioactively labeled amino acid that cannot be metabolized, such as

aminoisobutyric acid, was applied as a discrete spot on the right cotyledon of each of these seedlings. (Drawn from data obtained by K. Mothes.)

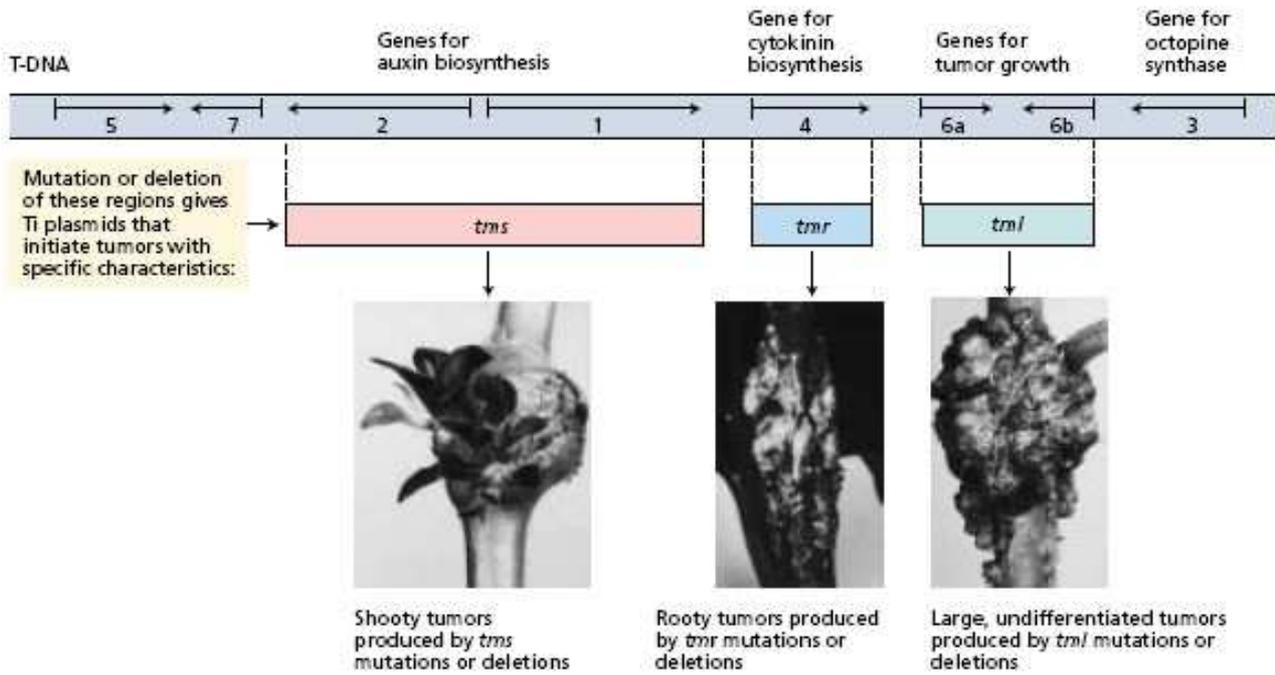
Per quanto riguarda la mobilitazione dei nutrienti, è stata provata sperimentalmente, come illustrato sopra. Nell'esperimento sono presenti due cotiledoni della stessa pianta. Nel primo caso il cotiledone di sinistra è spruzzato con acqua, ed il cotiledone di destra con l'amminoacido marcato non metabolizzabile *acido aminoisobutirrico*: la diffusione dell'amminoacido nel cotiledone di sinistra è minima. Se nel secondo caso al posto dell'acqua è spruzzata chinetina sul cotiledone, allora tutta la marcatura si riscontra nel cotiledone di sinistra, dimostrando come la presenza di chinetina richiami a sé tutti i nutrienti possibili.

Le piante transgeniche hanno permesso di capire moltissimi aspetti della fisiologia vegetale, in particolare per gli ormoni hanno permesso di capire il loro ruolo nel metabolismo. Un esempio sono state le piante transgeniche che sovraesprimevano il gene della isopentenil transferasi, inducendo una massiccia produzione di citochinina nella pianta modificata: il numero dei germogli nelle foglie era più numeroso, si riscontrava una ritardata senescenza fogliare, ridotta radicazione, ridotta dominanza apicale ed un maggiore numero di germogli laterali, infine le foglie presentavano una maggiore quantità di clorofilla in quanto erano stimolati i tilacoidi

Nel T-DNA di *Agrobacterium tumefaciens* sono stati identificati i geni responsabili della biosintesi delle auxine, ma alcuni mutanti mostrano un fenotipo con tumori germoglianti a causa di una mutazione o delezione di questi geni. Viceversa delezioni nei geni per la sintesi delle citochinine causano un fenotipo radicante sul tumore del colletto.



Plant expressing *ipt* gene remains green and photosynthetic. Age-matched control: advanced senescence, no photosynthesis.



Una situazione del genere si riscontra anche in alcune piante di *Nicotiana tabaccum*, le quali sviluppano spontaneamente, e senza induzione con agenti mutageni esterni, tumori con un fenotipo simile a quelli causati da *Agrobacterium tumefaciens*: misurando la quantità di auxine e cotochinine in queste piante è stata misurata un'alta quantità di questi ormoni. I tumori sono causati da cellule che perdono il controllo del ciclo cellulare causando una proliferazione massiva nella zona colpita; perdono qualsiasi connotazione differenziativa e si dividono senza limite.

Un'osservazione simile è stata effettuata su alcuni calli coltivati in vitro, i quali sviluppano diversi fenotipi a seconda del rapporto tra auxine e citochinine presenti nel terreno di coltura: un rapporto auxina/citochinina di 2/0.2 causa uno sviluppo come callo, ma un rapporto di 2/0.5 stimola invece lo sviluppo dei germogli. La conoscenza di questi rapporti è utilizzata nei laboratori per indurre un certo fenotipo nei calli.

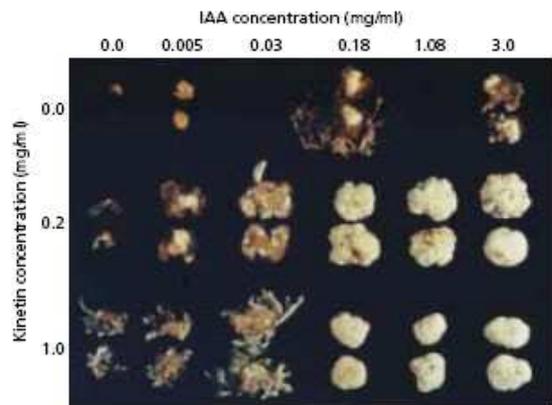


FIGURE 21.13 The regulation of growth and organ formation in cultured tobacco callus at different concentrations of auxin and kinetin. At low auxin and high kinetin concentrations (lower left) buds developed. At high auxin and low kinetin concentrations (upper right) roots developed. At intermediate or high concentrations of both hormones (middle and lower right) undifferentiated callus developed. (Courtesy of Donald Armstrong.)

PERCEZIONE DELLE CITOCHININE

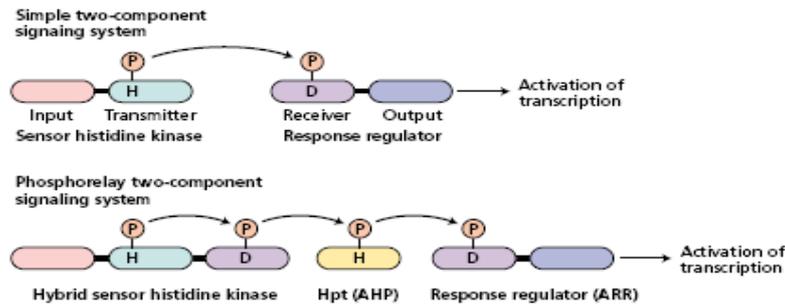


FIGURE 21.22 Simple versus phosphorelay types of two-component signaling systems. (A) In simple two-component systems, the input domain is the site where the signal is sensed. This regulates the activity of the histidine kinase domain, which when activated autophosphorylates on a conserved His residue. The phosphate is then transferred to an Asp residue that resides within the receiver domain of a response regulator. Phosphorylation of this Asp regulates

the activity of the output domain of the response regulator, which in many cases is a transcription factor. (B) In the phosphorelay-type two-component signaling system, an extra set of phosphotransfers is mediated by a histidine phosphotransfer protein (Hpt), called AHP in *Arabidopsis*. The *Arabidopsis* response regulators are called ARRs. H = histidine, D = aspartate.

Il recettore delle citochinine è stato studiato tramite studi di genetica su *Arabidopsis*.

Nell'orzo una proteina di 67 KDa (nell'orzo) non è direttamente legata nel legame con la citochinina ma in mutanti nel gene CKI1 (CK Independent 1) è stata trovata una proteina da 125 KDa (sequenza simile a ETR1) che presenta un dominio istidina chinasi simile al sistema a due componenti presente nei batteri (chemiotassi ed osmoregolazione); questa proteina è una proteina transmembrana che potrebbe avere il sito di legame con la citochinina situato verso l'esterno, ma non c'è un legame a così alta affinità da candidarlo come recettore di questo ormone; comunque è necessario per l'attività dell'ormone. Quando è sovraespresso, il tessuto cresce indipendentemente dalla citochinina. Un altro gene interessante è il gene CRE1: i mutanti per questo gene mostrano resistenza alla citochinina e aggiugnendo citochinina nel mezzo di coltura continuano a non svilupparsi; anche in questa proteina ci sono somiglianze con CK1 in quanto ci sono domini simili all'istidina chinasi batterica; potrebbe essere il recettore.

Il sistema a due componenti è un sistema semplice in quanto è presente un sensore che contiene un dominio istidina chinasi, che si attiva in seguito al segnale, provocando l'autofosforilazione su un residuo di istidina, in seguito il gruppo fosfato dall'istidina è trasferito sull'aspartato che comporta una cascata di segnale che termina con la trascrizione di alcuni geni. E' possibile avere anche sistemi più complicati, ad esempio in cui il sensore iniziale può essere libero contenendo nella stessa proteina la fase a due componenti (sia sensore che regolatore di risposta).

In *Arabidopsis* sono state identificate proteine di fosfotrasferimento ad istidina, proteine HP che contengono istidina ed in grado di accogliere il fosfato dall'aspartato e trasferirlo ad un regolatore di risposta.

I regolatori di risposta che ricevono il fosfato dall'istidina e lo accolgono sul proprio residuo di aspartato si chiamano ARR, mentre le proteine precedenti prendono il nome di Hpt; queste ultime sono proteine di fosfotrasferimento che accogliendo il fosfato sulla propria istidina permettono il risparmio di ATP da parte della cellula.

Le citochinine aumentano l'espressione dei geni regolatori di risposta di tipo ARR (a e b); quelli di tipo b sono generalmente fattori di trascrizione.

Le citochinine inoltre aumentano l'espressione di proteine ed enzimi importanti per una attività di pieno metabolismo per i germogli che devono svilupparsi, come i geni regolati dalla luce (LHCB); per questo le membrane tilacoidali ed i cloroplasti devono svilupparsi insieme agli enzimi regolati dalla luce, come ad esempio la nitrato reductasi che è attiva

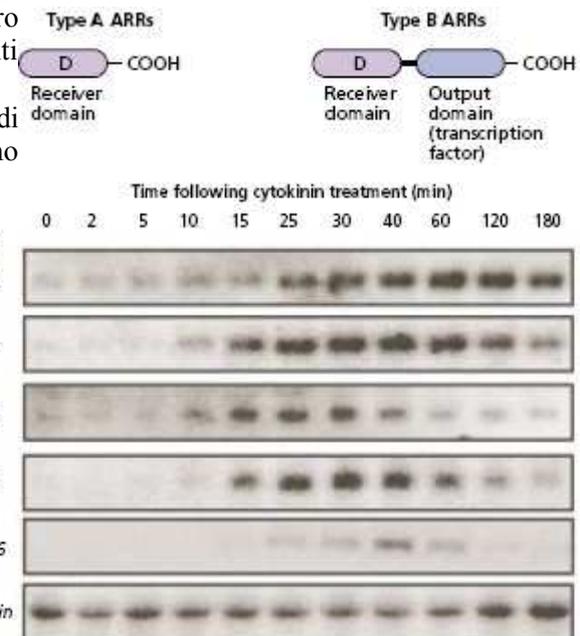


FIGURE 21.24 Induction of type-A ARR genes in response to cytokinin. RNA from *Arabidopsis* seedlings treated for the indicated time with cytokinin was isolated and analyzed by Northern blotting. Each row shows the result of probing the Northern blot with an individual type-A gene, and each lane contains RNA derived from *Arabidopsis* seedlings treated for the indicated time with cytokinin. The darker the band, the higher the level of ARR mRNA in that sample. (From D'Agostino et al. 2000.)

nell'utilizzo dell'azoto, o l'estensina (stabilizzazione mRNA) che è importante a livello della parete, ma anche la perossidasi ed il citocromo P 450.

Due mutanti mostravano minore sensibilità alla citochinina: CKR1 e CYR1, i quali presentavano anche una ridotta sensibilità all'etilene, quindi si è pensato che esistesse un punto in comune alle vie di questi due ormoni: ogni processo fondamentale è controllato sempre da più ormoni.

Il recettore delle citochinine è la proteina CRE1, la quale forma un dimerico e contiene su ogni monomero sia istidina che aspartato.

Il dominio extracellulare si chiama CHASE e contiene il sito di legame alla citochinina, la quale una volta legata al proprio recettore attiva l'autofosforilazione della propria istidina, il fosfato è trasferito sull'aspartato del secondo dominio ed il seguito all'istidina della proteina intermedia AHP, la quale entra nel nucleo e probabilmente trasferisce il fosfato ad un altro aspartato di una proteina ARR di tipo *b* o *a* (ancora non è chiaro). La proteina ARR *b* una volta fosforilata attiva il dominio output e quindi innesca la trascrizione dei geni codificanti di tipo A, i quali possono interagire con i vari effettori per stimolare la sintesi della citochinina.

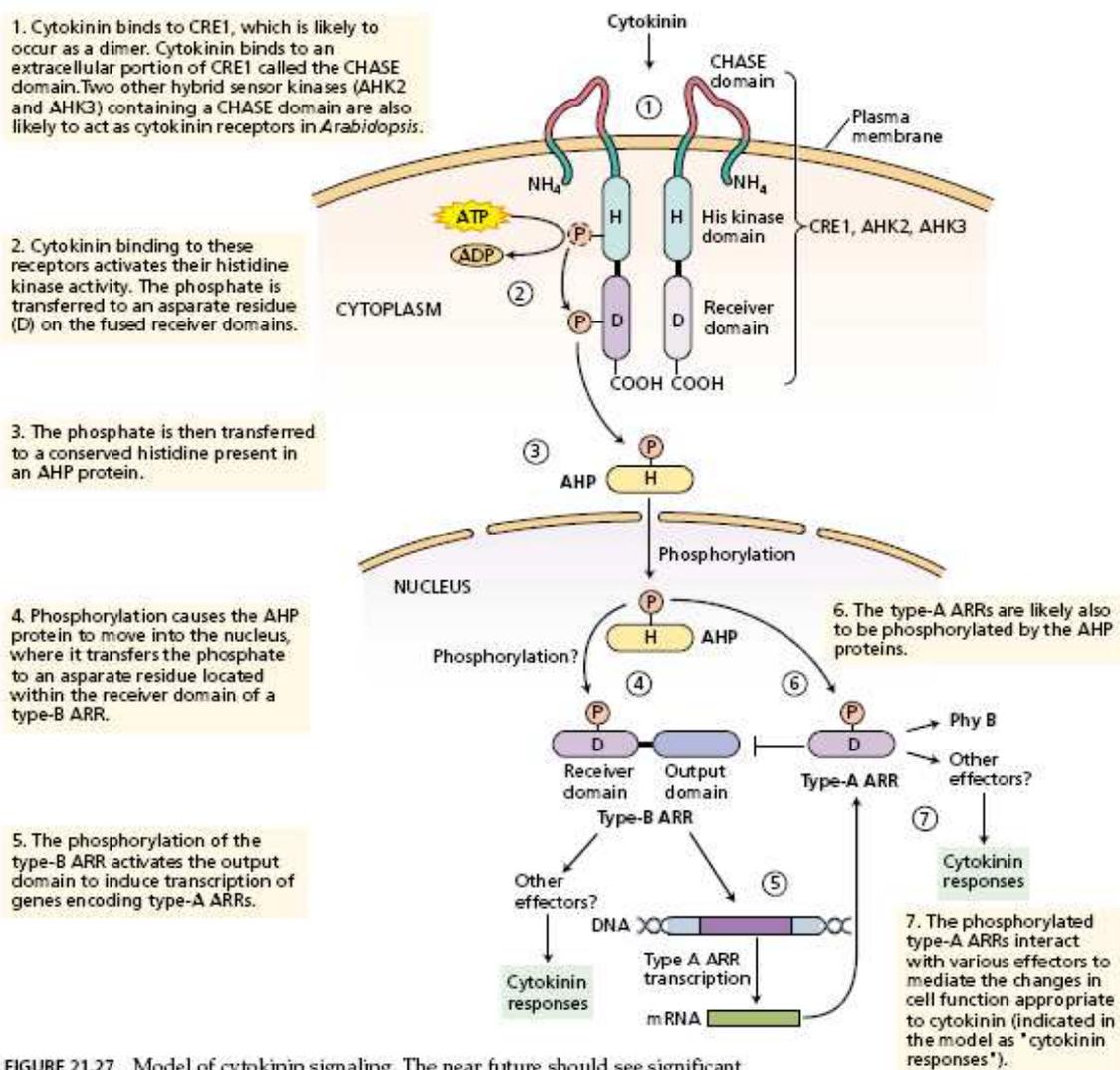
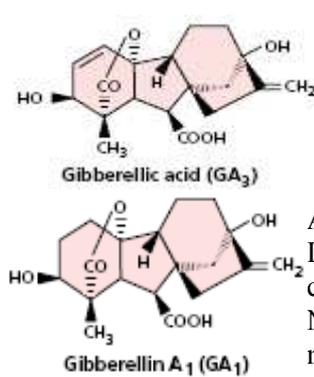


FIGURE 21.27 Model of cytokinin signaling. The near future should see significant refinement of this model, the tools are now in hand to analyze the interactions among these elements.

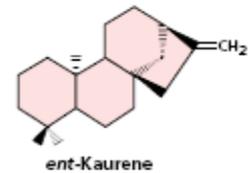
LE GIBBERELLINE

Le *gibberelline* sono un grappolo di circa 100 sostanze accomunate da una struttura chimica comune e sulla quale vengono accomunate e riconosciute come questa classe di ormoni, non tanto sulla loro attività fisiologica.

Alcune delle 100 gibberelline conosciute sono ubiquitarie ed attive anche in altri organismi; 12 sono presenti nella *Gibberella fujikuroi*, il fungo nel quale sono state scoperte, l'agente responsabile della malattia del riso (*Bakanae*): questa malattia provoca indebolimento e morte dell'organismo in quanto il fusto si allunga enormemente e porta ad un impoverimento dello stelo della piantina.



La struttura base delle gibberelline è complicata: lo scheletro base è formato dall'ent-caurene al quale possono essere attaccati vari sostituenti, dando un composto a 19 o 20 atomi di carbonio: i sostituenti sono indispensabili per l'attività delle gibberelline e le differenziano l'una dall'altra.



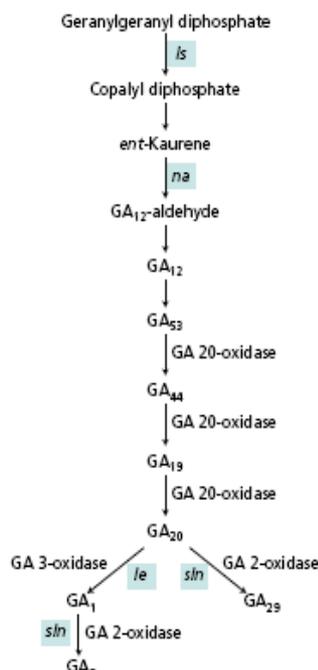
Alcune gibberelline naturali sono la GA₃, GA₁ e GA₄.

L'isopentenil pirofosfato è il precursore delle gibberelline ma anche delle citochinine, dell'acido abscissico e dei brassinosteroidi (regolatori della crescita).

Nelle gibberelline l'aggiunta di dimetildifosfato all'adenina porta alle citochinine ma successivi passaggi consentono la formazione delle gibberelline; dai terpeni deriva invece l'acido abscissico e le altre classi di ormoni.

Nel caso delle gibberelline lo scheletro dell'ent-caurene deriva da diterpeni (a lato un terpene); i diterpeni derivano dalla fusione di elementi a 45 atomi di carbonio. Il monoterpene (10 carboni) deriva dalla fusione di due terpeni (5 carboni ciascuno), in seguito l'aggiunta di un altro terpene genera i sesquiterpeni a 15 atomi di carbonio, e continuando il processo di aggiunta dei terpeni si arriva al diterpene a 20 atomi di carbonio. Le gibberelline derivano dalla ciclizzazione di un diterpene sebbene la loro origine sia sempre l'isopentenil pirofosfato, mentre nel caso dell'acido abscissico il processo arriva fino alla formazione dei tetraterpeni a 40 atomi di carbonio.

I luoghi nei quali sono prodotte le gibberelline sono principalmente i plastidi (formazione ent-caurene), il reticolo endoplasmatico (formazione della struttura dell'ormone GA₅₃) e l'ultimo stadio avviene nel citoplasma dove avviene la conversione del GA₅₃ in GA₁ (o GA₄ a seconda di dove è posizionato il sostituente) ed infine la formazione dell'ormone attivo con l'ossidazione completa del C20 da parte della GA₂₀ ossidasi (quindi rimane un composto a 19 atomi di carbonio), provocando la perdita di un carbonio a favore di un ossigeno. In seguito all'ossidazione si forma la prima gibberellina attiva (l'ossidazione è fondamentale!).



Anche la GA₃ ossidasi è molto importante perché porta alla formazione definitiva della gibberellina attiva ossidando il carbonio 3: mutazioni in questa proteina provocano gravi scompensi metabolici come nanismo (mutante *Le*).

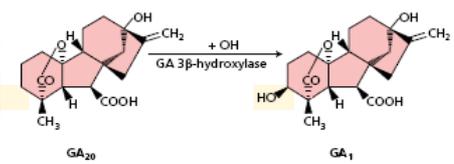


FIGURE 20.8 Conversion of GA₂₀ to GA₁ by GA 3β-hydroxylase, which adds a hydroxyl group (OH) to carbon 3 of GA₂₀.

L'inattivazione della gibberellina implica l'idrossilazione sul carbonio 2 dato dalla GA₂ ossidasi, i mutanti *Sln* in questa ossidasi invece provocano un fenotipo con un enorme allungamento della pianta.

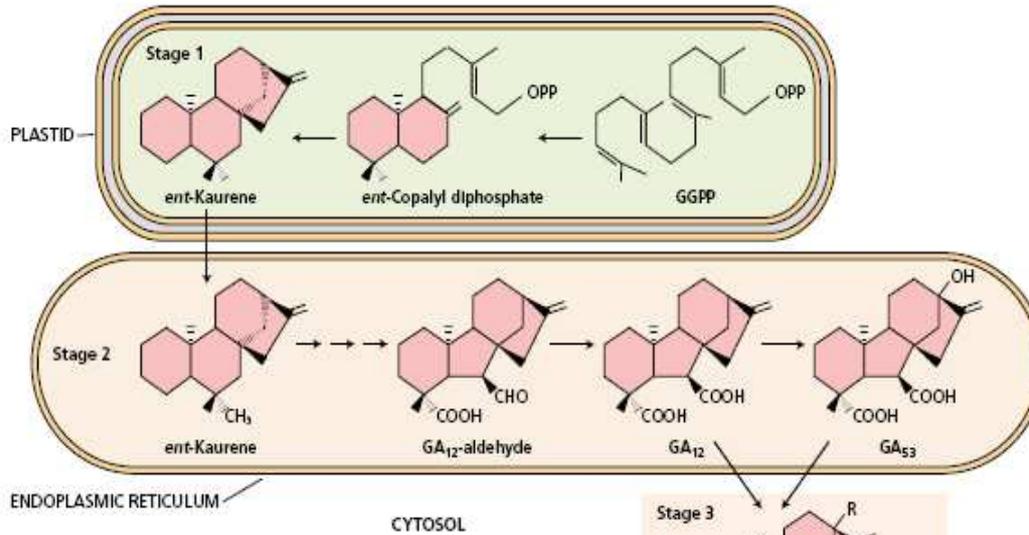
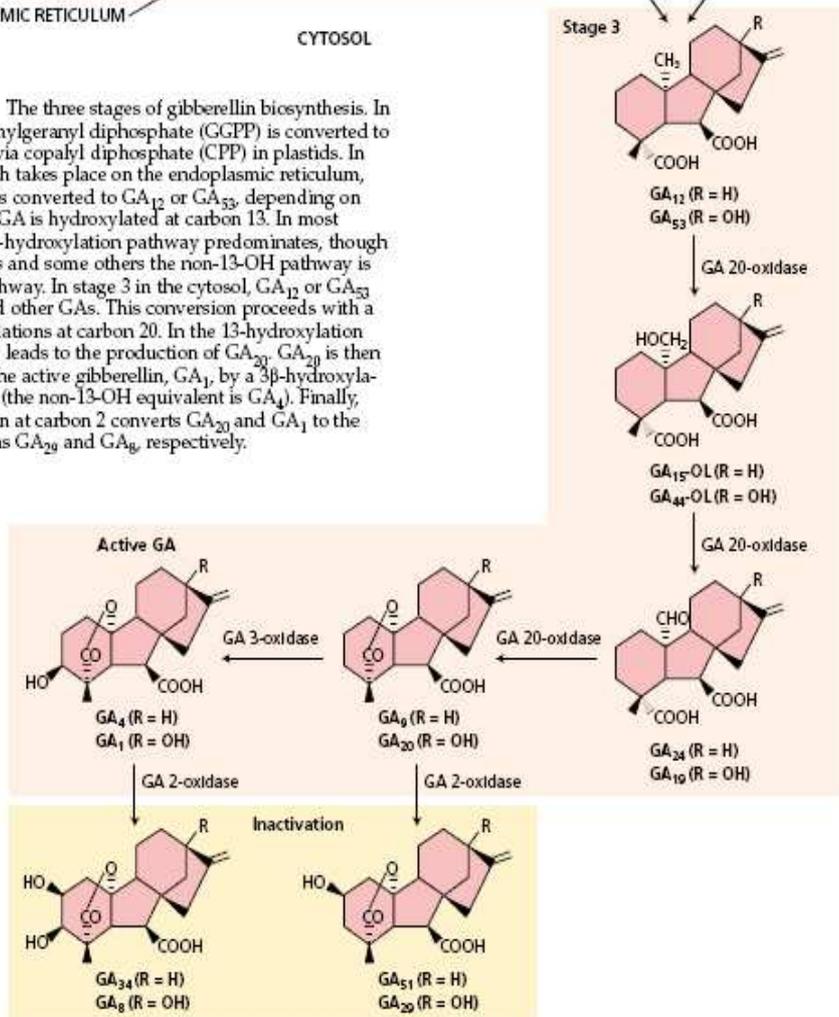


FIGURE 20.6 The three stages of gibberellin biosynthesis. In stage 1, geranylgeranyl diphosphate (GGPP) is converted to *ent*-kaurene via copalyl diphosphate (CPP) in plastids. In stage 2, which takes place on the endoplasmic reticulum, *ent*-kaurene is converted to GA₁₂ or GA₅₃, depending on whether the GA is hydroxylated at carbon 13. In most plants the 13-hydroxylation pathway predominates, though in *Arabidopsis* and some others the non-13-OH pathway is the main pathway. In stage 3 in the cytosol, GA₁₂ or GA₅₃ are converted other GAs. This conversion proceeds with a series of oxidations at carbon 20. In the 13-hydroxylation pathway this leads to the production of GA₂₀. GA₂₀ is then oxidized to the active gibberellin, GA₁, by a 3β-hydroxylation reaction (the non-13-OH equivalent is GA₄). Finally, hydroxylation at carbon 2 converts GA₂₀ and GA₁ to the inactive forms GA₂₉ and GA₈, respectively.



EFFETTI FISIOLGICI

L'effetto fisiologico delle gibberelline ricorda in parte quello delle auxine, in quanto se trattiamo una pianta con gibberelline si osserva un allungamento dell'internodo favorito da un potenziale idrico più negativo rispetto all'esterno che favorisce l'entrata di acqua e quindi una crescita per distensione (senza mitosi); tutto questo processo è mediato dall'attività delle XET (xiloglucan transglicosasi).



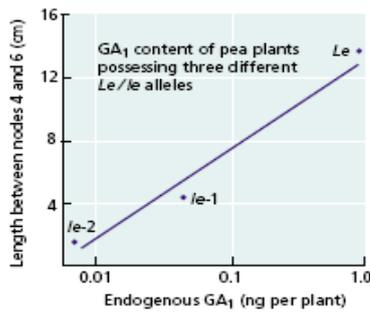


FIGURE 20.9 Stem elongation corresponds closely to the level of GA_1 . Here the GA_1 content in peas with three different alleles at the Le locus is plotted against the internode elongation in plants with those alleles. The allele $le-2$ is a more intense dwarfing allele of Le than is the regular $le-1$ allele. There is a close correlation between the GA level and internode elongation. (After Ross et al. 1989.)

Mutanti Le trattati con gibberelline esterne mostrano un normale allungamento dell'internodo, dato che la mutazione è a carico di una mancata sintesi dell'ormone. Ci sono vari livelli di questi mutanti dettati da differenti livelli di mancanza di gibberelline (in particolare GA_1), in quanto esiste una correlazione lineare tra allungamento del fusto e concentrazione dell'ormone endogeno (sono presenti diversi alleli Le).

Quando il riso è sommerso si abbassa la pressione parziale di O_2 e questo causa un ridotto metabolismo radicale; stesso discorso per le piante che sono sommerse se troppo annaffiate.

Per ovviare al problema dell'ipossia è sintetizzato etilene, il quale riduce l'acido abscissico, antagonista delle gibberelline, e ciò consente alle gibberelline di aumentare la crescita del fusto e quindi permettere all'organismo di emergere.

Nel riso il fungo *Fusarium* causa una grave malattia simile al bakanae, in quanto questo fungo produce una grande quantità di gibberelline le quali provocano una abnorme crescita e quindi indebolimento del fusto, infine morte dell'organismo.

Le gibberelline inizialmente promuovono la crescita per distensione, ma in seguito anche il differenziamento e quindi mitosi.

Le gibberelline attive sono principalmente la GA_1 , GA_4 e GA_3 , sebbene siano oltremodo di 100 le sostanze che abbiano uno scheletro gibberellinico; sono sintetizzate nei semi, nei frutti, in via di sviluppo, nei semi maturi (dove è presente il precursore GA_{12} ossia l'aldeide), nelle giovani gemme, negli internodi superiori e pare anche nelle radici.

Le gibberelline sono trasportate essenzialmente nel floema come intermedi, i quali una volta arrivati al tessuto bersaglio sono convertiti in gibberelline attive; la necessità di trasportare intermedi consiste nella loro non reattività (anche gli altri ormoni sono trasportati in forma coniugata o parzialmente inattiva, in quanto l'ormone deve svolgere la propria funzione solo nel tessuto bersaglio e non anche sui tessuti a contatto con il floema).

Nei semi le gibberelline sono sintetizzate poiché favoriscono la germinazione, in quanto stimolano la produzione di amilasi predisposta alla degradazione dell'amido conservato come riserva nel seme, che funge da riserva di energia e quindi consente lo sviluppo della piantina; parallelamente l'acido abscissico controlla invece la dormienza, quindi sono ormoni antagonisti, soprattutto nell'espressione del gene dell' α -amilasi. In seguito le gibberelline promuovono il differenziamento del tessuto.

Nei frutti le gibberelline ne stimolano l'accrescimento insieme alle auxine e all'etilene (processo controllato da questi tre ormoni).

Le gibberelline sono utilizzate anche per determinare il sesso dei fiori *imperfetti* (solo stami o solo pistilli) oppure *perfetti* (ermafroditi); le gibberelline inducono la formazione dei fiori maschili o femminili in piante diverse, regolando quindi la sessualità nei fiori, in quanto reprime lo sviluppo degli organi del sesso opposto.

Nelle biotecnologie le gibberelline sono utilizzate per il controllo della sessualità dei fiori che quindi determina una minore o maggiore fruttificazione e, in ultimo, la resa delle piante; neanche l'ingegneria genetica, come ad esempio la formazione di piante ibride, può regolare così finemente la sessualità come il dosaggio delle gibberelline. Commercialmente questi ormoni consentono di avere chicchi d'uva più grandi, in quanto la grandezza del chicco è determinata dalla lunghezza del picciolo, stimolato dalle gibberelline; innescano la germinabilità dei semi d'orzo nella produzione della birra, quindi la conversione di amido in maltosio (indispensabile per la produzione di questa bevanda tramite fermentazione); la forma delle mele ed il ritardo della senescenza degli agrumi sono altre applicazioni commerciali che aumentano il valore sul mercato di questi frutti; nella canna da zucchero le gibberelline stimolano l'aumento degli internodi in modo da avere più saccarosio nelle cellule parenchimatiche; il fenotipo a rosetta è stimolato dagli inibitori delle gibberelline che diminuiscono la lunghezza degli internodi consentendo in alcune specie (crisantemi e gigli) una raccolta più efficiente.

MECCANISMI ALLA BASE DEGLI EFFETTI FISIOLGICI

Allungamento dell'internodo: non c'è l'acidificazione determinata dalle H^+ -ATPasi e quindi nessun incremento nell'estruzione protonica; la fase di lag, ossia il tempo che intercorre prima che si possa determinare quest'effetto fisiologico, è più lunga della fase di lag dell'auxina (10 minuti), in quanto per le

gibberelline i tempi vanno dai 40 minuti alle 3 ore; la correlazione alla base dell'allungamento dell'internodo è con la XET (xiloglucatranglicolasi), la quale aumenta l'elasticità della parete permettendo la penetrazione delle espansine nella parete cellulare. La crescita indotta dalle auxine non è associata ad un incremento dell'attività di XET.

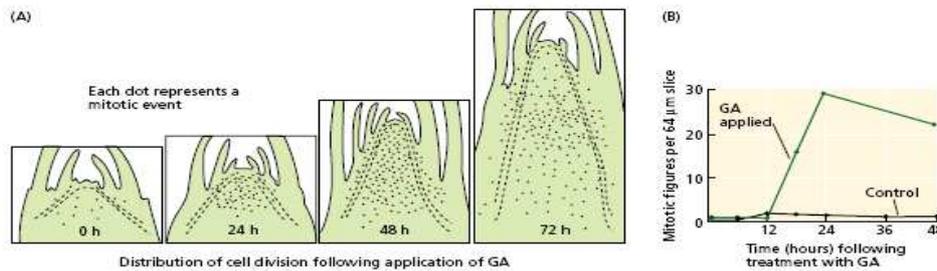
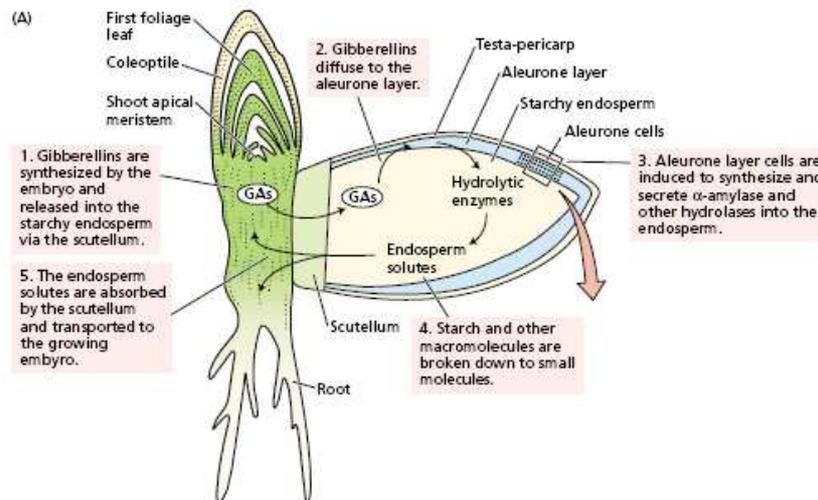


FIGURE 20.24 Gibberellin applications to rosette plants induce stem internode elongation in part by increasing cell division. (A) Longitudinal sections through the axis of *Samolus parviflorus* (brookweed) show an increase in cell division after application of GA. (Each dot represents one mitotic figure in a section 64 μm thick.) (B) The number of such mitotic figures with and without GA in stem apices of *Hyoscyamus niger* (black henbane). (After Sachs 1965.)

Divisione cellulare: in una pianta con un fenotipo a rosetta, l'aumento delle divisioni cellulari che avviene negli internodi è causata non solo dalla crescita per distensione ma anche dall'aumento delle divisioni cellulari, stimulate da un aumento delle protein chinasi ciclina-dipendenti cdc2 e delle M-ciclina (tipiche della mitosi).



Nel seme le gibberelline sono sintetizzate nella parte dell'embrione e rilasciate nell'*endosperma amilaceo*, e da qui diffondono nello *strato aleuronico* che circonda l'endosperma amilaceo stesso; nello strato aleuronico avviene la trascrizione e la sintesi dell' α -amilasi la quale, dopo essere stata prodotta, è rilasciata nell'endosperma e scinde l'amido, producendo glucosio. Nell'orzo lo strato aleuronico mostra come ci siano nuclei e vescicole di conservazione proteica pieni di *fitina* (sale dell'acido fitico), i quali aumentano di volume in seguito alla produzione di α -amilasi.

Le gibberelline aumentano gli mRNA dell' α -amilasi in quanto stimolati dal fattore di trascrizione *GA-MIB* che si lega ad un frammento del promotore del gene; il trascritto del gene MIB è upregolato mano a mano che è somministrata la gibberellina, ma questo processo precede la produzione dell' α -amilasi, quindi si pensa siano in relazione. L'elemento di risposta alla gibberellina prende il nome di *GARE* (gibberelline response element), il quale agisce solo per indurre la risposta alla gibberellina; in seguito sarà il *GARC* (Gibberellin response complex) legante i fattori di trascrizione ad iniziare la trascrizione grazie agli elementi a monte del promotore del gene di quest'enzima; gli studi sono stati compiuti con la tecnica del *mobility shift assay* del DNA, nella quale il DNA del campione trattato con gibberelline correva nell'elettroforesi meno velocemente del DNA di un campione non trattato, in quanto i fattori legati rallentano la corsa; questo ha permesso anche l'individuazione delle sequenze legate tramite studi di digestione con esonucleasi. Le gibberelline

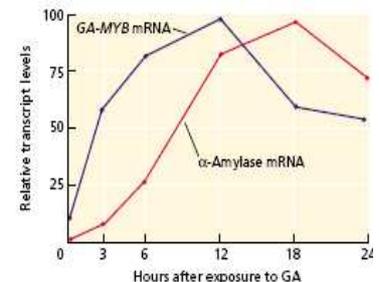
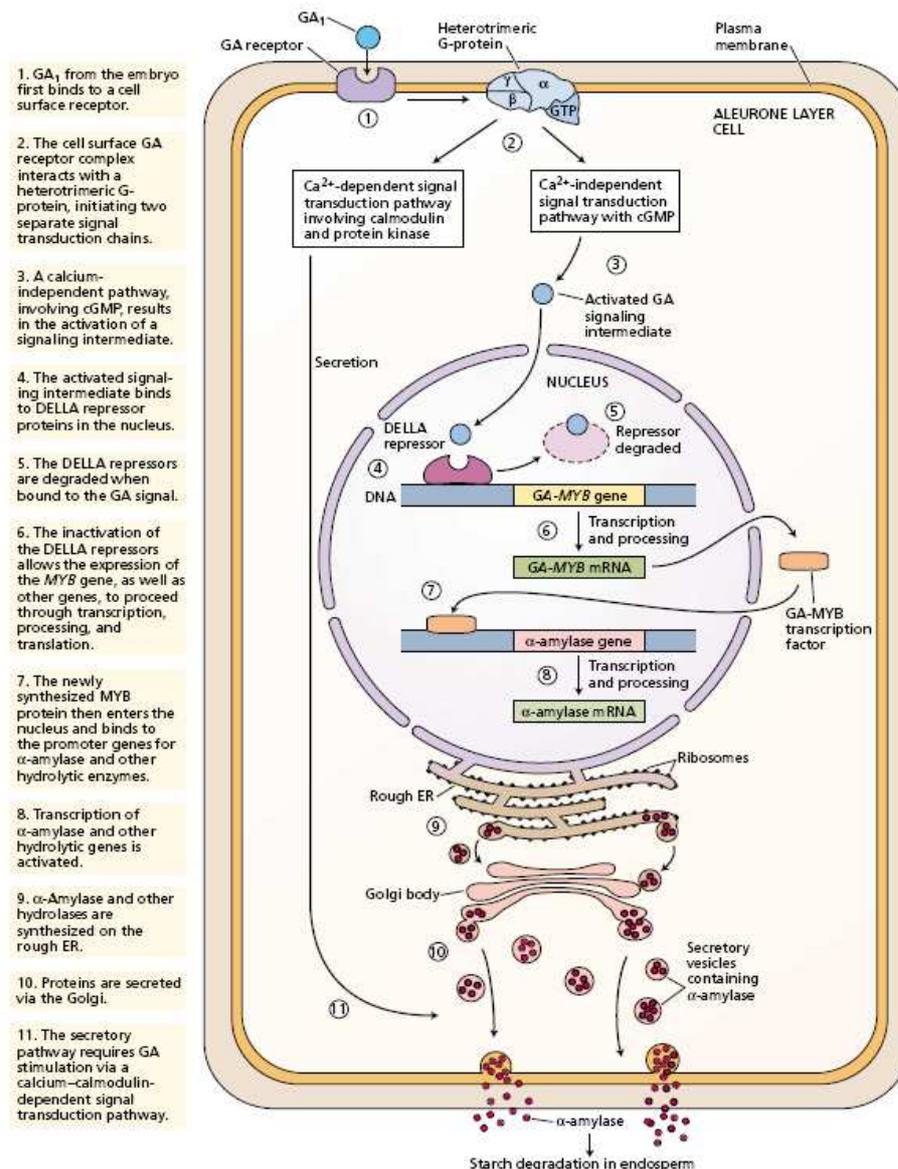


FIGURE 20.35 Time course for the induction of GA-MYB and α -amilase mRNA by gibberellic acid. The production of GA-MYB mRNA precedes α -amilase mRNA by about 5 hours. This result is consistent with the role of GA-MYB as an early GA response gene that regulates the transcription of the gene for α -amilase. In the absence of GA, the levels of both GA-MYB and α -amilase mRNAs are negligible. (After Gubler et al. 1995.)

inizialmente agiscono su fattori MIB già esistenti, attivandoli tramite fosforilazione; questo stesso meccanismo è regolato dall'acido abscissico il quale però reprime l'espressione del gene dell' α -amilasi. La cascata del segnale inizia grazie ad un recettore di membrana (si pensava che le gibberelline in quanto apolari avessero un recettore citoplasmatico, ma è errato) formato da eterotrimeri come negli animali, il quale attiva chinasi che fosforilano specifici substrati ed utilizzano o meno mediatori come il calcio e il GMPciclico; alcuni pathway sono calcio-dipendenti ma altri sono calcio-indipendenti (come il meccanismo che aumenta l'espressione del gene dell' α -amilasi). Nelle piante l'acido abscissico interviene ed induce il rilascio di calcio dal vacuolo o dal plasmalemma; normalmente il livello del calcio citosolico è mantenuto basso dal legame con la calmodulina e da alcune ATPasi calcio-dipendenti. La via calcio-dipendente induce il rilascio di vescicole secretorie dal Golgi liberando all'esterno α -amilasi, glucanasi e ribonucleasi; la via calcio-indipendente comporta l'attivazione di alcuni intermedi che si legano al repressore *DELLA* che reprime la trascrizione di GA-MYB (regolatore del promotore del gene dell' α -amilasi), inattivandolo; ciò comporta la trascrizione di geni come GA-MYB, la cui proteina una volta sintetizzata nel citoplasma torna nel nucleo per indurre la trascrizione del gene dell' α -amilasi. La secrezione dell' α -amilasi e di altre idrolasi richiede una via calcio-dipendente; mentre per la prima l'espressione non necessita di calcio (differenti vie di trasduzione del segnale per espressione e secrezione), per le altre idrolasi invece il calcio media anche la trascrizione genica. Per l' α -amilasi sia l'espressione che la secrezione sono controllate dalle gibberelline, le quali attivano (regolano la secrezione ma non l'espressione) anche le altre idrolasi come le glucanasi e le ribonucleasi (necessarie per fornire basi azotate e amminoacidi da affiancare al glucosio per la crescita della pianta)



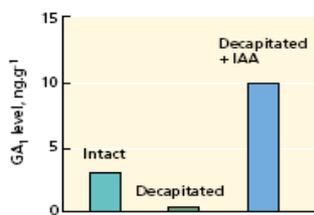
REGOLAZIONE

Le gibberelline sono regolate dal *fotoperiodo*; il fotoperiodismo è in relazione al tempo che le piante si danno per la fioritura, quindi regola se ad esempio una pianta è *longidiurna* (fiorisce con il giorno lungo) o *brevidiurna* (fiorisce durante i giorni brevi) o *neutrodiurna* (quando il giorno dura quanto la notte).

Alle nostre latitudini le piante tenderanno ad essere longidiurne, in quanto la formazione del frutto deve combaciare con un periodo favorevole per la disseminazione e la crescita della pianta: se fiorissero in autunno le giovani piantine non sopravviverebbero all'inverno!

La percezione del fotoperiodo è data dal *fitocromo*, il quale in realtà percepisce la durata della notte.

Un altro elemento che influisce sulla sintesi delle gibberelline, oltre al fotoperiodo, è anche la *temperatura*: alcune piante richiedono basse temperature (*stratificazione*) per germinare o fiorire (trattamento chiamato *vernalizzazione*, ossia la necessità da parte delle piante di attraversare un periodo di basse temperature, il quale scatena complessi processi fisiologici e biochimici che stimolano le zone meristematiche del germoglio alla formazione di fiori una volta terminato il periodo rigido). L'effetto sulla fioritura si può indurre con uno shock di freddo e in seguito ponendo il vegetale al caldo così da fargli produrre gibberelline endogene, ma poiché lo stesso risultato si ottiene con le gibberelline esogene significa che è questo tipo di ormone a regolare la vernalizzazione. Le gibberelline inoltre hanno un controllo retroattivo in quanto possono inibire la propria sintesi tramite un repressore di trascrizione (controllo a feedback negativo).



Anche l'auxina regola la biosintesi delle gibberelline, infatti in un esperimento se ad una pianta è decapitato il coleotile allora i livelli di gibberelline crollano, ma ciò non succede somministrando gibberelline esterne.

L'auxina prodotta dalla gemma apicale è necessaria per inibire la degradazione delle gibberelline si attua tramite l'idrossilazione sul carbonio 2; anche i messaggeri della GA₂ ossidasi diminuiscono mentre il livello dell'enzima GA₃ ossidasi aumenta forse in seguito alla stabilizzazione del proprio mRNA.

La concentrazione ormonale delle gibberelline è controllata quindi da diversi fattori: aumenta in seguito ad eventi esterni come fotoperiodo, freddo, ecc., mentre diminuisce a causa dell'idrossilazione sul carbonio 2.

Un altro sistema di regolazione della concentrazione delle gibberelline consiste nella traslocazione o nella coniugazione dell'ormone con zuccheri (inattivazione reversibile).

DOSAGGI ORMONALI

Per quanto riguarda il dosaggio le gibberelline non sono facili da misurare dal punto di vista chimico poiché non assorbono né fluorescono, né hanno altre caratteristiche chimiche peculiari, quindi si ricorre al biosaggio, ossia è preso in considerazione l'effetto fisiologico specifico come la *crescita dell'internodo* (relazione tra microgrammi di gibberellina ed allungamento dell'internodo indotto). Dagli anni '80 è stato possibile utilizzare l'HPLC e la spettrometria di massa per dosare le sostanze che prima non era possibile misurare a causa della loro mancata reattività ai normali metodi di determinazione. L'HPLC-MS aumenta l'amplificazione della separazione dell'eluato, che può essere analizzato direttamente con la spettrometria di massa rimuovendo il solvente dall'HPLC ed in seguito inviando l'eluato nello spettrometro di massa che, attraverso la frammentazione e l'analisi a livello molecolare con opportuni standard permette di identificare composti già noti (questo metodo è particolarmente usato per le gibberelline).

ACIDO ABCISSICO

L'*acido abscissico* (ABA) fu scoperto in quanto si vide che oltre ad ormoni come auxine, gibberelline o etilene, erano attivi nelle piante anche ormoni che inibivano gli stessi processi quali crescita, differenziamento e divisione cellulare.

Lo studio di questo tipo di ormone fu svolto ricercando i composti che promuovevano l'invecchiamento e l'abscissione fogliare (normalmente rallentata dall'auxina). Il lavoro sugli estratti grezzi, quando ancora non erano presenti le attuali tecniche chimiche e biochimiche, portò all'identificazione di molecole che controllano la dormienza, tra cui la cosiddetta *dormina*, che si scopri essere in realtà l'acido abscissico.

L'acido abscissico è una molecola composta da un anello a 6 atomi con un doppio legame ed una catena laterale composta da doppi legami alternati; nella molecola sono presenti gruppi ossidrilici e carbossilici, inoltre l'atomo di carbonio al quale si lega la catena è un centro stereogeno che ruota il piano del luce polarizzata con simmetria R o S a seconda di come si pone l'ossidrilico (legato allo stesso carbonio), quindi la molecola comunemente chiamata acido abscissico in realtà esiste sotto forma di enantiomeri R o S, ma anche *cis* o *trans*; ad esempio il meccanismo di chiusura degli stomi è insensibile alla forma (R)-*cis* dell'ABA, ma la forma *trans* è interconvertibile in quella *cis* se necessario.

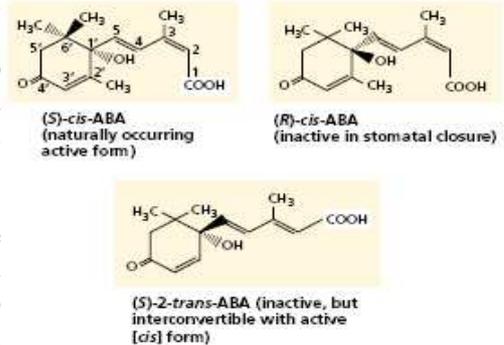


FIGURE 23.1 The chemical structures of the S (counterclockwise array) and R (clockwise array) forms of *cis*-ABA, and the (S)-2-*trans* form of ABA. The numbers in the diagram of (S)-*cis*-ABA identify the carbon atoms.

Negli stress l'ABA è fondamentale in quanto percepisce immediatamente una condizione di carenza d'acqua e quindi attiva subito la chiusura degli stomi, meccanismo determinato da una depolarizzazione del potenziale e da un flusso di ioni tale che la pressione di turgore si abbassa di molto e quindi gli stomi si chiudono in seguito all'entrata di acqua: l'iperpolarizzazione comporta l'apertura stomatica, mentre la depolarizzazione ne causa la chiusura.

Nelle piante Epatiche e nelle alghe al posto dell'ABA è presente l'*acido lunarico*, che quindi deve necessariamente legarsi ad un recettore diverso da quello dell'ABA; l'ABA invece è ubiquitario in tutte le piante vascolari.

BIOSINTESI

L'ABA è prodotto a partire dall'*isopentenil pirofosfato*, ossia la stessa via che porta alla sintesi di ciotchinine e gibberelline, carotenoidi ecc.; in realtà per arrivare all'ABA aldeide (precursore dell'acido abscissico in cui il carbossile diventa COOH), le piante biosintetizzano prima elementi a 15 atomi di carbonio che dopo diverranno a 40 atomi di carbonio (diterpeni), in seguito attraverso la via della *violaxantina* si forma l'immediato precursore dell'ABA. Lo *xantoxale*, precursore dell'ABA aldeide, ha un'attività di inibitore della crescita; è trasformato in ABA aldeide nel citosol, mentre gli altri passaggi avvengono nel cloroplasto; i mutanti che non riescono a chiudere gli stomi hanno mutazioni nell'enzima che trasforma la funzione aldeidica in funzione carbossilica.

L'acido abscissico può essere inattivato o tramite coniugazione con zuccheri oppure tramite *ossidazione*, quest'ultima porta alla formazione di *acido faseico* (leggera attività residua) o all'*acido diidrofaseico* (completamente inattivo)

Questo ormone induce dormienza nei semi e quindi è un'antagonista delle gibberelline e degli ormoni che in generale promuovono la germinazione; l'ABA (e anche l'acido faseico) controlla la trascrizione del gene dell' α -amilasi inibendola a livello dello stesso promotore controllato dalle gibberelline.

Negli altri ormoni la *coniugazione* con il glucosio porta alla inattivazione temporanea e reversibile dell'ormone che può essere utile anche per la conservazione, ma nell'acido abscissico invece determina la completa inattivazione irreversibile.

L'ABA avendo un carbossile COOH terminale, si può considerare un acido debole in equilibrio con la sua forma dissociata, quindi esiste sotto forma di ABA⁻ e ABAH.

L'ABA può accumularsi nei cloroplasti con processi di dissociazione della componente dell'acido debole che permette ad esempio all'ABA presente nel citosol di attraversare la membrana cloroplasmatica; qui l'ABA⁻ rimane confinato nello stroma alcalino (l'alcalinizzazione deriva dall'attività fotosintetica che porta il pH dello stroma ad 8) dal quale l'ormone non può più uscire, dato che il pH del citoplasma era circa 7 e quindi

esisteva anche in forma dissociata. La variazione della concentrazione ormonale può essere regolata anche da variazioni del pH interno e pH esterno.

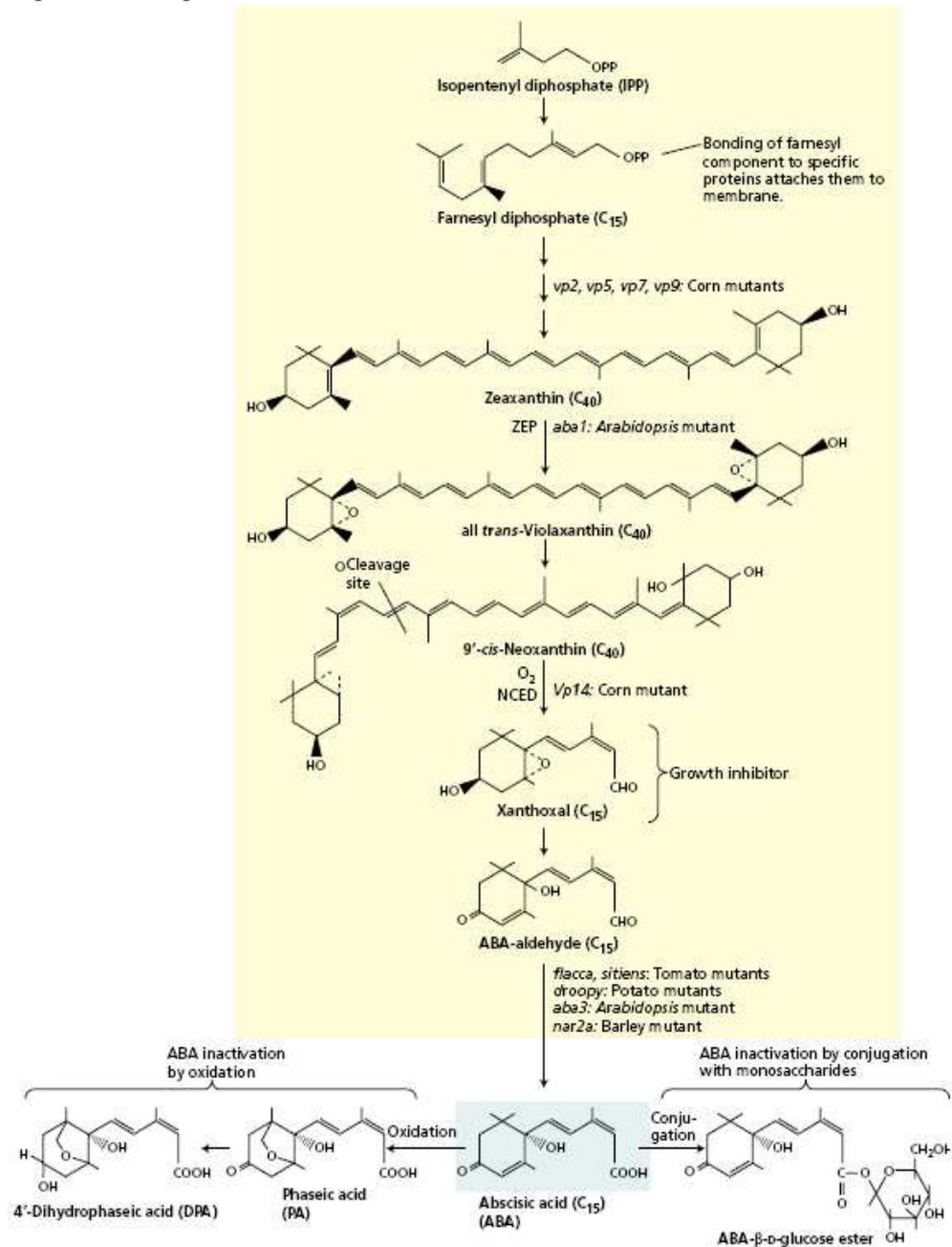
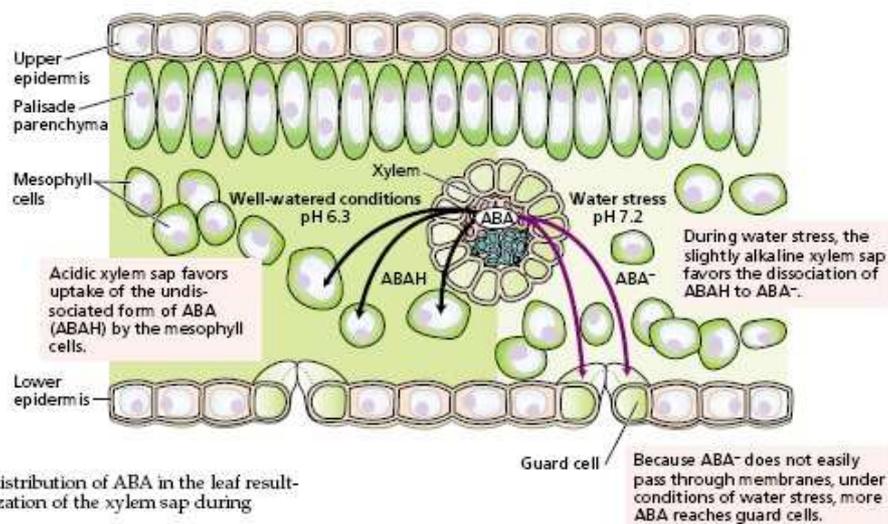


FIGURE 23.2 ABA biosynthesis and metabolism. In higher plants, ABA is synthesized via the terpenoid pathway (see Chapter 13). Some ABA-deficient mutants that have been helpful in elucidating the pathway are shown at the steps at which they are blocked. The pathways for ABA catabo-

lism include conjugation to form ABA-β-D-glucosyl ester or oxidation to form phaseic acid and then dihydrophaseic acid. ZEP = zeaxanthin epoxidase; NCED = 9-cis-epoxy-carotenoids dioxygenase.

EFFETTI FISIOLGICI



Chiusura stomatica: nel momento in cui il suolo si secca e quindi si abbassa il potenziale idrico fogliare (1 o 2 giorni durante i quali la pianta non è annaffiata), aumenta la concentrazione di ABA e parallelamente la resistenza stomatica; questi effetti scompaiono quando si riannaffia la pianta. Questa condizione di stress non è anomala ma si presenta spesso in quanto l'apporto idrico in una pianta varia notevolmente e non è costante. La chiusura stomatica è data da un cambiamento di pH nel succo stomatico: in condizioni di buona idratazione lo xilema è lievemente acido (pH di 6.3) e nelle cellule del mesofillo fogliare è facilitato l'uptake di ABA indissociato. In condizioni di stress idrico si ha una lieve alcalinizzazione che porta il pH da 6.3 a 7.2, portando alla dissociazione dell'ABA-H in ABA⁻, che entra più facilmente nelle cellule di guardia rispetto alle cellule del mesofillo (la concentrazione totale di ABA non varia).

Dormienza di semi e gemme: la dormienza rappresenta la fase di quiescenza; dopo la maturazione del seme avviene la disidratazione, quindi l'ABA ha una funzione protettiva sul seme in quanto promuove l'accumulo di proteine di riserva durante l'embriogenesi che verrà utilizzata durante lo sviluppo come riserva di amminoacidi (per questo molti semi sono, dal punto di vista nutrizionale, ottimi sostituenti della carne animale). L'acido abscissico, essendo un antagonista delle gibberelline, inibisce il processo di germinazione precoce impedendo la produzione precoce di α -amilasi. La dormienza è regolata in modo *meccanico* in quanto il tegumento impermeabilizza impedendo l'entrata di acqua e ossigeno; l'ossigeno se entrasse attiverebbe la respirazione mitocondriale, necessaria negli stadi iniziali della vita di una pianta in quanto non ancora in grado di compiere fotosintesi, ma solo di usare le proprie riserve. Oltre all'inibizione di tipo meccanico c'è ne è anche un'altra di tipo *biochimico* e fisiologico, ossia inibitori di idrolasi.

La dormienza è regolata dal rapporto ABA/ gibberelline: l'effetto degli ormoni avviene in tempi diversi, in quanto è necessaria l'attività dell'acido abscissico per mantenere la dormienza fino a che non ci siano le condizioni di sviluppo necessarie alla crescita della pianta: quando il seme raggiunge la maturità, la concentrazione di ABA si abbassa.

Le proteine che proteggono il seme dalla disidratazione si chiamano *LEA*, sono molto idrofile con residui molto polari che permettono loro di creare un effetto solvente all'interno del seme, in quanto la disidratazione potrebbe portare a cristallizzazione.

La durata della dormienza è regolata dalla temperatura, dalla stratificazione e dalla luce, in particolare il fotoperiodo (rapporto luce/ buio): alcune piante percepiscono la quantità di buio ed in base a questa si attivano meccanismi che possono portare a germinazione (varia da pianta a pianta). Riguardo l'inibizione della germinazione esiste un effetto dell'ABA chiamato *viviparia*, ossia la possibilità di germinazione dell'embrione sulla pianta madre per quanto riguarda semi che in realtà dovrebbero germogliare a terra qualora le condizioni fossero opportune; questo meccanismo si verifica quando è presente una alta umidità, riscontrata per esempio nelle mangrovie. La dormienza delle gemme invece è controllata principalmente dalle citochinine e gibberelline, sebbene l'ABA debba controllare il loro bilanciamento.

Abscissione fogliare e senescenza (insieme ad altri ormoni): l'ABA stimola la senescenza delle foglie (ingiallimento) ed in seguito la loro caduta; l'etilene interviene solo in seguito e l'ABA ha la caratteristica di promuovere ed aumentare la sintesi di etilene.

Uptake di acqua: l'ABA stimola il flusso idrico e la conduttività idraulica nelle radici: l'acqua è traslocata per breve distanza e l'aumento della conduttività consente di trasportarla per lunghe distanze; tutto ciò grazie al movimento secondo potenziale idrico (da maggiore a minore), il quale dipende dalla quantità di acqua ma anche dalla resistenza presente. L'ABA aumenta la *conduttività idraulica* (acqua /area*tempo) agendo sull'aquaporina che permette l'aumento del flusso di acqua, la quale non passa più passivamente, ma grazie a questa proteina di trasporto. L'ABA inoltre stimola la crescita delle radici a basso potenziale idrico: in condizioni di stress idrico si crea un abbassamento del potenziale idrico che stimola la crescita radicale affinché possano essere raggiunte nuove zone ricche d'acqua; in condizioni di stress idrico il rapporto radici/germogli è aumentato quindi dall'acido abscissico.

In sostanza, in condizioni di stress idrico l'acido abscissico permette la maggiore velocità di traslocazione della poca acqua presente, innesca la chiusura degli stomi per ridurre le perdite e favorisce la crescita delle radici per raggiungere nuovi siti ricchi di acqua.

BIOSAGGI

I biosaggi si basano sugli effetti fisiologici caratteristici come la *chiusura stomatica*: è un saggio sensibile e specifico che permette di rilevare concentrazioni fino a 10^{-9} M di ABA; accanto ai biosaggi ci sono anche le tecniche RIA ed i saggi immunologici. Possono essere utilizzati anche i metodi chimici come HPLC o cromatografia.

Il recettore dell'ABA non è stato identificato, sebbene diversi esperimenti hanno dimostrato il legame a siti sia intracellulari che extracellulari (più recettori possibili); non basta un legame per provare che una molecola sia un recettore, ma è necessaria l'evidenza anche di una risposta fisiologica reale: nell'ABA questo ancora non è stato identificato.

MECCANISMI D'AZIONE

I meccanismi di azione dell'ABA sono principalmente:

- aumento del calcio citosolico, in relazione alla chiusura stomatica
- alcalinizzazione del pH citosolico
- depolarizzazione del plasmalemma, che coincide con l'aumento del calcio citosolico: entrambi inducono la chiusura stomatica

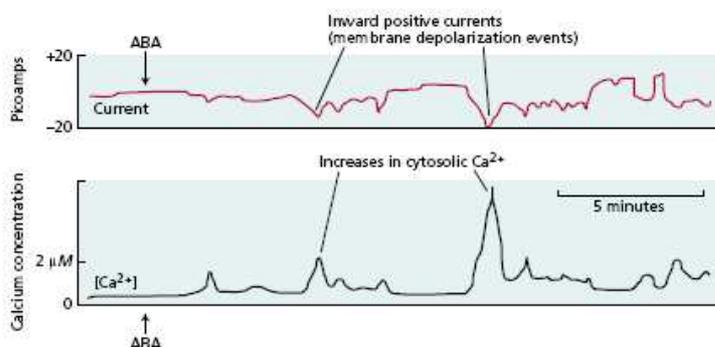


FIGURE 23.8 Simultaneous measurements of ABA-induced inward positive currents and ABA-induced increases in cytosolic Ca^{2+} concentrations in a guard cell of *Vicia faba* (broad bean). The current was measured by the patch

clamp technique; calcium was measured by use of a fluorescent indicator dye. ABA was added to the system at the arrow in each case. (From Schroeder and Hagiwara 1990.)

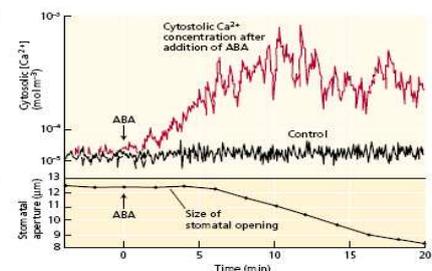


FIGURE 23.9 Time course of the ABA-induced increase in guard cell cytosolic Ca^{2+} concentration (upper panel) and ABA-induced stomatal aperture (lower panel). (From Mansfield and McAinsh 1995.)

- attivazione dei canali ionici

Ci sono fosfatasi e chinasi coinvolte nel meccanismo di azione, ad esempio i geni ABI1 e ABI2 codificano per una serina e treonina fosfatasi (rispettivamente) il cui fenotipo mutato non dà risposta all'ABA: sono regolatori negativi della risposta. Sono presenti inoltre dei fattori di trascrizione ABA-dipendenti che agiscono a livello della trascrizione del gene dell' α -amilasi come repressori, sullo stesso sito dove si legano le gibberelline.

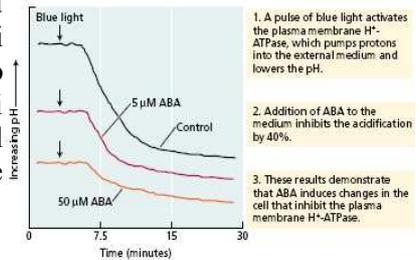


FIGURE 23.11 ABA inhibition of blue light-stimulated proton pumping by guard cell protoplasts. A suspension of guard cell protoplasts was incubated under red-light irradiation, and the pH of the suspension medium was monitored with a pH electrode. The starting pH was the same in all cases (the curves are displaced for ease of viewing). (After Shimazaki et al. 1986.)

Il modello prevede che tramite il legame dell'acido abscissico ad un recettore non ancora identificato, si inneschi la formazione di ROS (specie reattive dell'ossigeno) come H_2O_2 e anione superossido, i quali normalmente sono intermedi dannosi che possono innescare tumori, combattuti dagli antiossidanti, ma in situazioni come questa rappresentano un segnale che attiva il canale di membrana del calcio, promuovendo l'aumento del calcio citosolico dovuto sia all'entrata del calcio dall'esterno, che dalla fuoriuscita del calcio dall'interno del vacuolo.

Contemporaneamente l'ABA aumenta anche i livelli di IP_3 , stimolatore del rilascio di calcio dai compartimenti interni come il vacuolo, innescando un processo secondo il quale più calcio entra nel citosol, più il calcio è rilasciato dal vacuolo. L'aumento del calcio intracellulare blocca i canali di entrata del potassio e l'aumento interno di calcio promuove l'apertura dei canali di fuoriuscita degli anioni; la minore entrata di potassio e la contemporanea fuoriuscita di anioni dal citosol causa una depolarizzazione della membrana (diventa più positiva); l'aumento del calcio e del pH citosolico blocca la pompa protonica che estrude H^+ all'esterno. In seguito la depolarizzazione del plasmalemma attiva i canali di uscita del potassio.

1. ABA binds to its receptors.
2. ABA-binding induces the formation of reactive oxygen species, which activate plasma membrane Ca^{2+} channels.
3. ABA increases the levels of cyclic ADP-ribose and IP_3 , which activate additional calcium channels on the tonoplast.
4. The influx of calcium initiates intracellular calcium oscillations and promotes the further release of calcium from vacuoles.
5. The rise in intracellular calcium blocks K^+ channels.
6. The rise in intracellular calcium promotes the opening of Cl^- channels on the plasma membrane, causing membrane depolarization.
7. The plasma membrane proton pump is inhibited by the ABA-induced increase in cytosolic calcium and a rise in intracellular pH, further depolarizing the membrane.
8. Membrane depolarization activates K^+ channels.
9. K^+ and anions to be released across the plasma membrane are first released from vacuoles into the cytosol.

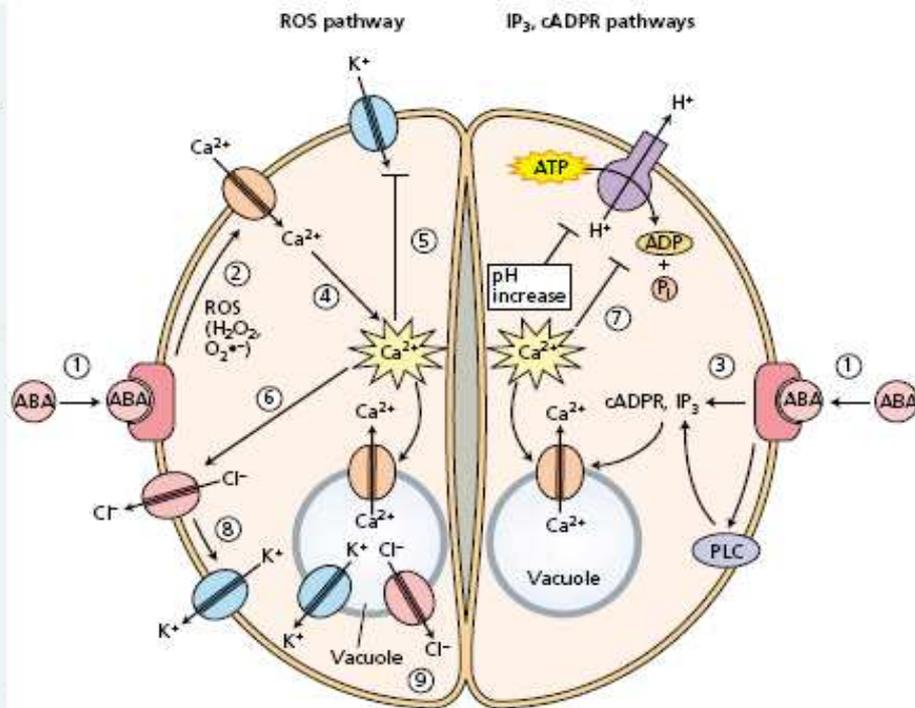


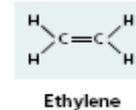
FIGURE 23.12 Simplified model for ABA signaling in stomatal guard cells. The net effect is the loss of potassium and its anion (Cl^- or malate $^{2-}$) from the cell (R = receptor; ROS = reactive oxygen species; cADPR = cyclic ADP-ribose; G-protein = GTP-binding protein; PLC = phospholipase C.)

L'ETILENE

Questo ormone fu identificato agli inizi del Novecento in quanto era stato notato che gli alberi che crescevano vicino ai lampioni della luce (i quali andavano ad etilene) mostravano fusti più corti e spessi e le foglie cadevano più velocemente, e da studi successivi si capì che questo fenotipo era determinato dall'*etilene*.

Sempre agli inizi del secolo scorso il dottorando russo Neljubow individuò la *risposta tripla*, ossa la risposta tipica dell'etilene, che consiste in:

- allungamento ridotto del fusto
- aumento dell'accrescimento laterale
- ripiegamento della parte apicale su se stessa

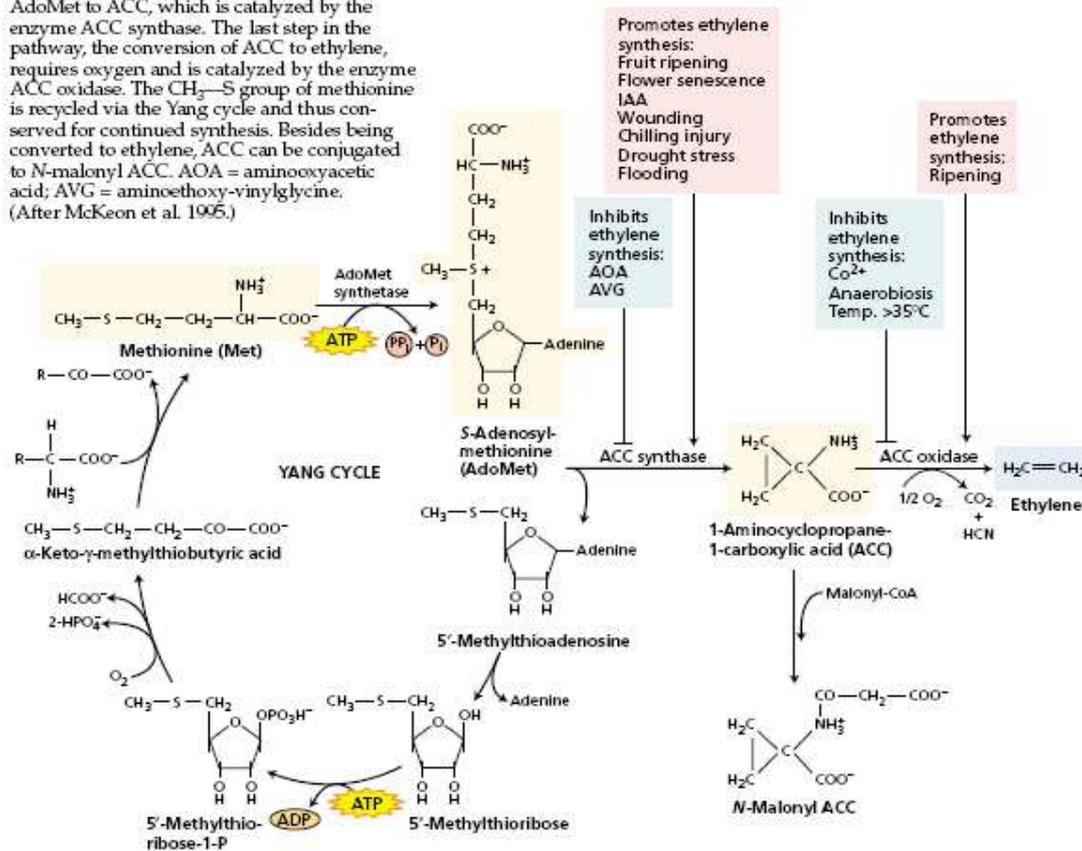


L'etilene inoltre stimola le radici ad accrescersi in maniera orizzontale (*diageotropismo*).

L'etilene è un ormone gassoso, infatti il dottorando russo notò che ventilando il laboratorio gli effetti fenotipici scomparivano; la via metabolica completa fu scoperta nel 1934 da Gayne, il quale lo classificò come ormone vegetale.

BIOSINTESI

FIGURE 22.1 Ethylene biosynthetic pathway and the Yang cycle. The amino acid methionine is the precursor of ethylene. The rate-limiting step in the pathway is the conversion of AdoMet to ACC, which is catalyzed by the enzyme ACC synthase. The last step in the pathway, the conversion of ACC to ethylene, requires oxygen and is catalyzed by the enzyme ACC oxidase. The $\text{CH}_3\text{-S}$ group of methionine is recycled via the Yang cycle and thus conserved for continued synthesis. Besides being converted to ethylene, ACC can be conjugated to *N*-malonyl ACC. AOA = aminooxyacetic acid; AVG = aminoethoxy-vinylglycine. (After McKeon et al. 1995.)



Il precursore dell'etilene è l'*S-adenosil-metionina*, ossia una metionina che al gruppo S porta legata una adenosina: la carica positiva che viene a crearsi sullo zolfo spinge lo zolfo stesso a donare il gruppo che formerà l'etilene. Le reazioni di metilazione comprendono regolazioni biologiche, come la regolazione del DNA, e tutte queste reazioni possono usare come substrato l'*S-adenosil metionina* ed il tetraidrofolato come cofattore (fondamentale per le reazioni di sintesi dei nucleotidi).

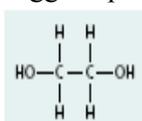
In questo ciclo la donazione del gruppo metile, catalizzata dalla ACC sintasi, porta alla rottura della molecola dando due prodotti: il 5-metiladenosina, ossia un'adenosina con legato un gruppo $\text{CH}_2\text{-S-CH}_3$, e l'ACC (*acido 1-aminociclopropan 1-carbossilico*, molecola ciclica). La prima riforma il substrato iniziale entrando in un ciclo rigenerativo (*ciclo di Yang*).

L'*ACC sintasi* è il primo enzima che porta alla biosintesi dell'etilene fortemente controllato da una serie di parametri fisiologici e non, come ad esempio i composti sintetici amminoossiacetico e amminoetossi glicina. La regolazione dell'etilene è importante perché inibendo la maturazione dei frutti sono evitate le perdite economiche conseguenti.

L'auxina aumenta l'espressione del gene dell'*ACC sintasi*; oltre a questo ormone, eventi fisiologici che ne stimolano la produzione sono la maturazione del frutto, la senescenza dei fiori, le ferite, stress come siccità, allagamento e gelo: è chiamato quindi *ormone della maturità*. Quando la pianta subisce alcuni tagli sul tronco o le foglie, lo stress meccanico derivante comporta un segnale che induce coagulazione e rigenerazione. Quando a livello floematico è presente una ferita, questa inizialmente cementifica la zona con callosio, in seguito il differenziamento del meristema floematico rigenera il tessuto.

L'*ACC* in seguito diviene substrato dell'*ACC ossidasi*, il quale porta alla formazione dell'etilene e alla liberazione sia di anidride carbonica che di acido cianidrico, con consumo di mezza molecola di O_2 ; l'*ACC* può oppure essere sequestrato tramite reazione con malonil-CoA formando *malonil-ACC*, e questa è la via di inibizione della sintesi di etilene, il coniugato però non ne comporta la perdita ma solo il sequestro.

L'attività dell'*ossidasi* è inibita da anaerobiosi, cobalto, temperature elevate superiori ai 35° ; la maturazione del frutto invece è un evento che stimola la sintesi di *ACC ossidasi*. Ci sono comunque piante che pur vivendo in climi tropicali riescono a produrre costantemente etilene, e piante che invece ne producono in maggior quantità con un picco tipico del climaterio della respirazione.



Ethylene glycol

L'etilene può essere trasformato in *glicole etilenico* tramite ossidazione parziale di entrambi gli atomi di carbonio, oppure può essere trasformato in *ossido di etilene* ed in seguito in *acido ossalico* o, continuando, CO_2 .

DOSAGGI ORMONALI

Per quanto riguarda il *biosaggio*, il test fisiologico utilizzato è la *risposta tripla*: per analizzare la quantità di etilene prodotto si deve sigillare la pianta con dei sacchetti in modo che l'etilene rilasciato rimanga intrappolato e sia attivo; questo test è il più sensibile.

Sono disponibili anche il metodo chimico di *gas-cromatografia* (essendo l'etilene un gas), che si attua analizzando nel gas-cromatografo gli estratti vegetali.

Per l'analisi degli effetti pleiotropici dell'etilene si usa una tabella, poiché come per altri ormoni anche per l'etilene ci sono fenomeni, ossia effetti fisiologici, che sembrano contrastanti; in realtà dipende sia dalla fase di crescita della pianta in cui interviene l'etilene, sia dal meccanismo con cui l'etilene attiva le vie specifiche.

EFFETTI FISILOGICI

In agricoltura l'etilene è importante per gli effetti sui fiori e sui frutti, i quali una volta erano erroneamente attribuiti all'auxina: questa in realtà promuove solo la sintesi dell'etilene.

Gli effetti fisiologici dell'etilene sono raggruppabili sotto il nome di *risposta tripla*: accorciamento del fusto e crescita orizzontale, ma anche il ripiegamento delle foglie verso il basso (*epinastia*), sebbene quest'ultimo effetto sia ancora poco chiaro. Il tiosolfato d'argento è un inibitore della sintesi di etilene, ma la sua rimozione scatena una senescenza più accelerata; anche i peli radicali nei germogli di lattuga sono stimolati dalla presenza di etilene.

Per quanto riguarda l'*epinastia*, sia l'*ipossia* che l'*anossia* (derivanti ad esempio dalla sommersione) agiscono come eventi di stimolo per la produzione di *ACC*, agendo sull'*ACC sintasi*, mentre l'*ACC ossidasi* ne è inibita in quanto non è presente ossigeno da utilizzare: si accumula quindi *ACC* che non può essere trasformato in etilene nelle radici, per questo è inviato nelle parti aeree della pianta dove origina il fenotipo visto precedentemente.

In alcune piante che vivono sommerse la presenza minima di ossigeno porta alla produzione di un aerenchima lisogeno, un insieme di canali derivanti da eventi apoptotici che consentono all'aria di penetrare nella parte del fusto che è sommersa: il segnale è dato proprio dall'etilene.

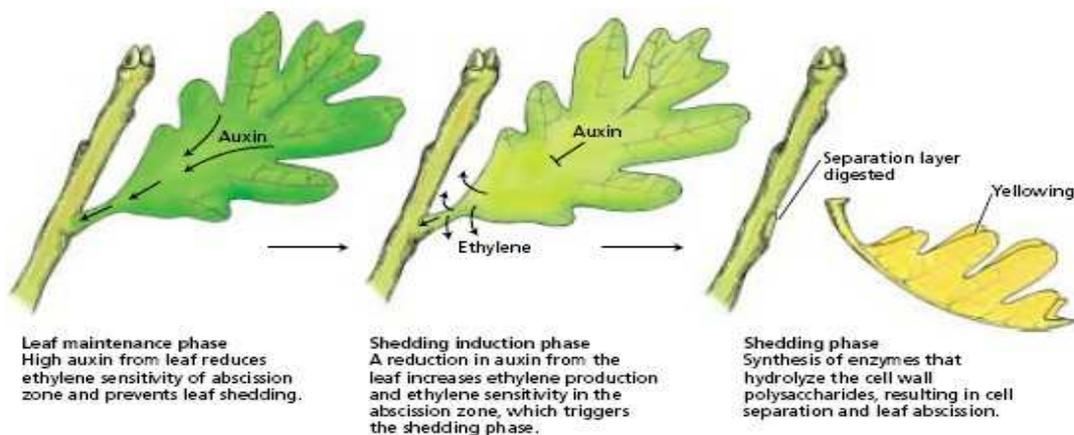
Se una pianta cresce in un'atmosfera con etilene, si osserva un ripiegamento dell'uncino apicale, la crescita delle cellule dell'internodo è inibita ed è stimolata l'espansione laterale delle cellule: si ringonfiano e divengono tonde, non allungate: ciò è determinato dalla disposizione delle microfibrille di cellulosa da parte della cellulosa sintasi che ne modifica la direzione di da trasversale a longitudinale. Fisiologicamente questa

situazione si osserva quando la pianta in germinazione trova un ostacolo sul cammino per emergere dal terreno: quando l'uncino apicale tocca un ostacolo, si ripiega a causa della produzione di etilene, finché il germoglio non riesce a tornare alla luce.

Tutti questi fenomeni appena descritti sono inibiti dalla luce rossa, ma attivati dalla luce rosso lontano, quindi il fitocromo è importante nella fisiologia dell'etilene.

Nella maturazione dei frutti è accertata la relazione tra aumento della respirazione cellulare (climaterio) e successiva produzione di etilene, nei frutti climaterici, che hanno un picco della respirazione cellulare durante la maturazione (picco di CO_2), altri invece no: tra i frutti climaterici ci sono i frutti tropicali (ad esempio l'avocado), invece i frutti non climaterici sono rappresentati da limoni, arance, ananas, unva, fragole, anguria e peperone, ai quali se viene dato etilene non si registra un aumento della maturazione ma solo una temporanea accelerazione della respirazione; nei frutti climaterici la iniziale produzione di etilene consente autonomamente di continuarne la sintesi (l'etilene stimola la sua stessa sintesi), situazione non ritrovata nei frutti non climaterici.

Nei tessuti vegetali dei frutti climaterici i livelli di produzione dell'etilene, variano da 0.01 a 130; naturalmente il picco della sintesi di etilene è preceduto dal picco della sintesi del suo enzima, l'ACC sintasi; la produzione di etilene è stimolata anche alcuni giorni dopo la raccolta.



Per quanto riguarda gli effetti sull'abscissione fogliare, l'ABA e l'auxina variavano i loro livelli durante l'avvicinarsi della senescenza della foglia, ma è l'etilene che innesca il meccanismo di abscissione: per la fase di mantenimento l'auxina riduce la sensibilità del tessuto all'etilene (è presente un gradiente di auxina dalla foglia verso il picciolo), ma procedendo nella fase di induzione i livelli di auxina diminuiscono innescando l'aumento della sintesi di etilene, inoltre il tessuto diviene più sensibile all'etilene stesso; anche in questa situazione è evidente come un processo fisiologico sia governato da più ormoni.

Durante la fase di abscissione aumentano quegli enzimi che rendono possibile l'abscissione fogliare, quindi enzimi di lisi della parete cellulare, enzimi idrolitici dei polisaccaridi della parete, ecc...

L'abscissione è causata dalla lisi di 2/3 file di cellule: infatti i protoplasti risultanti dalla digestione delle pareti non sono più protetti osmoticamente dall'assunzione di acqua, la quale entra richiamata dal potenziale idrico cellulare più negativo; i protoplasti si gonfiano causando un allontanamento della foglia dal fusto, quindi indebolendo tutta la struttura che in seguito cadrà.

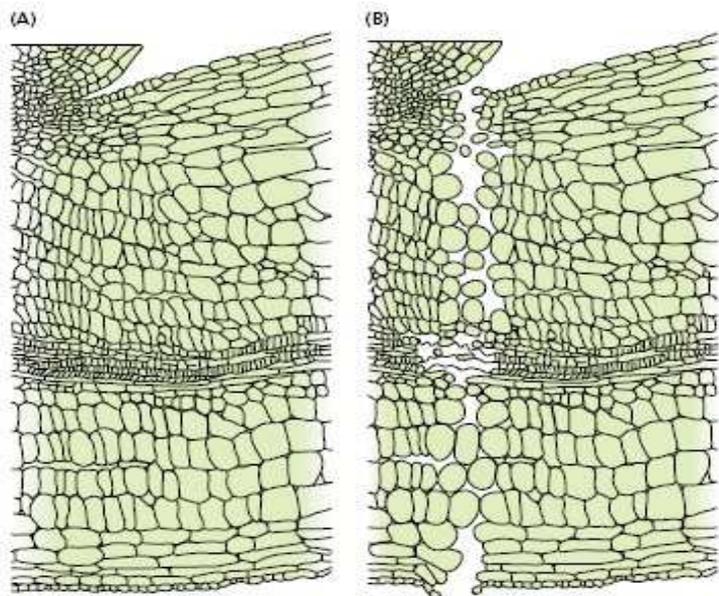


FIGURE 22.9 During the formation of the abscission layer, in this case that of jewelweed (*Impatiens*), two or three rows of cells in the abscission zone (A) undergo cell wall breakdown because of an increase in cell wall-hydrolyzing enzymes (B). The resulting protoplasts round up and increase in volume, pushing apart the xylem tracheary cells, and facilitating the separation of the leaf from the stem. (From Sexton et al. 1984.)

Il mutante trasformato con ETR1 non risponde all'etilene, quindi non presenta caduta fogliare neanche quando è affumicato con questo ormone: rimane quindi quasi sempre verde, aumenta la senescenza fogliare (in contrasto con le citochinine). Questo gene promuove anche l'allungamento delle specie acquatiche in quanto nella fase di allungamento la sintesi di etilene è inibita dai bassi livelli di ossigeno, permettendo il trasporto verso l'alto dell'ACC prodotto. La diminuzione di etilene alla radice innesca la diminuzione delle gibberelline.



FIGURE 22.12 Screen for the *etr1* mutant of *Arabidopsis*. Seedlings were grown for 3 days in the dark in ethylene. Note that all but one of the seedlings are exhibiting the triple response: exaggeration in curvature of the apical hook, inhibition and radial swelling of the hypocotyl, and horizontal growth. The *etr1* mutant is completely insensitive to the hormone and grows like an untreated seedling. (Photograph by K. Stepnitz of the MSU/DOE Plant Research Laboratory)

Anche l'etilene rompe la dormienza e promuove la germinazione. Interviene negli stress abiotici e biotici come quelli derivanti dai patogeni, dai funghi e dai batteri.

APPLICAZIONI COMMERCIALI

Commercialmente l'etilene è utilizzato per accelerare la maturazione dei frutti, per sincronizzare la fioritura e quindi la fruttificazione ad esempio nell'ananas, per accelerare l'abscissione fogliare, ma anche la determinazione del sesso nelle specie monoiche: la sincronizzazione di alcuni di questi eventi può migliorare l'efficienza della raccolta.

Un'altra applicazione importante sono gli inibitori dell'etilene usati in condizioni ad esempio di ipossia, alta concentrazione di anidride carbonica o di vuoto, situazioni che si riscontrano nei magazzini ad esempio, e l'inibizione dell'etilene ne permette la lunga conservazione.

Sono stati creati anche OGM antisenso per l'ACC sintasi nel pomodoro e per ACC ossidasi nella petunia (il fiore avvizzisce più lentamente).

RISPOSTA BIOCHIMICA

Per comprendere in che modo l'etilene dà un segnale e come questo sia accolto e tradotto in una risposta biochimica e di crescita o di una sua inibizione, sono stati fatti screening di tipo genetico in *Arabidopsis thaliana*, nella quale è stato possibile fare una mappatura genetica (accelerata dalla semplicità del genoma): gli screening per i mutanti che costitutivamente presentavano una risposta tripla furono messi per 3 giorni al buio all'aria, ed un mutante CTR1 mostrava una risposta tripla costitutiva come se fosse trattato con etilene. Il mutante che invece cresceva per 3 giorni al buio in un'atmosfera satura di etilene, ma privo di risposta tripla, venne chiamato ETR1.

Il gene ETR1 fu poi clonato con la tecnica del *chromosome walking*, ha una massa molecolare di 82.5 KDa e si scoprirono somoglianze con l'istidina chinasi batterica, in quanto presenta una regione transmembrana caratterizzata da due domini: uno amminoterminale che attraversa il plasmalemma tre volte e presenta il sito di legame all'etilene ed il dominio catalitico che è una istidina chinasi; alcune sottofamiglie presentano anche un dominio ricevente C-terminale con aspartato.

ETR1 è posizionato nel reticolo endoplasmatico; simili a ETR1 sono stati identificati altri geni che compongono quindi una superfamiglia: ETR2, ERS2, ERS1, EIN4.

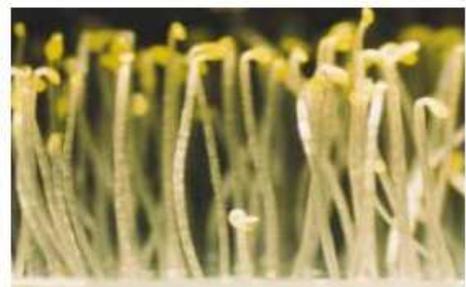


FIGURE 22.15 Screen for *Arabidopsis* mutants that constitutively display the triple response. Seedlings were grown for 3 days in the dark in air. A single *ctr1* mutant seedling is evident among the taller, wild-type seedlings. (Courtesy of J. Kieber.)

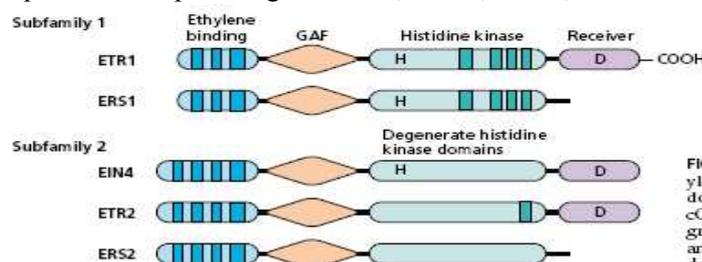


FIGURE 22.13 Schematic diagram of five ethylene receptor proteins and their functional domains. The GAF domain is a conserved cGMP-binding domain found in a diverse group of proteins. Note that EIN4, ETR2, and ERS2 have degenerate histidine kinase domains.

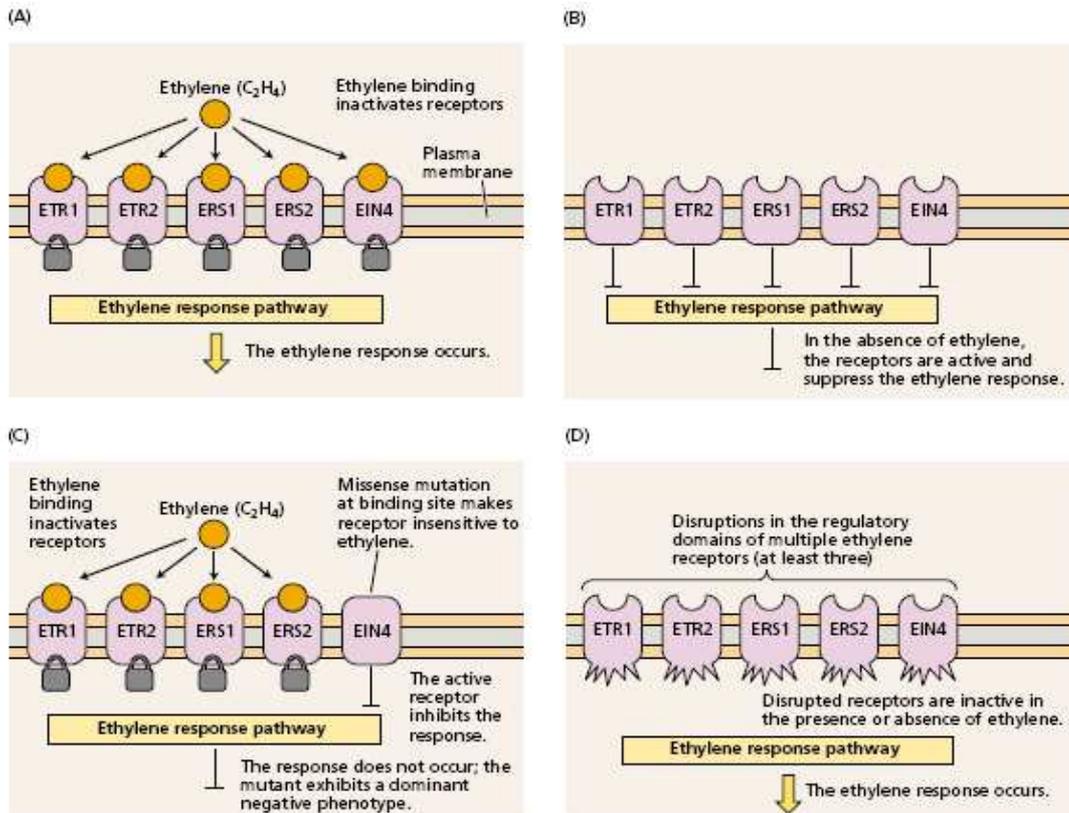


FIGURE 22.14 Model for ethylene receptor action based on the phenotype of receptor mutants. (A) In the wild type, ethylene binding inactivates the receptors, allowing the response to occur. (B) In the absence of ethylene the receptors act as negative regulators of the response pathway. (C)

A missense mutation that interferes with ethylene binding to its receptor, but leaves the regulatory site active, results in a dominant negative phenotype. (D) Disruption mutations in the regulatory sites result in a constitutive ethylene response.

Nel recettore dell'etilene è presente il rame per dare un'affinità più alta; il rame è legato alla proteina RAN1 necessaria per assemblare il recettore ETR1 (presente sotto forma di omodimero). CTR1 invece codifica per una protein chinasi serina-treonina, omologa alla protein chinasi RAS (struttura simile alle MAP chinasi). Nella pianta wt il legame all'etilene inattiva i recettori e permette che avvenga una risposta; in assenza di etilene il recettore regola negativamente i geni sotto controllo dell'ormone: queste proteine prima che si legghino l'etilene bloccano i geni di risposta. Quando l'etilene si lega al recettore (nei mutanti ETR1 non è possibile questo legame dato che è un dominante negativo) i geni si sbloccano e parte la sintesi di etilene. Un recettore mutante che invece non possiede più nessuno dei domini regolatori causa una risposta costitutiva anche in assenza dell'ormone.

TRASDUZIONE DEL SEGNALE

La proteina dimerica RAN1 coordina il rame come cofattore indispensabile ed è legata alla proteina ETR1 (istidina chinasi); questo complesso in assenza di etilene attiva la protein chinasi-RAF CTR1 la cui attività chinasi è responsabile della disattivazione dei geni della risposta, in quanto reprime il pathway tramite una cascata di MAP chinasi, le quali disattivano la proteina EIN-2, inibendo quindi l'attivazione del fattore di trascrizione EIN3. Quando l'etilene si lega al recettore ETR1, questo si fosforila e ciò causa la disattivazione del sistema che inibisce CTR1; si attiva quindi EIN2 che trascrive i geni necessari.

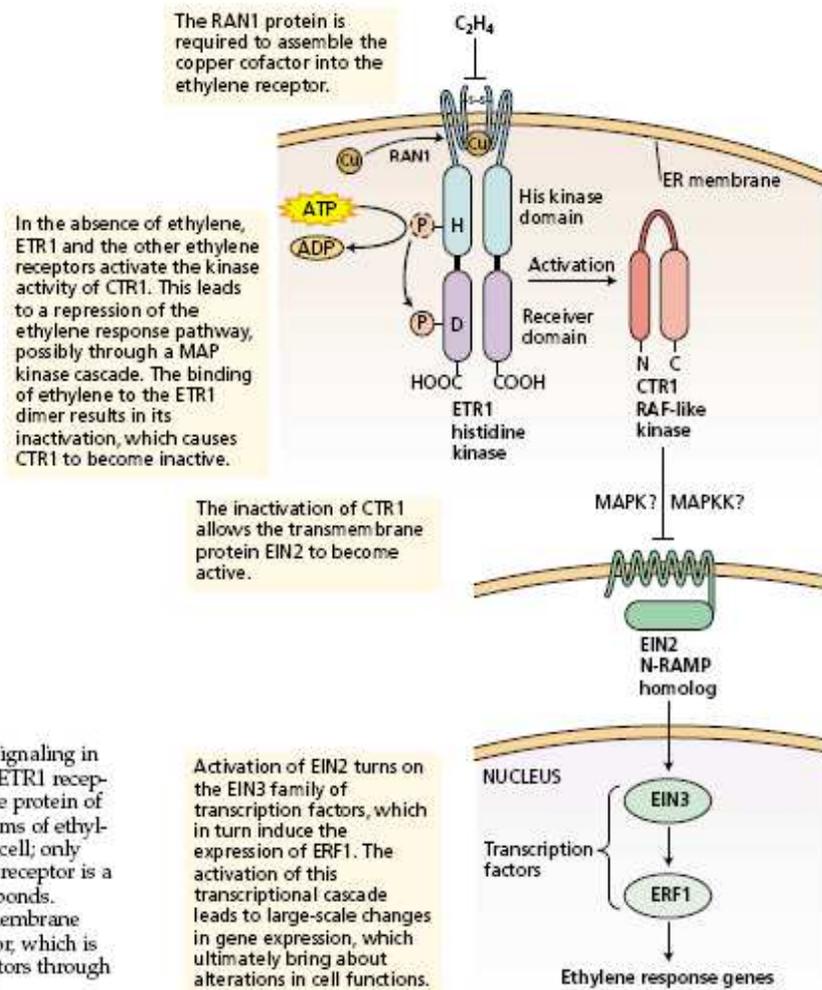


FIGURE 22.16 Model of ethylene signaling in *Arabidopsis*. Ethylene binds to the ETR1 receptor, which is an integral membrane protein of the ER membrane. Multiple isoforms of ethylene receptors may be present in a cell; only ETR1 is shown for simplicity. The receptor is a dimer, held together by disulfide bonds. Ethylene binds within the trans-membrane domain, through a copper co-factor, which is assembled into the ethylene receptors through the RAN1 protein.

IL FITOCROMO

Le luci attive nella risposta fisiologica vegetale sono la *luce bianca*, che nel suo completo spettro è utilizzata per la fotosintesi, ma anche *qualità spettrali* con un'attività fisiologica specifica derivante da recettori specifici: la luce blu ad esempio attiva il *fototropismo* così come la H⁺ ATPasi che regola i movimenti stomatici, e regola anche la ridistribuzione dei cloroplasti in quanto la luce incidente se eccessiva potrebbe danneggiare l'apparato fotosintetico, ma una luce troppo debole non permetterebbe la fotosintesi; questa qualità spettrale di luce blu è percepita dal *criptocromo*; la luce rossa regola la morfogenesi, ossia i cambiamenti della pianta dalla germinazione all'età adulta, ed è percepita dal *fitocromo*.

La luce rossa regola la fotomorfogenesi, ossia il differenziamento e l'inverdimento della pianta, ma anche l'inibizione dell'allungamento dell'ipocotile: data ad una pianta eziolata ne comporta la diminuzione della velocità di allungamento del fusto, lo sviluppo delle foglie e la sintesi di pigmenti fotosintetici (il fenotipo per passare da eziolato a fenotipo in piena luce necessita di questi cambiamenti che permettano la fotosintesi). Il fotorecettore colpito dalla luce traduce lo stimolo in una risposta fisiologica.

Negli anni '30 gli effetti morfogenetici si videro essere causati dalla luce rossa, ossia l'intervallo della luce visibile che va dai 650 ai 680 nm, ed essere soppressi invece dalla luce rosso lontano.

In un esperimento inizialmente era data una luce rossa che innescava i meccanismi sopra descritti, ma se dopo era fornita luce rossa lontana intorno ai 710-740 nm, allora si presentava un fenomeno di fotoreversibilità: il recettore della luce rossa è abilitato all'attivazione di un programma definito di risposta fisiologica che può essere reversibile, quindi attivo o inattivo, a seconda o della qualità spettrale di luce rossa (normale o lontana) con cui viene colpito. Le risposte fotoreversibili del fitocromo sono:

- *germinazione*, nei semi di lattuga e nell'avena, la quale si innesca con luce rossa normale e si blocca con luce rossa lontana
- *inibizione della fioritura* in Xanthium
- *promosso accrescimento*
- *formazione dei primordi* nella senape

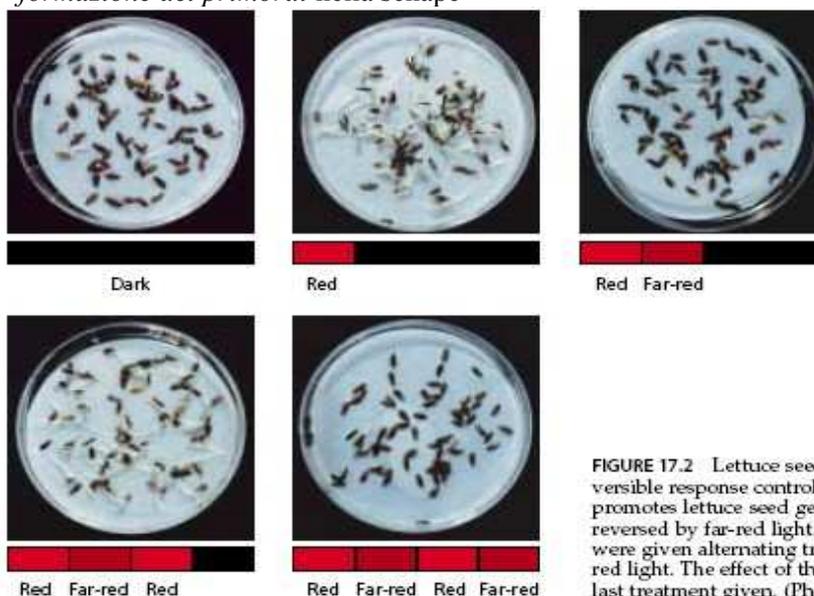


FIGURE 17.2 Lettuce seed germination is a typical photoreversible response controlled by phytochrome. Red light promotes lettuce seed germination, but this effect is reversed by far-red light. Imbibed (water-moistened) seeds were given alternating treatments of red followed by far-red light. The effect of the light treatment depended on the last treatment given. (Photos © M. B. Wilkins.)

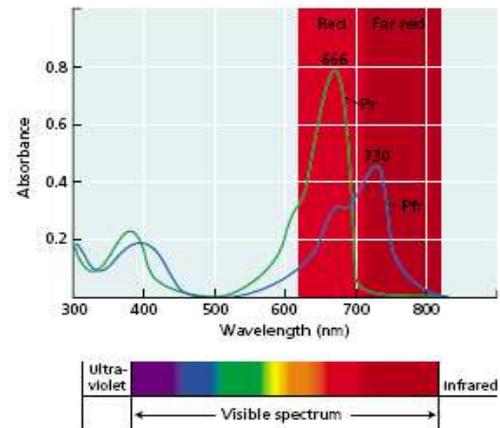
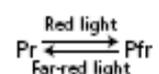


FIGURE 17.3 Absorption spectra of purified oat phytochrome in the Pr (green line) and Pfr (blue line) forms overlap. (After Vierstra and Quail 1983.)

Tutto ciò significa che esiste un unico fotorecettore per queste qualità spettrali, il fitocromo, che si trova in due forme interconvertibili (dimostrato nel 1952 da Borthwick), e la forma nella quale si trova è determinata dall'ultima qualità spettrale di luce ricevuta (per questo è



fotoreversibile). Nelle piante eziolate il fitocromo esiste nella forma PR sensibile alla luce rossa, ma se la forma PR assorbe la luce rossa allora diventa PFR sensibile alla luce rossa lontana, la quale se assorbe luce rossa lontana ritorna nello stato PR. Nel corso della giornata la pianta è colpita da una grande varietà spettrale dei singoli componenti della luce, quindi è importante la percentuale di fitocromo fisiologicamente attiva, ad esempio molto alta al tramonto o alla luce lunare, entrambe luci ricche in rosso lontano.

Quando una forma si interconverte nell'altra, non è possibile la totale interconversione, bensì ne rimarrà sempre una minima quantità residua nella forma originaria: quando irraggiamo con luce rossa l'85% diventa PFR e il restante 15% rimane PR; irraggiando invece con luce rossa lontana il 97% diventa PR ed il 3% rimane PFR; per questo si parla di *equilibrio stazionario del fitocromo*. La fotoreversibilità del fitocromo determina anche la reversibilità degli effetti fisiologici regolati.

L'eccessiva esposizione o irradianza non permettono la fotoreversibilità in quanto il fitocromo far red è degradato: la forma fisiologicamente attiva è il PFR in quanto è la luce rossa (che trasforma il PF in PFR) a determinare i vari effetti fisiologici.

Uno dei problemi che si erano posti era se le risposte fossero dovute alla scomparsa del PR o alla comparsa del PFR. Per risolvere questo dilemma vennero utilizzati mutanti con risposte fotomorfogenetiche alterate.

Mentre il fenotipo wt irraggiato con luce rossa ha un'inibizione della crescita dell'ipocotile, il mutante hy che non sintetizza fitocromo ha una crescita non inibita, non essendoci né la forma PFR né la forma PR: in conclusione è necessario un fitocromo che diventi PFR.

Per purificare il fitocromo sono stati svolti numerosi tentativi che hanno permesso negli anni 60 di purificare la proteina da germogli eziolati di avena, ma poiché questa forma di fitocromo è degradata proteoliticamente in quanto sensibili, è stato difficile avere alti livelli di proteina integra, anche perché è espresso a basse concentrazioni nella pianta. Solo negli anni '80 è stato possibile risalire alla struttura del fitocromo ed è stato visto che ogni subunità si organizza in forma dimerica (omodimero) e contengono un cromoforo in grado di assorbire luce rossa o rosso lontano. Ciascuna delle due subunità è costituita da due domini: il dominio N-terminale regola il binding al cromoforo mentre il dominio C-terminale regola la omodimerizzazione.

Il cromoforo è una *fitocromobilina* formata da 4 anelli di tipo eterociclico legati insieme, ossia ha una struttura simile ad una protoporfirina aperta; il gruppo eme coordina il metallo di transizione (ferro, ma anche magnesio), o altri tipi di elementi incontrati nelle clorofille. La capacità di assorbire determinate qualità spettrali dipende anche da come si forma il complesso che coordina l'azione metallo-protoporfirina.

Essendo la fitocromobilina simile ad una protoporfirina aperta, ogni anello assorbe nello stesso range di lunghezze d'onda con caratteristiche diverse: dei 4 anelli uno è legato con un legame tiolico alla cisteina del residuo N-terminale del polipeptide. L'altra estremità (ossia l'ultimo anello) ha un'isomeria cis-trans determinata dal doppio legame: cis e trans hanno diversi picchi di assorbimento, infatti la forma cis corrisponde alla forma PF mentre la trans sarebbe PFR: il cambiamento isomerico è determinato dal tipo di luce rossa che lo colpisce.

L'apoproteina si forma da un gene nucleare che codifica per questa parte Apo del fitocromo; l'assemblamento con il cromoforo avviene nel citosol insieme alla fitocromobilina prodotta nei plastidi a partire dall'acido 5-ammino levulinico: oltre al tipo di controllo genico regolato dalla luce rossa, un altro tipo di controllo riguarda l'assemblamento che può avvenire solo nel citosol in presenza di fitocromo e fitocromobilina.

Esistono due tipi di fitocromo, codificati da geni diversi e con proprietà diverse; le piante eziolate hanno un rapporto in cui il fitocromo 1 (corrispondente al gene del fitocromo A) è presente in maggior quantità, mentre nelle piante verdi è prevalente, ma non troppo, il tipo 2 (geni del fitocromo B, C, D, E).

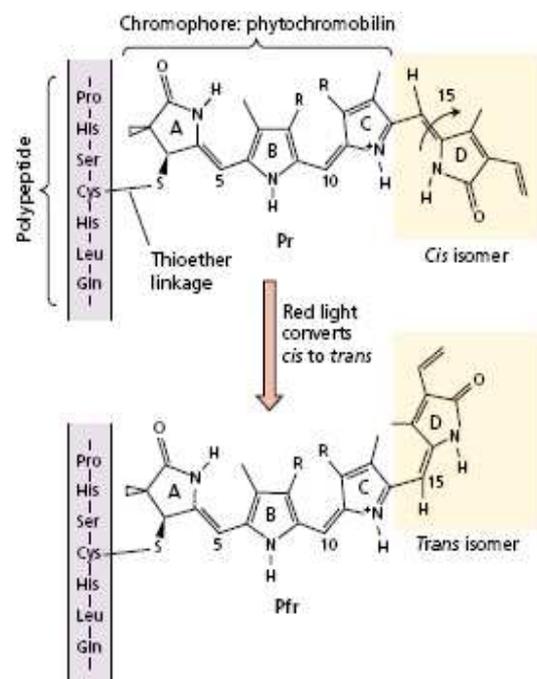


FIGURE 17.4 Structure of the Pr and Pfr forms of the chromophore (phytochromobilin) and the peptide region bound to the chromophore through a thioether linkage. The chromophore undergoes a cis-trans isomerization at carbon 15 in response to red and far-red light. (After Andel et al. 1997.)

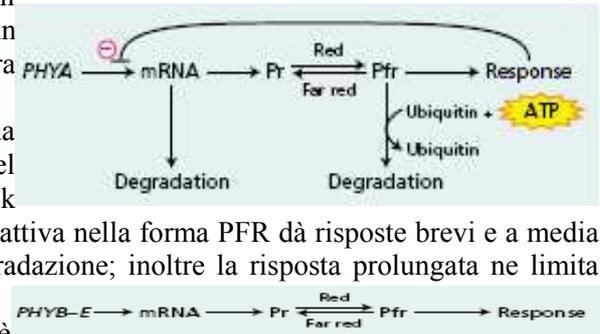
La concentrazione del fitocromo A è regolato da parecchi eventi (anche questo tipo di fitocromo come il B ha un equilibrio stazionario in quanto possiedono una struttura simile).

Le due proteine sono diverse in quanto sono codificate da geni diversi e anche regolate in modo diverso. Nel fitocromo A la risposta ha un controllo di feedback negativo per quanto riguarda la sua sintesi, che quando si attiva nella forma PFR dà risposte brevi e a media irradianza, altrimenti è soggetto a ubiquitinazione e degradazione; inoltre la risposta prolungata ne limita l'espressione in quanto presenta un'azione inibitoria.

Il fitocromo di tipo 2 (B-E) è sintetizzato più lentamente, è

più stabile e resistente all'ubiquitinazione e quindi all'attacco proteolitico, la sua espressione è indotta più lentamente ma è costante e diventa attivo quando la pianta è deeziolata, quindi regola la morfogenesi in condizioni di luce piena.

La localizzazione del fitocromo è stata studiata tramite geni reporter come BUS, posti sotto il controllo del promotore del fitocromo; il fitocromo A al buio ha concentrazioni più alte in alcune zone mentre il fitocromo B-E è espresso a concentrazioni minori e localizzate diversamente a seconda delle classi; in piena luce il fitocromo B-E è invece espresso a più alte concentrazioni.



EFFETTI FISOLOGICI

Le risposte fisiologiche sono distinguibili in base alla quantità di luce richiesta: poca, tanta o tantissima; si misura come *fluence* ossia la concentrazione di luce per unità di superficie, pari al numero di fotoni per unità di superficie, ossia (moli*metro)/secondo. E' molto importante la velocità perché anche la durata dell'illuminazione determina la quantità totale di luce ricevuta: la velocità si definisce *irradianza*.

Le risposte del fitocromo si distinguono quindi in:

- **very low fluence (VLFR):** 0.1-50 nM. Sono tipiche della bassa irradianza e rappresentate nello stimolo alla crescita del coleotile nel germoglio di avena eziolato. La luce rossa in condizioni di crescita al buio stimola l'allungamento del coleotile (la guaina che avvolge il cotiledone, ossia la prima foglia) e inibisce invece la crescita del mesocotile e dell'ipocotile. Nei semi di *Arabidopsis thaliana* la luce rossa ne stimola lo sviluppo, ma la luce rossa lontana invece la inibisce. Questi effetti valgono a condizioni di luce molto basse, quindi in piante con crescita eziolata. Il problema è che essendo la fluence molto bassa la quantità di PFR che si forma ha una percentuale dello 0.02% in termini di capacità di conversione del fitocromo totale in PFR. Rimarrà comunque una percentuale di PFR intorno allo 3% , in quanto non avverrà fotoreversibilità (come menzionato precedentemente); proprio per questo motivo le VLFR non sono risposte fotoreversibili (lo sono con irradianza superiore, che induce le stesse risposte).

- **low fluence (LFR):** da 100 a 100000 volte rispetto alle precedenti, quindi l'intervallo copre dai nanomoli ai micromoli, determina movimenti meccanicistici delle piante, attuate dalle cellule del pulvino, le quali sono situate alla base del picciolo e permettono il movimento fogliare in base alla differente pressione di turgore. Il processo è stimolato dalla luce rossa normale, mentre la luce rossa lontana la inibisce.

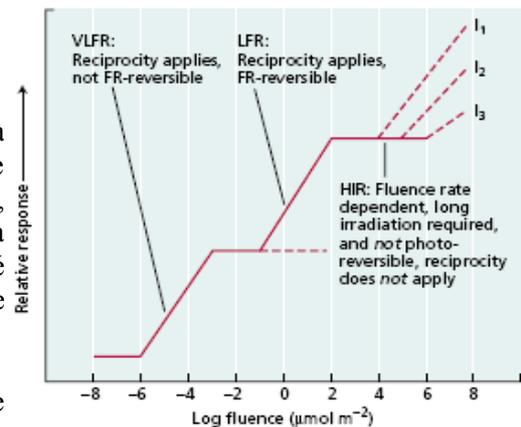
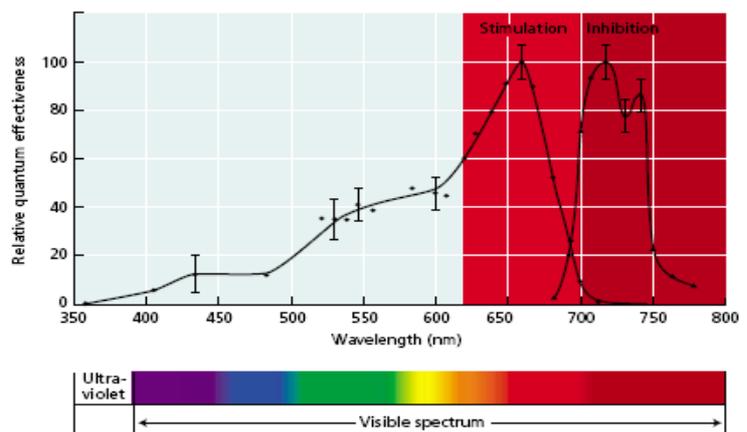


FIGURE 17.7 Three types of phytochrome responses, based on their sensitivities to fluence. The relative magnitudes of representative responses are plotted against increasing fluences of red light. Short light pulses activate VLFRs and LFRs. Because HIRs are also proportional to the irradiance, the effects of three different irradiances given continuously are illustrated ($I_1 > I_2 > I_3$). (From Briggs et al. 1984.)



Queste prime due risposte sono indotte da stimoli luminosi deboli che però possono contribuire alla fluenza totale se prolungati nel tempo; per avere un'idea della fluenza totale è necessario calcolare sia la velocità di fluenza (fotoni per secondo) sia il tempo di irraggiamento, questo per calcolare la quantità di fotoni totali che hanno colpito quella determinata pianta o tessuto.

- **high irradiance response (HIR):** irradianza superiore a 10mM; il tempo deve anche essere prolungato. Sono indotte quindi da fluenze 100/ 1000 volte maggiori rispetto alle LFR; alcune risposte avvengono sia con LFR che con HIR (sia bassa che alta irradianza), ad esempio le risposte indotte dalle HIR sono la sintesi di antocianine in alcune dicotiledoni come la mela, la quale diventa quindi colorata, poiché la sintesi di antocianine è sotto il controllo della luce rossa. Tra le risposte dovute sia alle LFR che alle HIR ci sono anche la sintesi di etilene e l'allungamento dell'ipocotile. Le risposte ad alta irradianza non sono fotoreversibili, e tra queste devono essere escluse le risposte dovute ad un breve tempo di esposizione ad intensità forti e quelle dovute ad una lunga esposizione a risposte deboli.

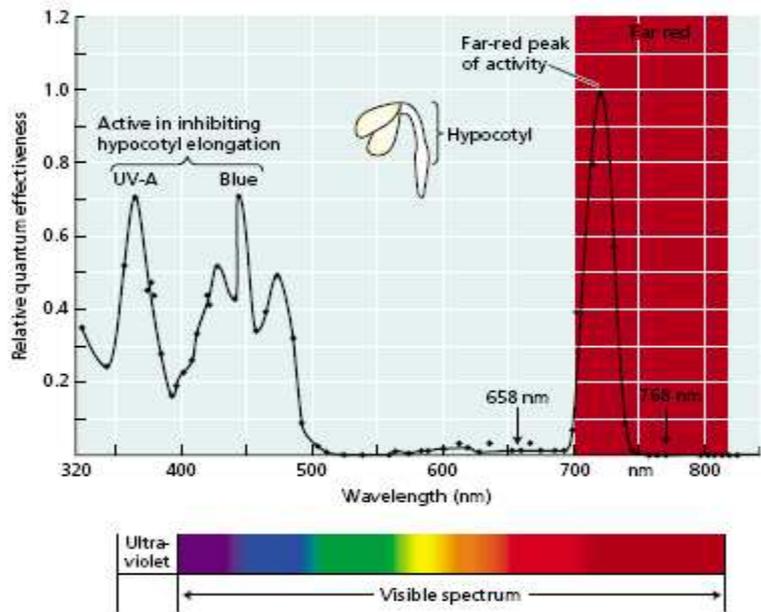


FIGURE 17.9 HIR action spectrum for the inhibition of hypocotyl elongation of dark-grown lettuce seedlings. The peaks of activity for the inhibition of hypocotyl elongation occur in the UV-A, blue, and far-red regions of the spectrum. (After Hartmann 1967.)

Per quanto riguarda l'effetto fisiologico dell'inibizione dell'allungamento dell'ipocotile, possono essere prodotti diversi spettri di azione dando impulsi con diverse lunghezze d'onda. E' stato osservato che oltre ai due picchi del rosso e rosso lontano, era presente anche un terzo picco corrispondente al blu; nel mutante H2 che non produce fitocromo non sono presenti le risposte nel rosso (sia normale che lontano) bensì era ancora presente la risposta nel blu data dai prodotti dei geni CRY1 e CRY2, che evidentemente codificano per recettori differenti dal fitocromo.

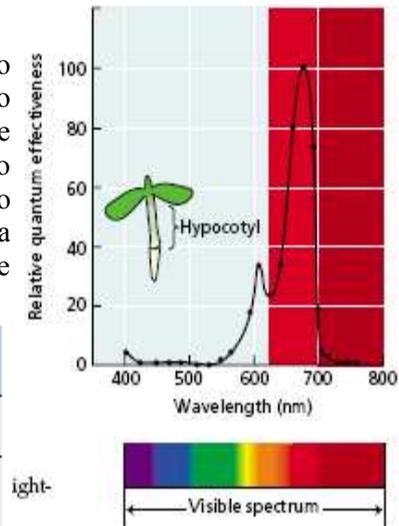


TABLE 17.3 Ecologically important light parameters		
	Photon flux density ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	R/FR ^a
Daylight	1900	1.19
Sunset	26.5	0.96
Moonlight	0.005	0.94
Ivy canopy	17.7	0.13
Lakes, at a depth of 1 m		
Black Loch	680	17.2
Loch Leven	300	3.1
Loch Borrallie	1200	1.2
Soil, at a depth of 5 mm	8.6	0.88

Le condizioni ambientali nel corso della giornata variano costantemente; in condizioni di luce piena la densità dei fotoni è molto alta, ossia pari a 1900, ed il rapporto tra PR e PFR è di 1.19; al tramonto la densità è molto bassa in termini di quantità di fotoni, ma la qualità spettrale è differente in quanto il rapporto è a favore del PFR (0.96), analogo alla situazione riscontrata nella luce lunare.

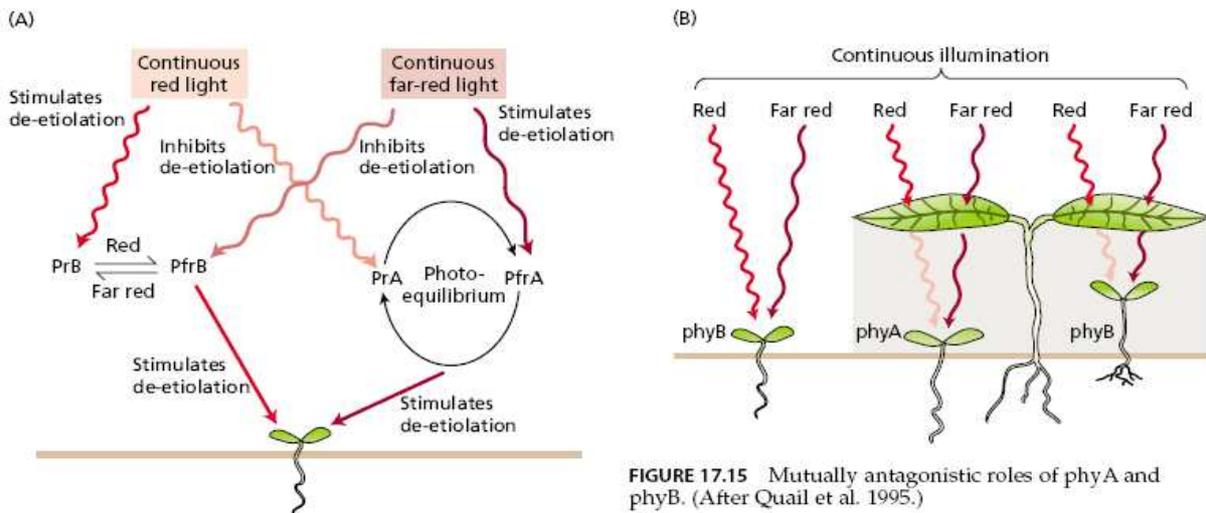


FIGURE 17.15 Mutually antagonistic roles of phyA and phyB. (After Quail et al. 1995.)

Nelle *kenopi*, ossia nelle piante di bosco che crescono alla luce di altre piante, la qualità della luce percepita è differente in quanto una parte è assorbita dalle piante situate ai vertici del bosco, che ricevono per prime i raggi solari, e lasciano passare una luce fortemente arricchita in rosso lontano; nei laghi la qualità spettrale della luce è spostata verso il rosso, nel suolo a 5 mm invece prevale la componente del rosso lontano.

Le piante rispondono alla luce in modo diversi, distinguendosi in *sciafile* (piante che prediligono esposizioni ombreggiate e non a pieno sole) ed *eliofile* (piante che richiedono esposizioni luminose e soleggiate, se aumenta il far red diminuisce PFR ripondono con un aumento della distensione).

Il rapporto tra red/ far red determina il grado di risposte in quanto il PFR si attiva con luce rossa e regredisce con luce rosso lontano.

Per quanto riguarda i semi, quelli che rispondono alla luce sono di solito semi piccoli che non hanno molte riserve, mentre i semi più grandi che contengono più amido e proteine non necessitano di luce per germinare. La luce regola anche i ritmi circadiani, ossia processi con fasi diverse di bassa affinità: alcuni ritmi circadiani sono determinati dalla luce, come i movimenti nictinastici, e anche l'abbassamento di alcune foglie o rami è determinato dalla fase di illuminazione o di ombra; ad esempio le foglie di Albizzia si alzano con la luce e si abbassano con il buio, e a queste fasi corrisponde l'orologio giornaliero.

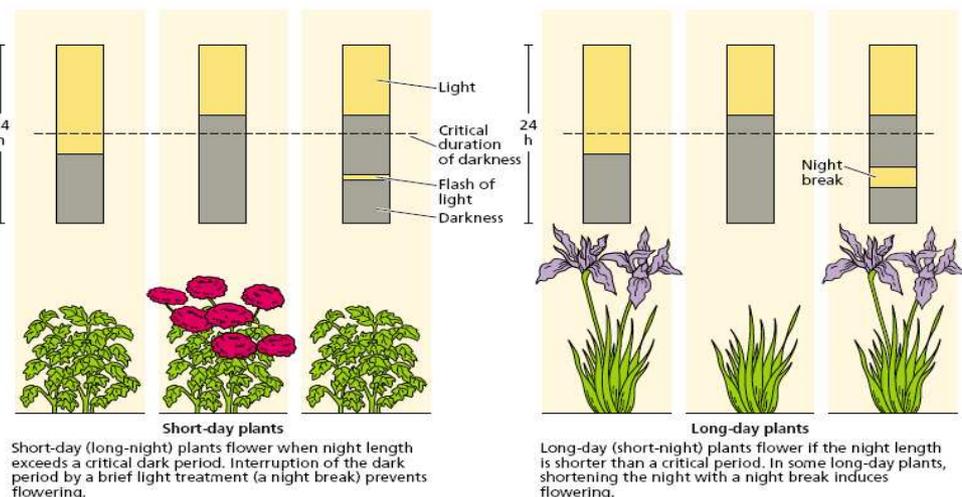
FOTOPERIODISMO

Il cambiamento della lunghezza d'onda data dal cambiamento tra il giorno e la notte può determinare l'inizio di un dato processo, ad esempio la fioritura, la riproduzione sessuale, la formazione di organi di riserva: le piante *brevidiurne* (come quelle invernali) sono quelle in cui la fioritura si innesca quando i giorni sono brevi; nelle piante *lungidiurne* invece la fioritura si verifica quando i giorni sono lunghi; nei fiori *mediidruni* i fiori fioriscono quando invece il giorno e la notte coincidono.

Se una pianta brevidiurna viene colpita durante la notte da un flash di luce rossa, non fiorisce più; invece se una pianta lungidiurna è colpita di notte da un flash di luce rossa, allora fiorisce. Questo indica che è la durata della notte ad essere percepita.

Gli effetti sono reversibili per entrambi i tipi di piante a seconda del rapporto red/far red: le risposte si attivano solo se avvengono in una data fase della notte.

Il processo è controllato dalla luce rossa; è monitorato il momento di buio e gli effetti sono fotoreversibili per buona parte della notte.



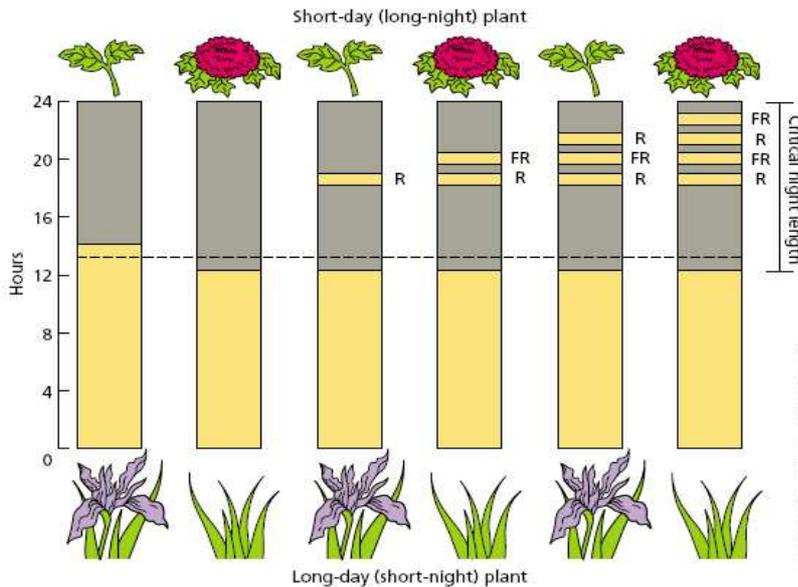


FIGURE 24.22 Phytochrome control of flowering by red (R) and far-red (FR) light. A flash of red light during the dark period induces flowering in an LDP, and the effect is reversed by a flash of far-red light. This response indicates the involvement of phytochrome. In SDPs, a flash of red light prevents flowering, and the effect is reversed by a flash of far-red light.

FDNZIONI DEL FITOCROMO

Nei mutanti *hy* con il fitocromo B mutato è osservabile un fenotipo con mancata riduzione dell'allungamento dell'ipocotile, ridotta quantità di clorofilla, pochi mRNA di proteine, e la germinazione non risponde.

Le altre forme del fitocromo non possono prevenire l'accorciamento dell'ipocotile in risposta alla luce blu.

Nei mutanti per il fitocromo A è evidente una risposta alterata al far red ed una normale risposta alla luce bianca perché nella fotomorfogenesi il fitocromo A ha un ruolo minore ed in generale si deduce come il fitocromo A abbia un ruolo limitato nella deeziolatura. Se ad una pianta cresciuta in luce piena è somministrata luce rossa, è osservabile il fenomeno della deeziolatura, ossia fotomorfogenesi o crescita, processi mediati dal fitocromo B in quanto il fitocromo A è degradato, facendo precipitare la sua concentrazione. In condizioni di ombra arricchita con far red invece, la deeziolatura è mediata dal fitocromo A, il quale ha una labilità ed un tempo d'azione diverso dal caso precedente: questo tipo di fitocromo si autoinibisce nella risposta, quindi agisce solo nel primo periodo ed in seguito sarà il fitocromo B a continuare gli effetti fisiologici con effetto "fuga dall'ombra".

Quindi il fitocromo A e B rispondono in modo diverso ma consentono di rispondere fotomorfogeneticamente usando nel migliore dei modi le diverse classi di fitocromi.

Sono stati svolti numerosi esperimenti creando chimere di fitocromi.

Un fitocromo AB (parte N-terminale del fitocromo A) risponde alla luce far red. Il fitocromo BA risponde alla luce red, quindi ci sono parti diverse con ruoli diversi nella percezione della luce e anche nella fotodegradazione, in particolare il primo è fotolabile e si degrada in quando la parte N-terminale del fitocromo A

dona fotolabilità alla chimera, proprietà data dal sito *PEST* tipica del fitocromo A riconosciuta ed attaccata dall'ubiquitina. La parte N-terminale del fitocromo A isolata non dà fotodegradazione, ma necessita anche del dominio N-terminale.

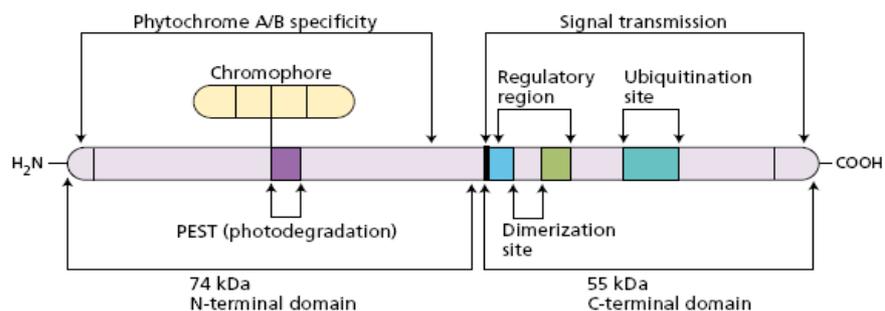


FIGURE 17.16 Schematic diagram of the phytochrome holoprotein, showing the various functional domains. The chromophore-binding site and PEST sequence are located in the N-terminal domain, which confers photosensory specificity to the molecule—that is, whether it responds to continuous red or far-red light. The C-terminal domain contains a dimerization site, a ubiquitination site, and a regulatory region. The C-terminal domain transmits signals to proteins that act downstream of phytochrome.

MECCANISMI D'AZIONE

Il modello è simile alle *istidina chinasi* batteriche, ma non è fosforilata un'istidina bensì una serina innescata dalla luce rossa: questa causa un cambio conformazionale nella proteina che permette l'autofosforilazione del residuo di serina; in seguito può fosforilare anche altre proteine. Sono indotti eventi di tipo biochimico ma anche a livello di espressione genica.

Il fitocromo agisce sui flussi ionici e aumenta il pH apoplastico dell'estensore (cellule ventrali) ma diminuisce il pH apoplastico del flessore (cellule dorsali), comportando un diverso turgore nelle cellule del pulvino. Al buio l'H⁺ ATPasi delle cellule dorsali è attiva, quella delle cellule ventrali è inattiva.

Induce la depolarizzazione del plasmalemma in *Nitella* (1.7s) e l'iperpolarizzazione del plasmalemma in *Avena*. Stimola inoltre la rotazione del cloroplasto in *Mougeotia*.

A livello di espressione genica sono presenti geni di risposta primaria che non richiedono la sintesi di nuovi fattori bensì l'attivazione di fattori già esistenti; differente il discorso sui geni di risposta secondaria, in quanto il fitocromo attiva fattori di trascrizione che innescano la sintesi di ulteriori fattori di trascrizione che mediano la risposta stimolando la trascrizione genica dei geni di risposta secondaria.

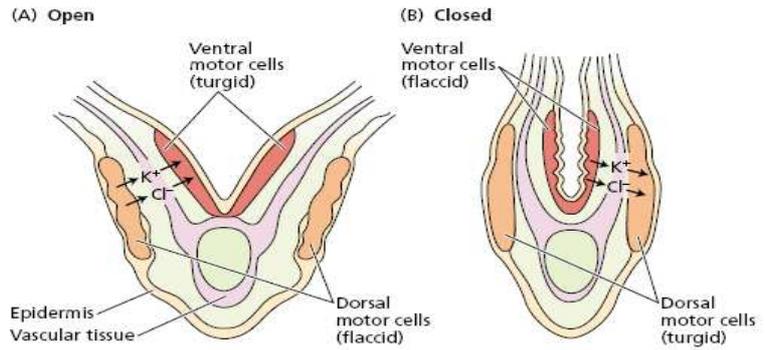


FIGURE 17.14 Ion fluxes between the dorsal and ventral motor cells of *Albizia pulvini* regulate leaflet opening and closing. (After Galston 1994.)

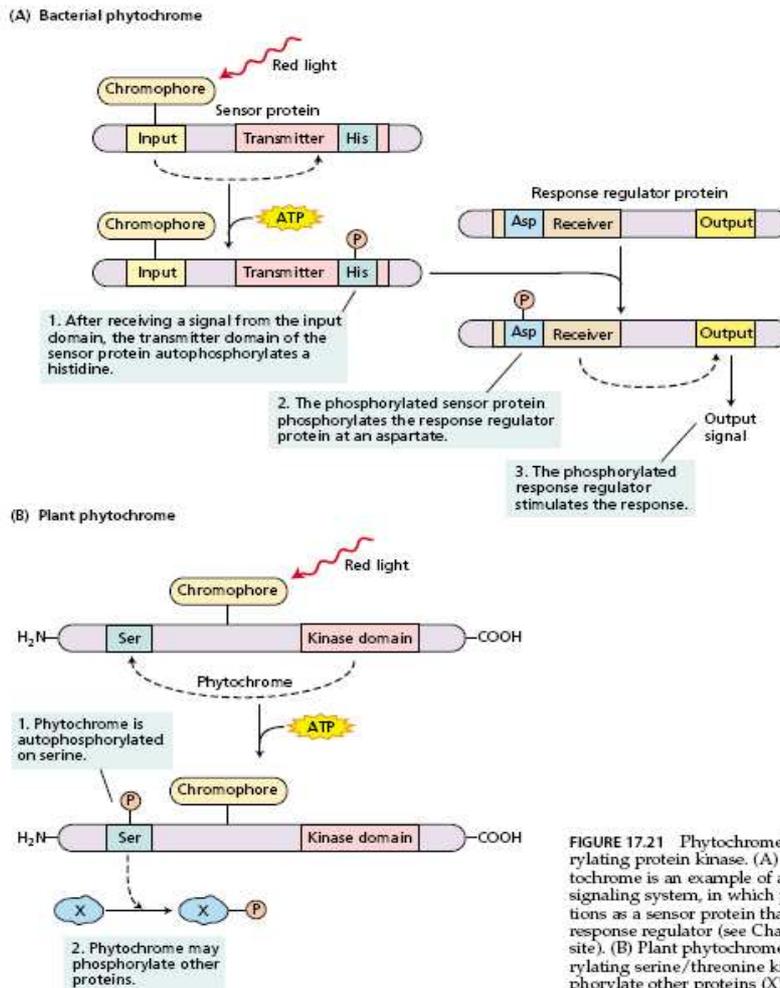


FIGURE 17.21 Phytochrome is an autophosphorylating protein kinase. (A) Bacterial phytochrome is an example of a two-component signaling system, in which phytochrome functions as a sensor protein that phosphorylates a response regulator (see Chapter 14 on the web site). (B) Plant phytochrome is an autophosphorylating serine/threonine kinase that may phosphorylate other proteins (X).

Tra i geni regolati dal fitocromo ci sono proteine di sviluppo del cloroplasto, *LHCIIB* (molecola del complesso antenna codificati da geni di risposta secondaria), fattori di trascrizione *MYB* (geni di risposta) ed il *fitocromo A*.

Il modello di trasduzione del segnale è stato studiato su un mutante di pomodoro che produceva poco fitocromo A, nel quale fu introdotta una grande quantità di fitocromo A; fu eseguita un'analisi dell'espressione genica e quindi dei geni potenzialmente inducibili, microiniettando anche vari trasduttori del segnale. Sono stati compiuti anche studi su mutanti hy (privi di fitocromo e mancanti di risposte alla luce) e mutanti COP e DET (mancata risposta alle condizioni di buio: hanno ipocotili corti al buio, cloroplasti differenziati e non hanno clorofilla). Le proteine COP e DET sono regolatori negativi della risposta.

La luce rossa converte il fitocromo A nella forma *PFRa* ed il fitocromo B nella forma *PFRb* con il processo di autofosforilazione della serina.

Le forme attivate del fitocromo fosforilano le proteine che interagiscono con le G-proteine, i quali tramite vie di trasduzione del segnale attivano fattori di trascrizione specifici nel nucleo. *PFRa* e *PFRb* entrano nel nucleo. Al buio le proteine COP bloccano regolando negativamente i geni specifici regolati dalla luce; data la molteplicità delle risposte ci sono cascate di trasduzione parallele che permettono di usare anche trasduzioni calcio mediate o GMP ciclico mediate.

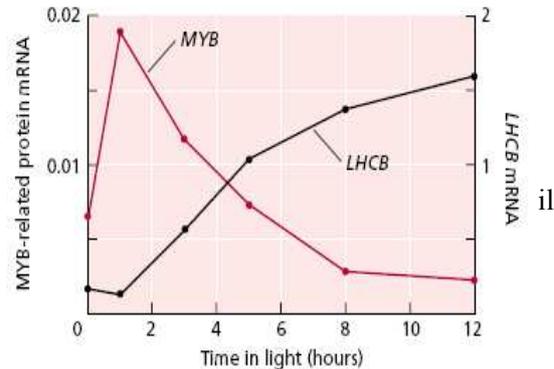
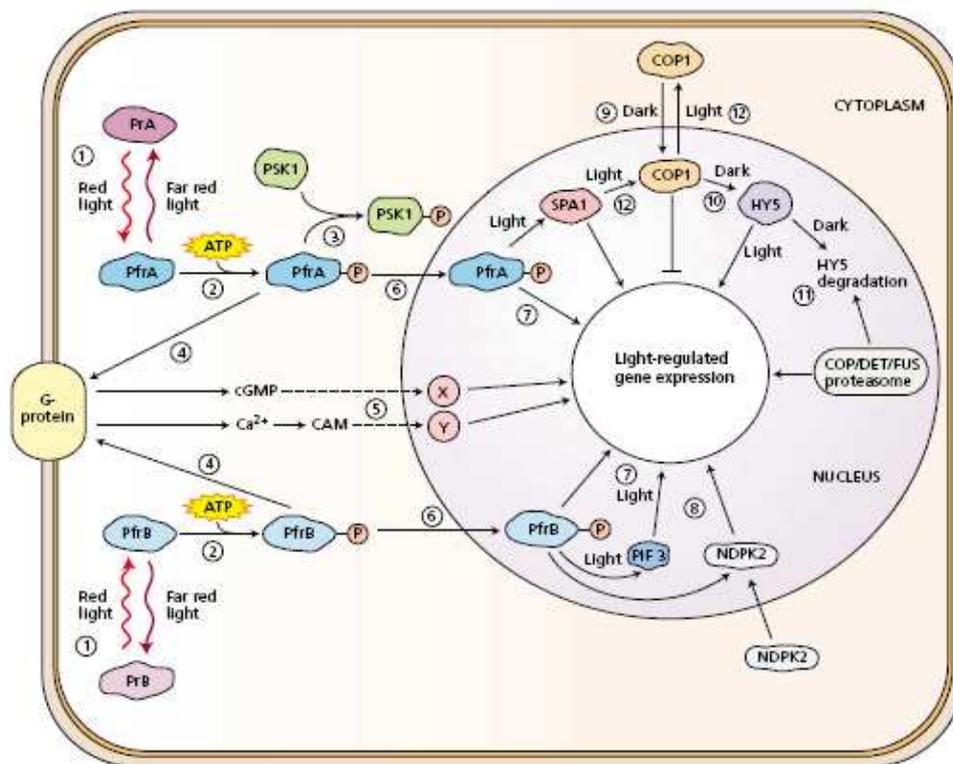


FIGURE 17.17 Time course for inducing transcription. Kinetics of the induction of transcripts for a MYB-related transcription factor (MYB) and the light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein (LHCb) in *Arabidopsis* after transfer of the seedlings from darkness to continuous white light. (After Wang et al. 1997.)



- ① Red light converts PrA and PrB to their Pfr forms.
- ② The Pfr forms of phyA and phyB phytochrome can autophosphorylate.
- ③ Activated PfrA phosphorylates phytochrome kinase substrate 1 (PKS1).
- ④ Activated PfrA and PfrB may interact with G-proteins.
- ⑤ cGMP, calmodulin (CAM), and calcium (Ca²⁺) may activate transcription factors (X and Y).
- ⑥ Activated PfrA and PfrB enter the nucleus.
- ⑦ PfrA and PfrB may regulate transcription directly or through interaction with phytochrome interacting factor 3 (PIF3).
- ⑧ Nucleoside diphosphate kinase 2 (NDPK2) is activated by PfrB.
- ⑨ In the dark, COP1 enters the nucleus and suppresses light-regulated genes.
- ⑩ In the dark, COP1, an E3 ligase, ubiquitinates HY5.
- ⑪ In the dark, HY5 is degraded with the assistance of the COP/DET/FUS proteasome complex.
- ⑫ In the light, COP1 interacts directly with SPA1 and is exported to the cytoplasm.